

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zur Lyse von Salmonellen
durch *Bdellovibrio bacteriovorus***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)

durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Beate Schlottermüller
aus Erfurt

Leipzig, 2003

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karsten Fehlhaber, Institut für Lebensmittelhygiene,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Leipzig
2. Prof. Dr. Monika Krüger, Institut für Bakteriologie und Mykologie,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Leipzig
3. PD Dr. habil. Theodor Bergann, Sächsisches Staatsministerium für
Soziales, Dresden

Tag der Verteidigung: 18.02.2004

Meinem Vater

Meinem Verlobten

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	BDELLOVIBRIO	2
2.1.1	Entdeckung der Bdellovibrionen	2
2.1.2	Taxonomische Stellung der Bdellovibrionen	3
2.1.3	Morphologie und Charakteristika der Bdellovibrionen.....	4
2.1.3.1	Morphologie der Bdellovibrionen	4
2.1.3.2	Charakteristika der Bdellovibrionen	5
2.1.4	Vergleichende Darstellung verschiedener parasitischer Bakterien.....	7
2.1.5	Wirtsspektrum.....	7
2.1.6	Bakteriophagen der Bdellovibrionen	11
2.1.7	Vorkommen der Bdellovibrionen.....	12
2.1.8	Entwicklungszyklus.....	14
2.1.8.1	<i>Bdellovibrio</i> -Wirt-Interaktionen wirtsabhängiger Stämme	15
2.1.8.1.1	Erster Kontakt und Anheftung	17
2.1.8.1.2	Penetration.....	19
2.1.8.1.3	Intraperiplasmatisches Wachstum und Vermehrung.....	23
2.1.8.1.4	Lyse des Bdelloplasten und Freisetzen der Nachkommen.....	25
2.1.8.2	Wirtsunabhängige Mutanten	25
2.1.9	Isolierung.....	27
2.1.9.1	Metabolische Charakteristika des intrazellulären Wachstums	29
2.1.10	Auswirkungen auf die Wirtszelle	37
2.1.11	Anwendungen.....	38
2.2	SALMONELLA.....	40
2.2.1	Taxonomische Stellung und biochemische Charakteristika der Salmonellen	40
2.2.1.1	Taxonomische Stellung der Salmonellen.....	40
2.2.1.2	Biochemische Charakteristika der Salmonellen.....	41
2.2.2	Faktoren, die das Wachstum und Überleben der Salmonellen beeinflussen.....	43
2.2.3	<i>Salmonella</i> als kausales Agens von Lebensmittelvergiftungen	44
2.2.3.1	Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen	44
2.2.3.2	Minimale infektiöse Dosis	46
2.2.3.3	Virulenzfaktoren der Salmonellen	47
2.2.3.4	Klinisches Bild und Pathogenese der Salmonellose beim Menschen.....	47
2.2.3.5	Inzidenz der Enteritis-Salmonellose.....	49
2.2.3.6	Dominierender Erreger der Enteritis-Salmonellose.....	51
3.	MATERIAL UND METHODEN	53
3.1	Verwendete Stämme	53
3.2	Nachweismethode	57
3.2.1	Kultivierungsbedingungen für den Einsatz der Wirtsbakterien im Zweikomponentensystem	57
3.2.2	Doppelschichtagar-Methode	57
3.2.2.1	Herstellung des Unterschichtagars	58
3.2.2.2	Herstellung des Oberschichtagars.....	58
3.2.2.3	Tropfmethode	59
3.2.2.4	Gießmethode	60
3.3	Passagierung der <i>Bdellovibrio</i> -Stämme.....	60
3.4	Einstellen der Wirtszellzahl.....	61

3.5	Einstellen der <i>Bdellovibrio</i> -Zahl	62
3.6	Bestimmung der Plaquezahl	62
3.7	Bestimmung der Plaquegröße	63
3.8	Biostatistische Auswertung	63
4.	ERGEBNISSE	64
4.1	Ergebnisse der Lysierbarkeit der einzelnen Stämme	65
4.2	Ergebnisse der Lysierbarkeit der einzelnen Phagotypen	68
4.3	Ergebnisse der Lysierbarkeit der verschiedenen Serovare	73
5.	DISKUSSION	74
5.1	Ergebnisse der Lysierbarkeit der einzelnen Stämme	74
5.2	Ergebnisse der Lysierbarkeit der einzelnen Phagotypen	76
5.3	Ergebnisse der Lysierbarkeit der verschiedenen Serovare	77
5.4	Anwendung der Bdellovibrionen im Lebensmittelbereich	78
5.4.1	Apathogenität	78
5.4.2	Resistenzen	79
5.4.3	Keimspektrum	82
5.4.4	Keimgehalt	83
5.4.5	Temperatur	84
5.4.6	pH-Wert	84
5.4.7	Sauerstoff	85
5.4.8	Anwendungsverfahren	86
6.	ZUSAMMENFASSUNG	89
7.	SUMMARY	91
8.	LITERATURVERZEICHNIS	93

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
<i>B.</i>	<i>Bdellovibrio</i>
CFU	colony forming units
DAP	diaminopimelic acid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
H-D	host-dependent bzw. wirtsabhängig
H-I	host-independent bzw. wirtsunabhängig
LPS	Lipopolysaccharid
MDO	membrane-derived oligosaccharides
ORF	open reading frame
PFU	plaque forming units
PTS	Phosphoenolpyruvat Zucker-Phosphotransferase System
RQ	Respirationsquotient
Y_{ATP}	gebildete Gramm Trockengewicht Zellmaterial pro 1 Mol ATP

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Bdellovibrionen sind bereits seit 1962 bekannt, als sie zufällig beim Versuch der Isolierung von Bakteriophagen, die gegen phytopathogene Pseudomonaden wirksam sind, entdeckt wurden (STOLP u. PETZOLD 1962). Es handelt sich dabei um sehr kleine begeißelte, der Familie Spirillaceae angehörende, gramnegative Bakterien, welche in der Lage sind, andere gramnegative Bakterien zu lysieren (STOLP u. STARR 1963). Diese einzigartige Eigenschaft macht die Bdellovibrionen besonders im Hinblick auf eine mögliche Nutzung als biologisches Desinfektionsmittel sehr interessant.

Bisherige Untersuchungen hatten hauptsächlich die Erfassung des Spektrums an geeigneten Wirtsbakterien und die Erforschung der genauen Funktionsweise der Bdellovibrionen bei ihrer Anheftung und Lyse sowie den Nachweis von Bdellovibrionen in verschiedenen Lebensräumen als Gegenstand. Bezüglich der Lyse verschiedener *Salmonella*-Serovare und -Phagotypen durch *Bdellovibrio* existierten jedoch bislang nur spärliche Untersuchungen.

Nachdem erste Versuche der Nutzung der Bdellovibrionen in der Bekämpfung unerwünschter Keime im Abwasser positive Resultate ergaben, soll nun die Möglichkeit einer späteren Nutzung im Bereich der Lebensmittelwirtschaft geprüft werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, in einem ersten Schritt im Hinblick auf eine mögliche Nutzung der Bdellovibrionen in der Lebensmittelwirtschaft die Lysierbarkeit verschiedener, hauptsächlich aus Lebensmitteln isolierter *Salmonella*-Stämme durch *Bdellovibrio bacteriovorus* zu überprüfen sowie mögliche Unterschiede aufzudecken. Hierzu sollten anhand der für die Isolierung von Bdellovibrionen modifizierten Doppelschichtagarmethode 73 solcher *Salmonella*-Stämme verschiedener Serovare und Phagotypen auf ihre Lysierbarkeit durch zwei verschiedene *Bdellovibrio*-Stämme getestet und die entsprechenden Plaquezahlen sowie die Plaquegrößen verglichen werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 BDELLOVIBRIO

2.1.1 Entdeckung der Bdellovibrionen

Die Entdeckung der Bdellovibrionen durch Heinz Stolp im Jahr 1962 (STOLP u. PETZOLD 1962) ist einem Zufall zu verdanken. Beim Versuch der Isolierung von Bakteriophagen, die gegen phytopathogene Pseudomonaden aktiv sind, aus einer Bodenprobe, konnte Stolp nach der für Bakteriophagen üblichen 24stündigen Inkubationsphase auf dem Bakterienrasen keine Phagenplaques feststellen. Jedoch verwarf er die Petrischale nicht und fand zu seiner Überraschung nach weiteren zwei Tagen deutliche Lysiszonen, die etwa eine Woche lang weiter an Größe zunahmen. Aus dieser Beobachtung schloss Stolp, dass es sich nicht um die herkömmlichen Bakteriophagen handeln konnte.

Diese Schlussfolgerung bestätigte sich bei der Untersuchung von Material, welches aus den wachsenden Plaques gewonnen wurde. Bei der Betrachtung dieses Materials im Phasenkontrastmikroskop zeigte sich eine große Anzahl winziger, sich sehr schnell bewegendes Organismen. Diese hefteten sich an die Pseudomonaden und verursachten deren Lyse. Letzte Gewissheit, dass Verursacher der zeitlich verzögerten Plaques keine Bakteriophagen waren, ergab sich aus den Tatsachen, dass der Organismus im Gegensatz zu Phagen weder durch einen Filter mit einer Porengröße von 200 nm filtrierbar war noch eine Plaquebildung auf einem Streptomycin-resistenten Bakterienstamm in Gegenwart von Streptomycin erfolgte.

Die Beschreibung des Lebenszyklus von *Bdellovibrio* durch verschiedene Autoren hat zu einer gewissen Verwirrung der Terminologie geführt. Im Folgenden werden die Begriffe Parasit und Prädator synonym verwendet. Gleiches gilt für Wirts- und Substratzelle sowie für wirtsunabhängige und saprophytische Mutanten bzw. Stämme.

2.1.2 Taxonomische Stellung der Bdellovibrionen

Mit dem Aufkommen neuer molekularbiologischer Verfahren in den letzten Jahren ist die Überprüfung der taxonomischen Stellung vieler Mikroorganismen möglich geworden, wodurch diese zum Teil bereits korrigiert wurde bzw. noch untersucht wird. So steht auch die taxonomische Stellung der Bdellovibrionen gegenwärtig im Mittelpunkt vieler Forschungsarbeiten und ist noch nicht vollständig geklärt.

Das von Stolp und Starr (1963) vorgeschlagene Genus *Bdellovibrio* besteht aus molekular unterschiedlichen Gruppen von Mikroorganismen, die nicht eng miteinander verwandt sind (BAER et al. 2000). Der Gattungsname geht auf einen Vorschlag von Dr. R. E. Buchanan zurück (STOLP u. STARR 1963), wobei „*Bdello*“ aus dem Griechischen stammt und die Ähnlichkeit der Bdellovibrionen bei der Anheftung an ihren Wirt mit einem Blutegel zum Ausdruck bringen soll. Das Wort „*Vibrio*“ deutet auf die vibrioide Gestalt der Bdellovibrionen.

HESPELL et al. (1984) zeigten mittels Untersuchung der Oligonukleotide der 16S RNA eine enge Verwandtschaft der von ihnen untersuchten Bdellovibrionen mit Sulfat-reduzierenden Bakterien und Myxobakterien. Der Vorschlag, Bdellovibrionen in die δ Gruppe der Proteobakterien mit Myxobakterien und sulfatreduzierenden Bakterien in die Familie der Spirillaceae aufzunehmen (STARR u. SEIDLER 1971; VARON u. SHILO 1981), wird durch die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse von JURKEVITCH et al. (2000) weiter bekräftigt.

Bdellovibrionen lassen sich wie folgt klassifizieren:

Familie: Spirillaceae

Gattung: *Bdellovibrio* (STOLP u. STARR 1963)

Arten: beschriebene Arten

1. *Bdellovibrio bacteriovorus* (STOLP u. STARR 1963)

2. *Bdellovibrio stolpii/Bacteriovorax stolpii* (SEIDLER et al. 1972; BAER et al. 2000)

3. *Bdellovibrio starii/Bacteriovorax starii* (SEIDLER et al. 1972; BAER et al. 2000)

nicht spezifizierte Gruppen

4. *Bdellovibrio* sp. Stamm W (HOENIGER et al. 1972)

5. Marine *Bdellovibrio*-Isolate (TAYLOR et al. 1974; MARBACH et al. 1976)
BURNHAM und CONTI (1984) unterscheiden 24 unklassifizierte marine *Bdellovibrio*-Isolate.

Insbesondere die von BAER et al. (2000) vorgeschlagene Trennung der Spezies *Bdellovibrio* und *Bacteriovorax* wird durch die Untersuchungsergebnisse weiterer Forschergruppen unterstützt (SCHWUDKE et al. 2001; SNYDER et al. 2002). Die Arbeit von SNYDER et al. (2002) läßt zudem erstmals verwandtschaftliche Beziehungen der Salzwasser-Stämme mit den Arten *Bacteriovorax starii* und *stolpii* erkennen. So vermuten diese Autoren, dass die marinen Isolate von einem *Bacteriovorax*-Vorfahren abstammen.

2.1.3 Morphologie und Charakteristika der Bdellovibrionen

2.1.3.1 Morphologie der Bdellovibrionen

Bdellovibrionen sind vibrioide bis stäbchenförmige gramnegative Bakterien, die sich außerhalb ihres Wirtes durch eine Länge von 1-2 µm und eine Breite von 0,25-0,40 µm auszeichnen. Leichte Abweichungen in Größe und Form sind jedoch möglich (STOLP u. STARR 1963; ABRAM u. DAVIS 1970; BURNHAM et al. 1970). *Bdellovibrio* besitzt eine auffallend dicke (STOLP 1968), polare, bescheidete Geißel mit einem Durchmesser von 28 nm, wobei das innere core 13 nm und die umgebende Scheide 7,5 nm messen (SEIDLER u. STARR 1968). Die besondere Dicke der Geißel wird beim Vergleich mit anderen begeißelten Bakterien deutlich. So beträgt das Verhältnis der Geißeldicke zur Zelldicke bei den meisten Bakterien 1:60 bis 1:100, während es bei *Bdellovibrio* mit etwa 1:10 angegeben wird (STOLP 1968). Obwohl die Geißelscheide in physikalischem Zusammenhang mit der Außenmembran steht (THOMASHOW u. RITTENBERG 1985a), unterscheidet sie sich durch das starke Überwiegen der 19:1 sowie den sehr geringen Gehalt an β OH14 Fettsäure biochemisch vom Rest der Außenmembran (THOMASHOW u.

RITTENBERG 1985b). Nachdem sich *Bdellovibrio* an eine geeignete Wirtszelle geheftet hat, kann er diese penetrieren, wobei die gesamte Geißel verlorengeht (SHILO 1969).

Am unbegeißelten Zellende wurden ungewöhnliche Strukturen beschrieben. Es handelt sich hierbei um mehrere nagelähnliche Filamente, die einen Durchmesser von 8-10 nm und eine Länge bis 0,8 µm besitzen, um elektronendichte Ring-ähnliche Strukturen (ABRAM u. DAVIS 1970) sowie um „holdfast“-Strukturen, die möglicherweise an der Anheftung und Penetration beteiligt sind (SCHERFF et al. 1966). Es wurde jedoch vermutet, dass die „holdfast“-Struktur ein Artefakt darstellt (BURNHAM et al. 1970; ABRAM u. DAVIS 1970).

Während der intraperiplasmatischen Entwicklung wächst *Bdellovibrio* zu relativ großen spiralförmigen Zellen (SCHERFF et al. 1966; STARR u. BAIGENT 1966; SEIDLER u. STARR 1969b). Die Teilung dieser spiralförmigen Zellen führt zur Bildung von Tochterzellen, die morphologisch mit den freilebenden *Bdellovibrionen* identisch sind.

Die Feinstruktur des Zytoplasmas ist mit der anderer Bakterien vergleichbar. Das Nukleoplasma nimmt ca. zwei Drittel des Zytoplasmas ein (STARR u. BAIGENT 1966). Am anterioren Zellende befindliche Mesosomen (STARR u. BAIGENT 1966; BURNHAM et al. 1968) sind möglicherweise an der Anheftung oder Penetration und Zellteilung beteiligt.

2.1.3.2 Charakteristika der *Bdellovibrionen*

Allen *Bdellovibrionen* gemein sind ihr Färbeverhalten in der Gramfärbung, welches sie als gramnegative Bakterienparasiten kennzeichnet, ihr intraperiplasmatisches Wachstum, die Möglichkeit, H-I-Stämme aus einer Population von H-D-Organismen zu isolieren, ihre aeroben bis mikroaerophilen Eigenschaften sowie ihre positiven Oxidase- und Katalasereaktionen. Im Falle von H-I-Mutanten kann es bei wiederholter wirtsfreier Passagierung auf festen Medien zum Verlust der Beweglichkeit und zu variabler Katalasereaktion kommen (BAER et al. 2000).

Die allen *Bdellovibrionen* gemeine, extrem hohe Motilität wird durch die Geißel vermittelt. So erreichen die Parasiten eine relative Geschwindigkeit von bis zu 100

Körperlängen pro Sekunde (STOLP 1967) .

Weitere Charakteristika, welche zwischen den einzelnen Arten differieren, sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Überblick über ausgesuchte Charakteristika verschiedener *Bdellovibrio*-Arten

	<i>B. bacteriovorus</i>	<i>B. stolpii</i>	<i>B. starii</i>
Mol% G+C	49,5-51,5 ^a	41,8 ^b	43,5 ^b
Temperatur-Optimum (in°C)	30-35 für 109D ^e	15-35 ^c	20-30 ^c
Vorherrschende Fettsäuren ^c		15:1 ω 8c, 13:0 und 13:0iso	16:1 ω 9c, 13:0iso, 13:0 und 15:1 ω 8c
Sensitivität gegenüber O/129 ^f	+	+	-
Protease-Aktivität ^d	gering	hoch	moderat
Sensitivität gegenüber Bakteriophagen ^f	+	+	-
Reduktion von Nitrat zu Nitrit ^f	-	+	-
Fakultativer Parasitismus ^f	-	+	-
Genom-Größe x 10 ⁶ Da ^b	1300-1410	1470	1670
DNA:DNA Hybridisierung (in %)			
<i>B. bacteriovorus</i>	100 ^f	28 ^f	23 ^f
<i>B. stolpii</i>	28 ^f	100 ^f	16 ^b
<i>B. starii</i>	23 ^f	16 ^b	100 ^f

^a Seidler et al. (1969)

^b Seidler et al. (1972)

^c Baer et al. (2000)

^d Stolp (1981)

^e Seidler und Starr (1969a)

^f Burnham und Conti (1984)

Marine *Bdellovibrio*-Isolate zeichnen sich durch einige Besonderheiten aus. So benötigen sie für ihr Wachstum 75-100 mM Natriumchlorid, wobei eine Konzentration von 125-150 mM optimale Bedingungen bietet (TAYLOR et al. 1974). Des weiteren sind zumindest einzelne solcher Stämme, obwohl sie bei Temperaturen von 20-30°C Plaques bilden (MARBACH et al. 1976), in der Lage, auch noch bei 4°C Oberflächen zu kolonisieren (KELLEY et al. 1997). Der G+C Gehalt ihrer DNA schwankt zwischen 33,4 und 38,5 Mol% (MARBACH et al. 1976).

2.1.4 Vergleichende Darstellung verschiedener parasitischer Bakterien

Die Charakterisierung des Genus *Bdellovibrio* basierte über Jahrzehnte ausschließlich auf dem Parasitismus auf gramnegativen Bakterien als alleinigem Kriterium (SEIDLER et al. 1972). Neben der daraus resultierenden Heterogenität im Genus *Bdellovibrio* barg eine solche „Identifizierung“ jedoch auch das Risiko der Verwechslung. Es existieren nämlich auch andere Bakterien, welche dieses Merkmal aufweisen. Es ist gelungen, diese Bakterien - mit Ausnahme von *Vampirococcus* - mit Hilfe von Laborkulturen dauerhaft verfügbar zu machen. Einige metabolische und zelluläre Charakteristika, durch die sich diese untereinander bzw. von *Bdellovibrio* unterscheiden, sind in Tabelle 2 aufgeführt. *Bdellovibrio* zeichnet sich gegenüber den Genera *Micavibrio*, *Vampirovibrio* und *Vampirococcus* durch seine Fähigkeit der Lyse eines breiten Spektrums gramnegativer Zellen aus, währenddessen letztgenannte lediglich in der Lage sind, Vertreter eines einzelnen Genus zu nutzen (RUBY 1991). Somit erscheinen Bdellovibrionen im Hinblick auf eine Nutzung zur Eliminierung unerwünschter Keime gegenüber anderen Bakterien wesentlich attraktiver.

2.1.5 Wirtsspektrum

Die lytische Aktivität der Bdellovibrionen ist auf gramnegative Bakterien beschränkt. Hierbei weisen die individuellen Stämme Unterschiede im Wirtsspektrum auf - einige verfügen nur über ein begrenztes - andere über ein weites Spektrum an Wirten (STOLP u. STARR 1963). Die Mehrzahl der Bdellovibrionen zeichnet sich jedoch durch ein breites Wirtsspektrum aus (STOLP 1968), wobei insbesondere Pseudomonaden und Enterobakterien besonders anfällige Wirte darstellen (STARR u. SEIDLER 1971).

Zur Bestimmung des Wirtsspektrums sind in der Literatur drei Methoden aufgeführt: (i) die Plaquebildung auf einem Rasen geeigneter Wirte (STOLP u. STARR 1963), (ii) die Lyse von Wirtssuspensionen bei hohem Eintrag an Bdellovibrionen (SHILO u. BRUFF 1965) und (iii) die direkte Messung der Anheftung unter Zuhilfenahme der differentiellen Filtrationsmethode (VARON u. SHILO 1969a).

Tabelle 2: Charakteristika verschiedener Genera von Bakterien, die sich von anderen Mikroorganismen ernähren (nach Ruby 1991)

Genus	Bewegungsart	Metabolismus	Verbindungsart	Abhängigkeit	Referenz
<i>Bdellovibrio</i>	flagellar	obligat aerob	periplasmatisch	obligat (von gramnegativen Bakterien)	Rittenberg (1983)
<i>Mycococcus</i>	gleitend	obligat aerob	nicht angeheftet	axenisch	Burnham et al. (1981)
<i>Ensifer</i>	flagellar	obligat aerob	angeheftet	axenisch	Casida (1982)
<i>Daptobacter</i>	flagellar	fakultativ anaerob	zytoplasmatisch	axenisch	Alguero et al. (1987)
<i>Micavibrio</i>	flagellar	aerob	angeheftet	obligat (von <i>Pseudomonas</i>)	Lambina et al. (1982)
<i>Vampirovibrio</i>	flagellar	aerob	angeheftet	obligat (von <i>Chlorella</i>)	Mamkaeva et al. (1988)
<i>Vampirococcus</i>	keine	anaerob	angeheftet	unkultiviert (von <i>Chromatium</i>)	Guerrero et al. (1986)

Das zuerst von STOLP und PETZOLD (1962) beschriebene *Bdellovibrio*-Isolat (*B.* 321) war - von einer Ausnahme abgesehen - in seiner lytischen Aktivität auf *Pseudomonas*- und *Xanthomonas*-Kulturen beschränkt. Die lysierten Pseudomonaden gehörten in den Formkreis der fluoreszierenden *Pseudomonas*-Spezies, wobei es auch Vertreter dieses Bakterientyps gab, die nicht lysiert wurden. Auffallend an den Untersuchungsergebnissen von Stolp und Petzold ist jedoch, dass verschiedene, dem gleichen Genus bzw. sogar der gleichen Spezies angehörende Stämme in ihrer Lysierbarkeit schwankten. So wurden z.B. *Ps. fluorescens*-Stämme schwach bzw. nicht lysiert und *Ps. lachrymans*-Stämme komplett oder nicht lysiert. Ähnliche Beobachtungen wurden von TORRELLA et al. (1978) für unterschiedliche *Aeromonas hydrophila*-Stämme beschrieben. Des weiteren stellten diese Wissenschaftler fest, dass verschiedene *Bdellovibrio*-Stämme z.T. das gleiche Wirtsspektrum lysierten, wobei jedoch Variationen in Größe, Morphologie oder Wachstumsrate der Plaques auftraten. Eine direkte Abhängigkeit der Zahl der Plaques im Verhältnis zum Titer der Impfsuspension der *Bdellovibrionen* vom Wirtstamm zeigten BURGER et al. (1968).

STOLP und STARR (1963) untersuchten anhand von 34 Stämmen verschiedener Spezies die Wirtsspektren von 11 weiteren *Bdellovibrio*-Stämmen. Auch diese unterschieden sich zwischen den einzelnen Stämmen. Grampositive Bakterien konnten von keinem der *Bdellovibrio*-Isolate lysiert werden. BURGER et al. (1968) berichten im Gegensatz hierzu über die Lyse von *Streptococcus faecalis* und *Lactobacillus plantarum* durch den von ihnen neu isolierten *Bdellovibrio* sp. Stamm W. Dieses Ergebnis ist jedoch einmalig in der Literatur und konnte von keiner weiteren Forschungsgruppe reproduziert werden (STARR u. SEIDLER 1971). Ansonsten lysierte Stamm W alle von BURGER et al. geprüften Enterobacteriaceen und Athiorhodaceen mit Ausnahme von *Pseudomonas* und *Spirillum serpens*, wohingegen STARR und SEIDLER (1971) die Lyse von *S. serpens* VHL beschrieben.

In der Literatur ist eine Vielzahl weiterer geeigneter Wirtsspezies aufgeführt - so z.B. *Azotobacter chroococcum* (SULLIVAN u. CASIDA 1968), *Rhizobium* spp. und *Agrobacterium tumefaciens* (PARKER u. GROVE 1970; JURKEVITCH et al. 2000), *Erwinia carotovora* und *Sinorhizobium meliloti* (JURKEVITCH et al. 2000), *Legionella* spp. (TOMOV et al. 1982) sowie für marine *Bdellovibrio*-Isolate *Beneckeia* spp.

(TAYLOR et al. 1974). Insbesondere bei der Isolierung ist in diesem Zusammenhang zu beachten, dass marine und terrestrische *Bdellovibrio*-Stämme sehr gut an ihre Umwelt angepasst sind, d.h. marine *Bdellovibrio*-Stämme parasitieren vorwiegend auf Wirtsbakterien marinen Ursprungs (TAYLOR et al. 1974), wohingegen terrestrische *Bdellovibrio*-Stämme terrestrische Wirte bevorzugen.

Bezüglich der Lysierbarkeit verschiedener *Salmonella*-Serovare bzw. Stämme eines Serovars durch *Bdellovibrio* gibt es nur sehr begrenzte Informationen - eine umfassende Untersuchung zu dieser Fragestellung existierte bislang nicht. SHILO und BRUFF (1995) belegten die Lyse von *S. Typhimurium*-, *S. Paratyphi*- sowie *S. Typhi*-Suspensionen durch *Bdellovibrio bacteriovorus* A3.12 und 109J, wobei auf diesen Wirtsbakterien keine Plaquebildung zu beobachten war. Dieses Ergebnis wird partiell durch die Untersuchungen von TORRELLA et al. (1978) bekräftigt, bei welchen 11 verschiedene *Bdellovibrio*-Stämme in der Lage waren, *S. Typhimurium* LT2 auf festem Nähragar zu lysieren, wohingegen dies im Falle von *Bdellovibrio bacteriovorus* A3.12 nicht zutraf. Im Zusammenhang mit der Frage nach der Lysierbarkeit verschiedener *Salmonella*-Stämme durch Bdellovibrionen sowie im Hinblick auf eine mögliche Nutzung der Prädatoren im Bereich der Lebensmittelindustrie ist die Arbeit von FRATAMICO und WHITING (1995) interessant, welche die Lysierbarkeit verschiedener Lebensmittel-assoziiierter pathogener Keime sowie Verderbniserreger durch *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J untersucht. Unter anderem testeten die Autoren auch zehn *Salmonella*-Stämme, welche den Serovaren *S. Arizonae*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Senftenberg*, *S. Poona* und *S. Typhimurium* angehörten. Aus ihren Ergebnissen schlossen sie, dass nur bestimmte Serotypen der Genera *Escherichia* und *Salmonella* geeignete Wirte darstellen. Darüber hinaus wurden verschiedene *Salmonella*-Stämme von VARON und SHILO (1969a) sowie SCHELLING und CONTI (1986) zur Bestimmung der Kinetik der Anheftung der Bdellovibrionen an die Wirtszellen genutzt ohne hierbei einen möglichen Eintritt der Lyse dieser zu untersuchen.

2.1.6 Bakteriophagen der Bdellovibrionen

Wie auch bei anderen Bakterien existieren für *Bdellovibrio* spezifische Bakteriophagen, welche auch als Bdellophagen bezeichnet werden. HASHIMOTO et al. (1970) isolierten den ersten bekannten *Bdellovibrio*-spezifischen Bakteriophagen HDC-1. Diesem Nachweis folgten weitere - so gelang es u.a. ALTHAUSER et al. (1972) zehn weitere sowie VARON und LEVISOHN (1972) zwei zusätzliche Phagenstämme zu isolieren. Erst vor Kurzem erfolgte die Beschreibung eines neuen Bdellophagen (BRENTLINGER et al. 2002). Vorteilhaft bei der Isolierung ist die Tatsache, dass hierfür axenisch wachsende *Bdellovibrio*-Stämme genutzt werden können. Solche Bdellophagen sind beim Vorhandensein von geeigneten *Bdellovibrio*-Wirten auch in der Lage, sich in Bdellovibrionen des Wildtyps zu vermehren (RUBY 1991). Dabei heften sie sich an, kurz bevor *Bdellovibrio* seinen Wirt penetriert. Für die Synthese ihrer Proteine nutzen die Bdellophagen DNS-Präkursor der Bdellovibrionen und des *Bdellovibrio*-Wirtes. Einzelne Bdellophagen wurden bereits näher untersucht. So besitzt HDC-1 eine hexagonale Form, ist 60-70 nm groß und verfügt über Einzelstrang-DNA sowie zwei unterschiedliche Kapsomere (HASHIMOTO et al. 1970).

Der von ALTHAUSER et al. (1972) isolierte Phage MAC-1 infiziert spezifisch *Bdellovibrio bacteriovorus* (ROBERTS et al. 1987). Seine Nukleinsäuren sind gegen Hydrolyse unter alkalischen Bedingungen und gegen den Abbau durch RNase resistent. Sie lassen sich jedoch durch DNase hydrolysieren (ROBERTS et al. 1987). Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass das Phagengenom aus DNA aufgebaut ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MAC-1 eine isometrische Form aufweist und dass seine Einzelstrang-DNA zirkulär angeordnet ist (ROBERTS et al. 1987).

Auch bei dem Phagen ϕ MH2K handelt es sich um einen Einzelstrang-DNA-Phagen. ϕ MH2K weist zudem im Hinblick auf die Organisation seines Genoms und auf seine codierten Proteine eine sehr enge Verwandtschaft zu den *Microviridae* der Chlamydien auf (BRENTLINGER et al. 2002).

2.1.7 Vorkommen der Bdellovibrionen

Das Vorkommen der Bdellovibrionen in der natürlichen Umwelt ist breit gefächert. Aus der Quelle der Erstisolierung von *Bdellovibrio*, dem Boden, konnte eine Vielzahl von Wissenschaftlern erfolgreich weitere Stämme isolieren (STOLP u. STARR 1963; KLEIN u. CASIDA 1967; PARKER u. GROVE 1970; GERMIDA 1987; JURKEVITCH et al. 2000). Weitere Habitate stellen das Abwasser (STAPLES u. FRY 1973; LAMBINA et al. 1981; FILIP et al. 1991), Wasser aus Flüssen und Seen (FRY u. STAPLES 1974; LAMBINA et al. 1987), Wasserleitungen (RICHARDSON 1990) sowie Meer- bzw. Mündungswasser (TAYLOR et al. 1974; MARBACH et al. 1976; WILLIAMS et al. 1980; WILLIAMS et al. 1995b; RICE et al. 1998) dar. Neben diesen häufig genannten Fundorten ist es jedoch auch gelungen, Bdellovibrionen aus dem Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier zu isolieren. So ist das Vorkommen dieser Prädatoren im Magen-Darm-Trakt von Pferden, Rindern und Schweinen (IBRAHIMOV 1977; EDAO 2000; SCHWUDKE et al. 2001) sowie Enten (IBRAHIMOV 1977), Damwild und Hühnern (EDAO 2000) beschrieben. Das Vorkommen im Intestinum des Menschen zeigten HU und LIU (1990) sowie EDAO (2000) und SCHWUDKE et al. (2001).

Über die im Zusammenhang mit dem Vorkommen von Bdellovibrionen bedeutende Beschaffenheit der Umweltfaktoren ist jedoch - abgesehen von der deutlichen Abhängigkeit von geeigneten Wirtsbakterien und Sauerstoff (VARON u. SHILO 1968; FRY u. STAPLES 1976) - nur wenig bekannt. Erste Ansätze einer Klärung bieten im Hinblick auf marine *Bdellovibrio*-Isolate die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um H. N. Williams. Diese Wissenschaftler zeigten, dass die Zahl der Bdellovibrionen im Bereich von Flußmündungen im Vergleich zu offener See höher ist (WILLIAMS et al. 1980). Weiterhin wiesen sie für *Bdellovibrio* eine saisonale Populationsdynamik nach (WILLIAMS et al. 1982), wobei die Zahl der Parasiten positiv mit der Wassertemperatur und negativ mit dem Salzgehalt des Wassers und der Zahl der CFU korrelierte (WILLIAMS 1988). Die negative Korrelation mit der Anzahl koloniebildender Bakterien steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von FRY und STAPLES (1976). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der Einfluß der Bdellovibrionen auf die Populationsdynamik geeigneter gramnegativer Keime sein (WILLIAMS 1988). In der Zahl der Prädatoren bestehen zwischen oberflächlich und

aus der Tiefe entnommenem Wasser signifikante Unterschiede. So ist in Proben aus oberflächlichem Wasser eine größere Zahl Bdellovibrionen isolierbar. Weiterhin befinden sich mehr Prädatoren im Sediment als in der Wassersäule (WILLIAMS 1988).

Am interessantesten ist im Bezug auf diese Untersuchungen jedoch die Erkenntnis, dass die Parasiten eine enge Verbindung mit Oberflächen eingehen (WILLIAMS et al. 1995a). So scheinen Bdellovibrionen oberflächenassoziierte Organismen zu sein, deren höchste Zahl aus Biofilmen isolierbar ist (WILLIAMS et al. 1995b; RICE et al. 1998). Diese Biofilme dienen den Prädatoren als Schutz bei geringen Temperaturen, bieten ein nährstoffreicheres Ökosystem und sind vermutlich der Ort der Überwinterung der Bdellovibrionen (WILLIAMS et al. 1995b). Die Anziehung der Parasiten durch Oberflächen scheint dabei nicht auf marine Vertreter beschränkt zu sein (KELLEY et al. 1997).

Bdellovibrio ist gut an seine Umwelt adaptiert. Dies zeigt sich beispielsweise an dem Salzbedürfnis mariner Isolate sowie in der für diese beschriebenen besseren Eignung mariner Wirtsbakterien als terrestrischer (TAYLOR et al. 1974). Des weiteren erwiesen sich bei der Untersuchung auf Eignung von Bakterien aus Mündungs- und Flußwasser als Wirte für autochthone Bdellovibrionen 73-85% der gramnegativen Keime als geeignet (RICE et al. 1998). Einen Hinweis auf die Anpassung der Bdellovibrionen an ihre Umwelt liefern zudem JURKEVITCH et al. (2000). Sie isolierten aus Boden und Rhizosphären zwei *Bdellovibrio*-Subpopulationen, die zwar nebeneinander koexistierten, sich jedoch deutlich voneinander unterschieden.

Im Vergleich zu anderen Bakterien ist die Zahl der Bdellovibrionen in ihrer natürlichen Umgebung verhältnismäßig gering (STOLP 1981). Die quantitative Bestimmung der Bdellovibrionen wird jedoch erheblich durch die Isolationstechnik beeinträchtigt (STOLP u. STARR 1963) und dürfte demzufolge oft zu gering ausfallen. In der Literatur finden sich beispielsweise Angaben von 3×10^2 bis 6×10^3 und $2,8 \times 10^2$ bis $2,3 \times 10^4$ PFU g^{-1} Boden bzw. Rhizosphären (JURKEVITCH et al. 2000). Den höchsten beschriebenen Werten nach kann man bis zu 10^5 Bdellovibrionen je g Boden (KLEIN u. CASIDA 1967), bis 7×10^4 pro ml Abwasser (KLEIN u. CASIDA 1967) und in einem Liter Meerwasser aus dem Küstenbereich bis 194 Bdellovibrionen (TAYLOR et al. 1974) finden.

Eine Vielzahl von Autoren vermutet, dass die Parasiten eine regulative Funktion auf das mikrobielle Gleichgewicht der verschiedenen Lebensräume besitzen (SHILO u. BRUFF 1965; STRALEY u. CONTI 1977; WILLIAMS et al. 1995b). Die gleiche Schlußfolgerung zieht EDAO (2000) für die Homöostase im Magen-Darm-Trakt von Mensch und Tier. Darüber hinaus gelang es LAMBINA et al. (1981) eine Beteiligung der Bdellovibrionen an der Selbstreinigung von Abwässern nachzuweisen.

Wichtig für die Etablierung und den Erhalt einer *Bdellovibrio*-Population ist die Zahl der Wirte in dem entsprechenden Habitat. So stellten VARON und ZEIGLER (1978) ein Modell auf, nach dem für das Überleben der Parasiten 10^6 und für das Wachstum 10^7 Wirte je ml benötigt werden. Demgegenüber errechneten HESPELL et al. (1974) eine 50%ige Überlebenschance der Bdellovibrionen beim Vorliegen von $1,5 \times 10^5$ Wirtszellen. Unter konstanten Bedingungen im Chemostat können die Prädatoren jedoch auch bei einer Wirtszahl von $2-5 \times 10^4$ überleben (VARON et al. 1984).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit scheint die bisher einzige Untersuchung über die Isolierung von Bdellovibrionen aus Lebensmitteln von Interesse. Bei dieser Untersuchung, welche sich auf die Oberflächen von frischen Früchten und Gemüse konzentrierte, war es jedoch nicht möglich, einen *Bdellovibrio*-Nachweis zu erbringen (NEAL u. BANWART 1977). Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist allerdings zweifelhaft. So arbeiteten die Autoren mit für die *Bdellovibrio*-Isolierung unüblichem Peptonwasser, führten eine Filtration der Abspülflüssigkeit durch, was den Verlust eines Teils der Prädatoren zur Folge hat, und versäumten es, diesem Schritt ein Anreicherungsverfahren anzuschließen.

2.1.8 Entwicklungszyklus

Bdellovibrio zeichnet sich durch die Fähigkeit des Wachstums im periplasmatischen Raum anderer gramnegativer Bakterien aus. Diese Eigenschaft hat zu einem Entwicklungszyklus geführt, der zwischen zwei morphologisch und physiologisch unterschiedlichen Zelltypen wechselt. Obwohl die bisher aus natürlichen Habitaten isolierten Bdellovibrionen sich stets durch ihre obligate Wirtsabhängigkeit (H-D) auszeichnen, ist es möglich, zumindest bestimmte *Bdellovibrio*-Stämme durch den

Zusatz von Wirtszellextrakten zum Wachstum und zur Vermehrung zu bringen (REINER u. SHILO 1969; FRIEDBERG 1978; GRAY u. RUBY 1989). Weiterhin kann ein axenisches Wachstum wirtsabhängiger *Bdellovibrionen* auf einem speziellen Nährboden auch durch die Einwirkung von Temperaturen zwischen 42 und 48°C bei unterschiedlicher Dauer induziert werden (GORDON et al. 1993). Darüber hinaus ist es möglich, einzelne wirtsunabhängige Stämme (H-I) zu selektieren, welche auch auf einfachen Nährmedien wachsen (SEIDLER u. STARR 1969b; DIEDRICH et al. 1970).

Die Abbildung 1 faßt die Möglichkeiten der Entwicklung der *Bdellovibrio*-Stämme zusammen.

Eine Besonderheit stellt *Bdellovibrio* sp. Stamm W dar. Dieser ist in der Lage, neben dem bereits beschriebenen Wechsel zwischen Angriffs- und Wachstumsphase zusätzlich in eine encystierte Dauerform, den sogenannten *Bdellocysten*, überzugehen (BURGER et al. 1968; HOENIGER et al. 1972). Unter ungünstigen Bedingungen seiner Umwelt, wie insbesondere bevorstehendem „Hunger“ (TUDOR u. CONTI 1977a), bildet der Stamm W innerhalb der penetrierten Wirtszelle eine vielschichtige Cyste, welche sich durch ihre ausgeprägte Resistenz, z.B. gegen gesteigerte Temperaturen und Austrocknung, auszeichnet und die in der Lage ist, sich unter günstigen Umständen wieder in Angriffsphase-Zellen zu differenzieren (TUDOR u. CONTI 1977b und 1978). Somit ist es *Bdellovibrio* sp. Stamm W möglich, über einen ausgedehnten Zeitraum ohne Wirt lebensfähig zu bleiben (TUDOR u. CONTI 1977a).

2.1.8.1 *Bdellovibrio*-Wirt-Interaktionen wirtsabhängiger Stämme

Im Unterschied zu Bakteriophagen können sich *Bdellovibrionen* an Wirtszellen in allen Phasen des Wachstums anheften, diese penetrieren und sich in ihnen vermehren (STOLP u. STARR 1963). Die Dauer des intrazellulären Zyklus scheint sowohl vom einzelnen *Bdellovibrio*- wie auch Wirtszell-Stamm abzuhängen und stark vom vorangegangenen Wachstum wie auch den Inkubationsbedingungen beeinflusst zu werden (SHILO 1969). So finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben über die Dauer eines Zyklus, welche von 1 h (SCHERFF et al. 1966) über

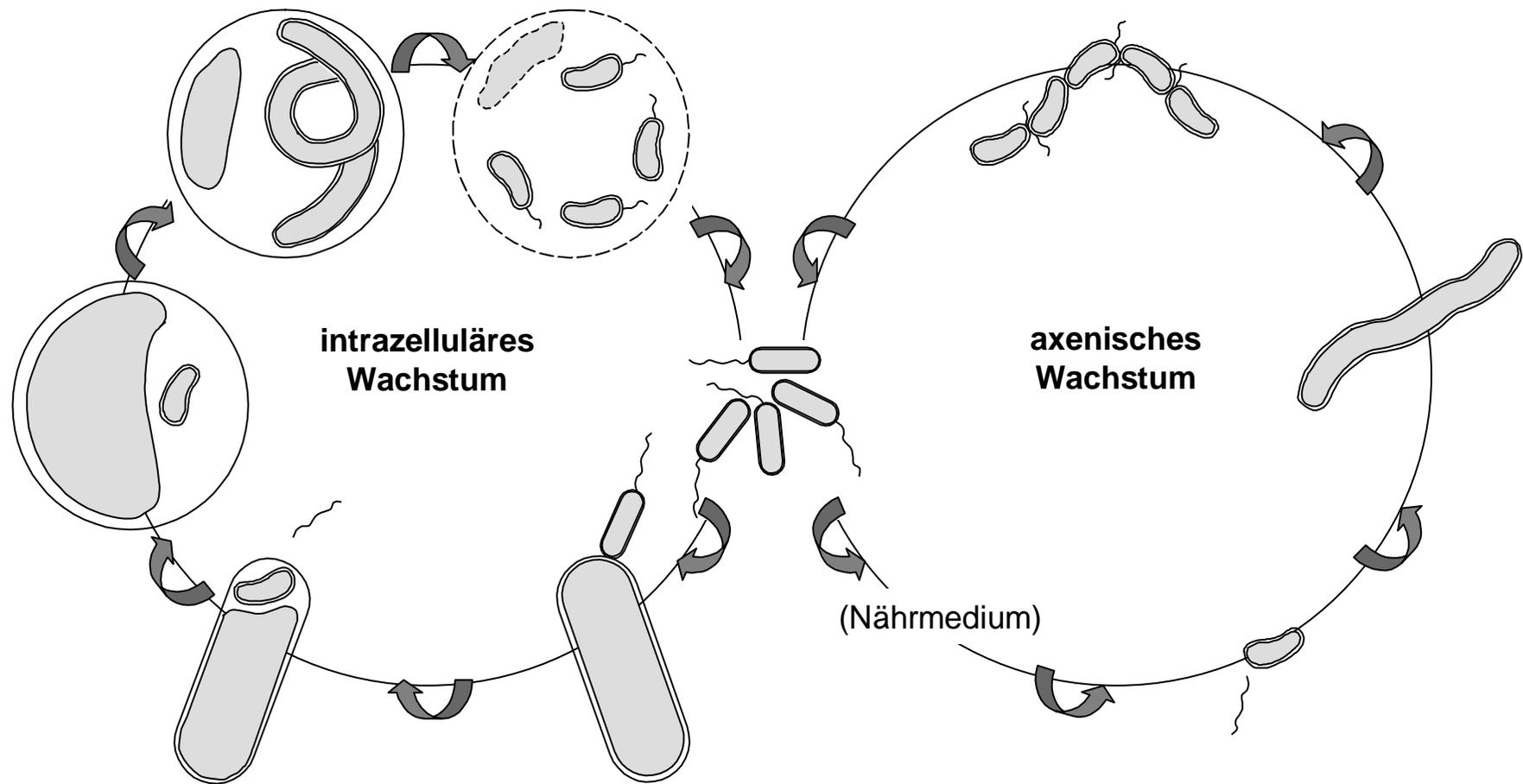


Abb. 1: Mögliche Wachstumsmuster der Bdellovibrionen anhand des Beispiels *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J (nach Ruby 1991)

2-6 h (BURGER et al. 1968; SEIDLER u. STARR 1969a) oder unter ungünstigen Bedingungen bis 24 h (STARR u. BAIGENT 1966) reichen.

Die verschiedenen Stufen der *Bdellovibrio*-Wirt-Interaktion können im Phasenkontrast-Mikroskop und mittels Elektronen-Mikroskopie verfolgt werden. Beim Vorliegen eines geeigneten Wirtes lassen sich folgende Stufen unterscheiden:

- (i) erster Kontakt und Anheftung
- (ii) Penetration
- (iii) intraperiplasmatisches Wachstum und Vermehrung der Bdellovibrionen
- (iv) Lyse des Bdelloplasten und Freisetzen der Nachkommen

2.1.8.1.1 Erster Kontakt und Anheftung

Werden bewegliche Bdellovibrionen und entsprechende Wirtsbakterien in geeigneten flüssigen Medien zusammengebracht, kollidieren einzelne Bdellovibrionen innerhalb von Sekunden heftig mit einzelnen Wirten (STOLP u. PETZOLD 1962; STARR u. BAIGENT 1966). Der Aufprall ist dabei häufig so stark, dass die Wirtszelle um mehrere Zellängen geschoben wird (STOLP u. STARR 1963). Bewegliche Bakterien stellen ihre Motilität wenige Sekunden nach dem Befall ein (STOLP 1968). Die Beweglichkeit der Bdellovibrionen ist eine wichtige Voraussetzung für die Anheftung (STOLP 1981). Der Angriff erfolgt stets mit dem der Geißel gegenüberliegenden Zellende (SCHERFF et al. 1966), welches filamentöse und ringähnliche Strukturen aufweist. Diese besitzen auf ihrer Oberfläche Lektine, die an Kohlenhydrat-Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche binden (CHEMERIS et al. 1984). Weitere Hinweise auf die Lokalisation möglicher beteiligter Rezeptoren liefert die Arbeit von SCHELLING und CONTI (1986). Diese schlossen aus ihren Ergebnissen, dass es für *Bdellovibrio bacteriovorus* 109D eine im LPS des Wirtes lokalisierte Rezeptoraktivität geben muß. Da sich diese jedoch für *Bdellovibrio stolpii* nicht im Wirts-LPS befand, scheint deren Lokalisation zwischen den einzelnen *Bdellovibrio*-Spezies zu differieren. Weiterhin folgerten die Autoren, dass die Erkennung dieser Rezeptoraktivität mit der Stufe der irreversiblen Anheftung an die Wirtszelle

verbunden sein muß.

In der Vergangenheit wurde oftmals über eine mögliche Rolle von Chemotaxis bei der Auffindung des Wirtes spekuliert (STOLP u. PETZOLD 1962; STARR u. SEIDLER 1971; STRALEY u. CONTI 1974). Diese Annahme schien sich anfangs zu bestätigen. So wurden Bdellovibrionen beispielsweise durch L-Asparagin, L-Cystein, L-Glutamin, Glycin, L-Histidin, L-Lysin, L-Threonin (LAMARRE et al. 1977), Hefeextrakt (STRALEY u. CONTI 1974) und Malonat (STRALEY et al. 1979) angezogen. Direkte Tests in Bezug auf Chemotaxis zeigten jedoch, dass Bdellovibrionen keinen Gebrauch von Chemotaxis zur Lokalisation der Wirte machen und daher vermutlich durch zufälliges Umherschwimmen auf ihre Wirte treffen (STRALEY u. CONTI 1977; STRALEY et al. 1979; VARON et al. 1984; KOVAL u. BAYER 1997).

Neben der zu dem komplexen Reproduktionszyklus führenden Infektion von Bakterienzellen mit einem einzelnen oder einigen wenigen Bdellovibrionen (SCHERFF et al. 1966; STARR u. BAIGENT 1966) kann es auch zur multiplen Anheftung kommen. Diese führt beim Vorliegen eines im Vergleich zur Zahl der Wirtszellen Vielfachen an Bdellovibrionen zu einer rapiden Auflösung des Wirtes bzw. zu einem drastischen Abfall der Wirtszellpopulation und ähnelt der von Bakteriophagen-Infektionen bekannten Lyse „from without“ (SHILO 1969). Bei dieser Form der Parasit-Wirt-Interaktion wird kein intraperiplasmatischer Reproduktionszyklus durchlaufen (SHILO 1969). Demzufolge findet auch keine Vermehrung der Bdellovibrionen statt.

Die Kinetik der Anheftung und die endgültige Zahl der angehefteten Bdellovibrionen sind von der Überzahl des Parasiten dem Wirt gegenüber, der Zusammensetzung und dem pH-Wert des Mediums sowie der Inkubationstemperatur abhängig (VARON u. SHILO 1968). Hierbei ist zu bemerken, dass die Anheftung der Bdellovibrionen anfangs noch reversibel ist. So kann ein bereits an einer Wirtszelle haftender *Bdellovibrio* sich von dieser lösen und eine andere Bakterienzelle befallen (STOLP u. STARR 1963; STARR u. BAIGENT 1966). Weiterhin wird berichtet, dass sich einzelne Bdellovibrionen an grampositive - also als Wirte ungeeignete - *Bacillus megaterium*-Zellen hefteten (SHILO 1969), wohingegen andere Autoren bei

ähnlichen Versuchen nicht zu diesem Ergebnis gelangten (STOLP u. STARR 1963; SHILO u. BRUFF 1965).

Die Vitalität des Wirtes stellt keine unbedingte Voraussetzung für die Anheftung der *Bdellovibrionen* dar. So kann in mittels UV-Strahlung (VARON u. SHILO 1968) oder Hitze inaktivierten *E. coli* der komplette intrazelluläre Zyklus ablaufen (VARON u. SHILO 1969b). Die Anheftungsrate wird im Gegensatz zur UV-Strahlung durch Hitze jedoch stark reduziert (VARON u. SHILO 1968). Auch in den Untersuchungen von BURGER et al. (1968) waren bestimmte *Bdellovibrion*-Stämme in der Lage, durch eine Temperatureinwirkung von 80°C hitzeinaktivierte *Rhodospirillum rubrum*-Zellen bei allerdings sehr geringer Plaquebildungseffizienz zu lysieren.

VARON und SHILO (1969a) wiesen nach, dass *Bdellovibrionen* in der Lage sind, an Mutanten von *E. coli* und *Salmonella* spp. anzuheften, die sich in ihrer chemischen Zusammensetzung der Zellwände unterscheiden. Hierbei bestanden geringfügige Unterschiede in der Anheftungskinetik. In der Eignung von S- und R-Formen von *E. coli* konnten KLEIN und CASIDA (1967) keine Unterschiede feststellen.

Die Bildung von Kapseln bei *E. coli* zeigt - im Gegensatz zu Bakteriophagen - gegen *Bdellovibrion* keine protektive Wirkung (KOVAL u. BAYER 1997). Als Schutz dienen jedoch, vermutlich durch ein Unvermögen der Anheftung, sogenannte S-Layer, sofern sie das Bakterium vollständig umgeben (KOVAL u. HYNES 1991).

SEIDLER und STARR (1969a) beobachteten in Medien ohne Mg²⁺- und Ca²⁺-Zusatz eine Reduktion der Anheftung der *Bdellovibrionen*. Bei pH-Werten unter 5 ist keine Anheftung zu verzeichnen (VARON u. SHILO 1968). Unter solchen Bedingungen ist auch ein Verlust der Beweglichkeit der Prädatoren festzustellen.

2.1.8.1.2 Penetration

Der angeheftete *Bdellovibrion* beginnt nun mit seiner Penetration in das Innere der Wirtszelle, indem er sich eine Öffnung in der Zellwand der Wirtszelle schafft. Obwohl auch mechanische Kräfte an der Bildung dieser Eintrittspforte beteiligt sein können, wird den enzymatischen Kräften eine signifikante Rolle in diesem Prozeß zugesprochen (TUDOR et al. 1990).

Als mechanische Kräfte sind der heftige Aufprall der *Bdellovibrionen* auf die

Wirtszelle sowie die kurz nach der Anheftung einsetzende Rotation, welche mit bis zu 100 Umdrehungen pro Sekunde angegeben wird (STOLP 1967), der Parasiten um ihre Längsachse zu nennen. Die Bedeutung des Aufpralls auf die Wirtszelle für die Bildung der Öffnung wird zum Teil besonders hervorgehoben (STOLP 1968). Im Hinblick auf die Tatsache, dass eine Infektion von Wirtsbakterien auch in halbfesten Nährböden stattfindet, was eine Reduktion der Geschwindigkeit der *Bdellovibrionen* wie auch eine daraus resultierende Reduktion der Aufschlagskraft zur Folge hat, kann der Aufprall keine absolute Voraussetzung für die Penetration darstellen (SHILO 1969; ABRAM et al. 1974) bzw. ist als bedeutungslos anzusehen (BURGER et al. 1968). Mittels Inhibitoren der Proteinsynthese, wie z.B. Streptomycin oder Chloramphenicol, kann die Penetration des Parasiten in die Wirtszelle, jedoch nicht die Anheftung an diese verhindert werden (VARON u. SHILO 1968), was die Notwendigkeit der enzymatischen Wirkung im Penetrationsprozeß unterstreicht.

Als Erklärung für die enzymatische Wirkung am Prozeß der Bildung der Öffnung existieren zwei Modelle. Das erste Modell geht auf THOMASHOW und RITTENBERG (1978b) zurück und wird als Glycanase-abhängiges Modell bezeichnet (siehe Abb. 2). Wie dem Namen zu entnehmen ist, stellt die Glycanase hierbei die absolute Voraussetzung für die Penetration dar. Den Vorstellungen von THOMASHOW und RITTENBERG (1978b) zufolge führt die Aktivität der Glycanase nach der Anheftung (A) im Rahmen der Penetration (B) zur Bildung einer „Pore“ im Peptidoglycansack der Wirtszelle, wodurch es *Bdellovibrio* möglich wird, in die Substratzelle einzudringen. Die Abrundung und das Wachstum der Wirtszelle (C) wird daraufhin durch die diffuse Aktivität der Peptidase vermittelt, welche in ihrer Wirkung eine Reduktion der Bindungen im Peptidoglycan zur Folge hat. Das Ergebnis dieser Peptidase-Aktivität besteht in der Bildung des typischen Sphäroplasten sowie dessen weiterem Wachstum.

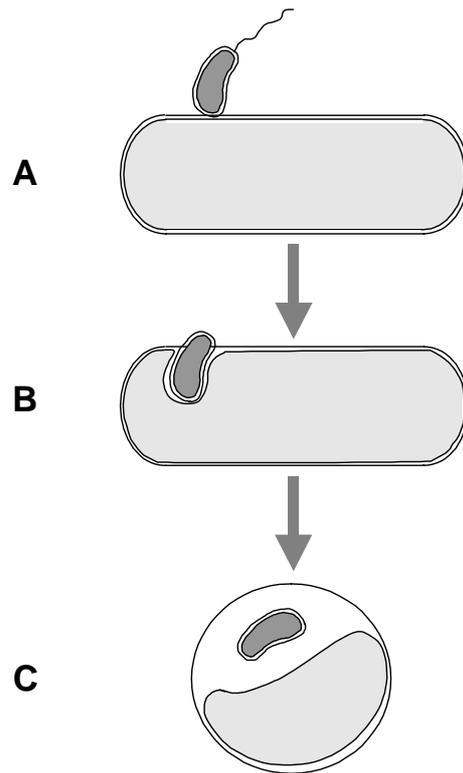


Abb. 2: Glycanase-abhängiges Modell für die Penetration des Wirtszell-Peptidoglycans durch die Bdellovibrionen (nach THOMASHOW u. RITTENBERG 1978b)

Den Untersuchungsergebnissen von TUDOR et al. (1990) zufolge ist jedoch nicht die Glycanase sondern die Peptidase das kritische Enzym im Prozeß der Penetration. Sie entwarfen daher ein Glycanase-unabhängiges Modell für die Penetration des Wirtszell-Peptidoglycans durch die Bdellovibrionen (siehe Abb. 3). In diesem Modell beginnt die Peptidaseaktivität nach der irreversiblen Anheftung (A) und bricht die Bindungen der Peptidoglycanschichten auf. Daraufhin dehnt der *Bdellovibrio*, während er in den periplasmatischen Spalt penetriert (B), die Glycan-Polymere auseinander. Im Falle von *B. bacteriovorus* 109J reduziert die Glycanase-Aktivität die Starre des Peptidoglycans, was zu einer Abrundung der Wirtszelle (C) führt. Durch Deacetylierungen kommt es zur Modifikation des Peptidoglycans, wodurch die Glycanase in ihrer Wirkung gestoppt wird. Ähnliche Vermutungen wurden auch von THOMASHOW und RITTENBERG (1978b) geäußert. Die Umwandlung der Wirtszelle in solche kugeligen Körper, welche im Zusammenhang mit dem darin befindlichen Prädator auch als Bdelloplasten bezeichnet werden, wird in Verbindung

mit der Penetration bei fast allen *Bdellovibrio*-Stämmen beobachtet (STOLP 1981). Die einzige Ausnahme bildet *B. bacteriovorus* sp. Stamm W (TUDOR et al. 1990). Das abweichende Verhalten läßt sich mit einer fehlenden Glycanase-Aktivität erklären. Es findet keine Peptidoglycanmodifikation statt, weshalb eine Deacetylierung nicht als Ausschlußmechanismus für weitere *Bdellovibrio*-Penetrationen dient. Sowohl bei *B. bacteriovorus* 109J als auch bei Stamm W führt die anhaltende Peptidase-Aktivität zu einer Ausdehnung des Bdelloplasten.

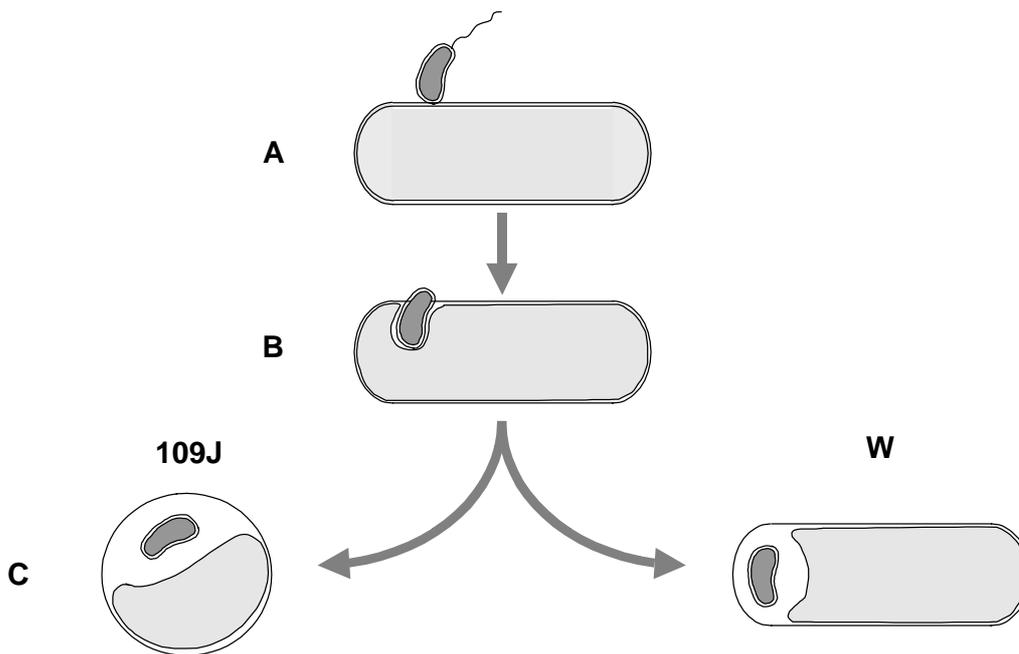


Abb. 3: Glycanase-unabhängiges Modell für die Penetration des Wirtszell-Peptidoglycans durch die Bdellovibrionen (nach TUDOR et al. 1990)

Denkbar ist die Freisetzung von Glycanase und die folgende Rundung des Wirtes auch als Konsequenz der Aktivierung von Wirtszellautolysinen nach dem Abtöten der Zelle. Die Deacetylierung wäre dann kein Ausschlussmechanismus, sondern ein Schutzmechanismus, um die autolytische Aktivität zu begrenzen und somit ein vorzeitiges Lysieren des Bdelloplasten zu verhindern (TUDOR et al. 1990).

Die Penetration des Parasiten kann mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen verfolgt werden. Beim Durchtritt durch die Öffnung in der Wirtszellwand wird er stark

eingeschnürt (BURNHAM et al. 1968). Während *Bdellovibrio* durch die Zellwand tritt, schiebt er die zytoplasmatische Membran der Wirtszelle vor sich her. Der Parasit verliert im Laufe der Penetration seine Geißel (STOLP u. STARR 1963; SHILO 1969).

Der gesamte Durchtritt durch die Zellwand dauert vom Zeitpunkt der Anheftung an gerechnet etwa 5-20 min (STOLP 1967). Danach schließt sich die Penetrationsöffnung wieder (COVER et al. 1984), und es bleibt eine Narbe an der Durchtrittsstelle zurück (SHILO 1969; SNELLEN u. STARR 1974).

2.1.8.1.3 Intraperiplasmatisches Wachstum und Vermehrung

Durch das Auseinanderweichen von Wirtszellwand und zytoplasmatischer Membran kommt *Bdellovibrio* schließlich zwischen diesen beiden, im periplasmatischen Spalt, zu liegen (SCHERFF et al. 1966; BURNHAM et al. 1968). Der eingewanderte Parasit entwickelt sich nun zu einem spiralförmigen Gebilde und wächst dabei um ein 5- bis 10Faches seiner Ausgangsgröße (STARR u. BAIGENT 1966; BURNHAM et al. 1970; STOLP 1973), bis er zuletzt die Wirtszelle vollständig ausfüllt. Dabei verursacht er den Abbau und das schrittweise Verschwinden des Wirtsprotoplasten (SCHERFF et al. 1966).

Es wird angenommen, dass das *Bdellovibrio*-Filament sein Wachstum so lange fortsetzt, bis der Nährstoffvorrat aus der Wirtszelle erschöpft ist. Die Differenzierung in Angriffsphase-Zellen wird somit als Antwort auf die Hungerbedingungen initiiert (GRAY u. RUBY 1990). Weiterhin deuten die Ergebnisse dieser Wissenschaftler darauf hin, dass zusätzliche, vom Wirt stammende, regulative Faktoren an einem Fortfahren oder Ende des Wachstums des Filamentes beteiligt sind. So erkennen in der Wachstumsphase befindliche *Bdellovibrionen* ein spezifisches regulatorisches Signal in Wirtszellextrakten, welches die Dauer der filamentösen Elongation fördert. Dieses Signal ist aus löslichen proteinähnlichen Komponenten aufgebaut, die offensichtlich bei einer Vielzahl von Bakterien vorkommen und sogar in grampositiven Keimen nachgewiesen werden konnten (GRAY u. RUBY 1990). Auch andere Autoren berichten über die wachstumsfördernden Eigenschaften von Wirtszellextrakten (ISHIGURO 1973; HOROWITZ et al. 1974). Der in den

Wirtszellextrakten enthaltene Faktor ist hitzestabil (SHILO u. BRUFF 1965), nicht dialysierbar (ISHIGURO 1973), stabil gegen DNase sowie sensitiv gegenüber RNase und Pronase (HOROWITZ et al. 1974). RUBY und RITTENBERG (1983) schließlich folgerten aus ihren Untersuchungen neben der Notwendigkeit eines Initiierungssignals für die Fähigkeit der Wachstumsphase-Zellen, DNA zu synthetisieren, auch für jede folgende DNA-Replikation das Vorhandensein eines Signals.

Untersuchungen mit axenischen *Bdellovibrio*-Isolaten ergaben zeitgleich mit der Zellverlängerung eine Mengenzunahme an DNA und Protein (EKSZTEJN u. VARON 1977). Auch HOROWITZ et al. (1974) beschreiben eine Korrelation zwischen den morphologischen Veränderungen und der DNA-Synthese der *Bdellovibrionen*. Hierbei ist festzustellen, dass die relativen Raten der DNA- und Proteinsynthese während des Wachstums unausgeglichen sind, wobei die zelluläre Konzentration der DNA schneller als die des Proteins steigt (EKSZTEJN u. VARON 1977; GRAY u. RUBY 1989). Durch die dem Ende der DNA-Replikation folgende, während der Septierungsperiode weiter andauernde Proteinsynthese wird das den Angriffsphase-*Bdellovibrionen* typische DNA:Protein-Verhältnis in der Nachkommenschaft wiederhergestellt (GRAY u. RUBY 1989). Für Wildtyp-*Bdellovibrionen* ist von ähnlichen Ergebnissen auszugehen (GRAY u. RUBY 1989).

Mittlerweile ist es gelungen, erste Hinweise auf die Merkmalausbildung einzelner Genabschnitte zu erhalten. So konnte eine genetische Lokalisation, welche als *hit* („host interaction“) bezeichnet wird (COTTER u. THOMASHOW 1992b), in Verbindung mit der Umwandlung von Angriff- zu Wachstumsphase-*Bdellovibrionen* gebracht werden. Durch das *hit* ORF2 wird ein 10.6-kDa großes hydrophiles Polypeptid codiert, welches für die Produktion großer, klarer Plaques verantwortlich sein soll. Dieses Polypeptid, das wahrscheinlich Signalsequenzen besitzt, könnte eine strukturelle Funktion oder eine enzymatische Aktivität für die Invasion des Wirtes aufweisen (THOMASHOW u. COTTER 1992b).

Stellvertretend für die *Bdellovibrionen* konnte anhand von *B. bacteriovorus* 109J gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, ihre Genexpression während des Entwicklungszyklus mittels eines komplexen Systems zu regulieren (McCANN et al. 1998).

Nachdem das Wachstum des *Bdellovibrio* abgeschlossen ist, bilden sich entlang des helikalen Filamentes an vielen Stellen Einschnürungen, an welchen es schließlich auseinanderbricht (SHILO 1969). Die Entwicklung der Tochterzellgeißeln wird noch vor der Teilung dieses Filamentes initiiert (BURNHAM et al. 1970).

Das Ausmaß des Wachstums der Bdellovibrionen und somit der Zahl der produzierten Nachkommen hängt von der Größe der Wirtszelle ab (KESSEL u. SHILO 1976). Je Wirtszelle kann die Zahl der so entstandenen Tochterzellen zwischen 6 und 30 schwanken (SCHERFF et al. 1966). Innerhalb der Wirtszellen, von denen nunmehr nur noch leere Hüllen vorhanden sind, weshalb sie auch als „ghosts“ bezeichnet werden, kann man die sich aktiv bewegenden Nachkommen sehen (BURGER et al. 1968).

2.1.8.1.4 Lyse des Bdelloplasten und Freisetzen der Nachkommen

Nachdem sich das helikale Filament an seinen Einschnürungen geteilt hat, kommt es zur Lyse des Bdelloplasten und somit zur Freisetzung der Nachkommen. Zurück bleibt die leere Hülle des Wirtes (SCHERFF et al. 1966; SHILO 1969).

Das Phänomen der Wirtszellyse wird durch von *Bdellovibrio* gebildete Enzyme vermittelt (FACKRELL u. ROBINSON 1973, SAIER 1994). Bereits während der vorangegangenen Wachstumsphase produzieren die Bdellovibrionen Protease (ROMO et al. 1992), wobei das Produktionsmaximum zum Zeitpunkt der Lyse erreicht wird (GLOOR et al. 1974). In ihren Untersuchungen wiesen RUBY und RITTENBERG (1984) eine Peptidase nach, welche spezifisch DAP (Diaminopimelinsäure) aus dem Peptidoglycantetrapeptid gramnegativer Bakterien löst. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Lyse des Bdelloplasten auch heute noch viele Fragen aufwirft. Es ist jedoch davon auszugehen, dass Proteasen und vermutlich auch eine Lipase an diesem Vorgang beteiligt sind (STARR u. SEIDLER 1971).

2.1.8.2 Wirtsunabhängige Mutanten

Aus Populationen wirtsabhängiger Bdellovibrionen können wirtsunabhängige

Mutanten selektiert werden, welche die Fähigkeit besitzen, ohne Zusatz von Wirtszellen auf bzw. in komplexen Nährmedien zu wachsen (STOLP u. STARR 1963; SEIDLER u. STARR 1969b). Um solche saprophytischen Mutanten selektieren zu können, benötigt man massive Inokula parasitischer Bdellovibrionen. Die Mutationsrate wird mit 10^{-6} bis 10^{-7} angegeben (SEIDLER u. STARR 1969b; ISHIGURO 1973; COTTER u. THOMASHOW 1992b). Aufgrund dieser Rate ist davon auszugehen, dass das Auftreten solcher saprophytischer Vertreter auf eine einzelne Mutation zurückzuführen ist (ISHIGURO 1973; BAREL u. JURKEVITCH 2001).

Die Morphologie der meisten H-I-Bdellovibrionen ähnelt stark den H-D-Elternstämmen (STOLP 1981). Abweichungen hiervon werden jedoch ebenso wie variierende Größen beobachtet. Auch im Hinblick auf die Begeißelung können sich solche Mutanten von dem elterlichen Wildtyp unterscheiden. So beschreiben STOLP und PETZOLD (1962) das Vorkommen von bis zu drei Geißeln, wobei diesbezüglich neben der Uni- auch Bipolarität zu verzeichnen war.

Das Wachstum und die Vermehrung der saprophytischen Mutanten entspricht prinzipiell dem für die wirtsabhängigen Bdellovibrionen beschriebenen Ablauf. Auch hier wachsen die Zellen zu helikalen Filamenten und zerfallen schließlich in einzelne Tochterzellen (STOLP 1973).

Die wirtsunabhängigen Mutanten zeichnen sich durch ihre aeroben Eigenschaften (STOLP u. STARR 1963), die Beweglichkeit sowie die positive Katalase- und Oxidase-Reaktion aus. Jedoch sind, wie bereits erwähnt, bei wiederholter wirtsfreier Passagierung auf festen Medien der Verlust der Beweglichkeit und variable Katalasereaktionen möglich (BAER et al. 2000). Des weiteren beschreiben mehrere Autoren bezüglich saprophytischer Stämme die Präferenz eines geringfügig reduzierten Sauerstoffdruckes (SEIDLER u. STARR 1969b; BAREL u. JURKEVITCH 2001). Darüber hinaus können wirtsunabhängige Mutanten einen - häufig gelben - Farbstoff bilden (BAREL u. JURKEVITCH 2001) und proteolytische Aktivität aufweisen (SEIDLER u. STARR 1969b). Sie sind nicht zum fermentativen Abbau von Zuckern, Alkoholen oder organischen Säuren befähigt (SEIDLER u. STARR 1969b). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass anfangs aus einer Population saprophytischer Bdellovibrionen die prädatorischen Eigenschaften des Wildtyps rückselektiert werden können (SEIDLER u. STARR 1969b). Es besteht jedoch die Tendenz, die lytische

Aktivität sowie die Beweglichkeit nach wiederholter Passagierung auf bakterienfreien Medien zu verlieren (STOLP u. STARR 1963).

2.1.9 Isolierung

Die Verfahren zum Nachweis der *Bdellovibrionen* sind eng an deren nutritive Ansprüche und Wachstumscharakteristika geknüpft. So hängt die Isolierung und Kultivierung des parasitischen Wildtyps aufgrund seiner obligat parasitischen Natur von der Präsenz geeigneter Wirtsbakterien ab (STOLP u. STARR 1963), während saprophytische *Bdellovibrio*-Stämme in komplexen Nährmedien gezüchtet werden können. Da es bis zum heutigen Tag jedoch noch nicht gelungen ist, saprophytische Mutanten aus natürlichen Habitaten zu isolieren, beziehen sich die folgenden Ausführungen auf die Isolationstechnik des parasitischen Wildtyps.

Bringt man eine Mischung aus *Bdellovibrio* und einem Überschuß an lebenden Wirten auf einer Agarplatte aus, so bilden sich einzelne Plaques bzw. konfluente Lysiszonen. Diese nehmen im Gegensatz zu den von Bakteriophagen erzeugten Lysiszonen bis ca. eine Woche an Größe zu (STOLP u. PETZOLD 1962). Die Plaques in den Bakterienrasen repräsentieren hierbei die einzelnen Kolonien der Parasiten (STOLP u. STARR 1963), deren Zahl als PFU (plaque forming units) angegeben wird. In einer Flüssigkultur mit *Bdellovibrio* und geeigneten Wirten ist die Manifestation der lytischen Aktivität der Parasiten an der Abnahme der optischen Dichte zu erkennen.

Da die Zahl der *Bdellovibrionen* in ihrer natürlichen Umgebung relativ gering ist, muß beim Ausbringen einer Probensuspension das Überwuchern der Parasiten durch andere Keime verhindert werden, da hierdurch die Entwicklung der Plaques beeinträchtigt wird. Zu diesem Zweck werden entsprechende Zentrifugations- und fraktionierte Filtrationsschritte vorgeschaltet (STOLP u. STARR 1963). In diesem Zusammenhang ist jedoch darauf hinzuweisen, dass insbesondere im Zuge der Filtrationsschritte eine Vielzahl der Parasiten verlorenght. So berichten TAYLOR et al. (1974) nach der Filtration von einer Wiederfindungsrate der *Bdellovibrionen* von lediglich 50-80%. Demzufolge wird die tatsächliche *Bdellovibrio*-Anzahl meist stark

unterschätzt.

In der Routinediagnostik der Bdellovibrionen hat sich die speziell für diesen Zweck modifizierte Doppelschichtagar-Methode (STOLP u. STARR 1963) durchgesetzt, welche in Anlehnung an die Methodik zum Nachweis von Bakteriophagen entwickelt wurde. Hierbei wird auf eine erste, untere Agarschicht eine zweite Schicht gegossen, welcher für den Nachweis der Bdellovibrionen geeignete Wirtsbakterien zugesetzt werden. Der Zusatz der Prädatoren erfolgt - je nach Verfahren - durch das Auftropfen einer *Bdellovibrio*-Suspension auf die Oberschicht bzw. vor dem Gießen der zweiten Agarschicht durch die Zugabe einer solchen Suspension in das Oberschichtgemisch. Nach entsprechender Bebrütung erscheinen beim Vorliegen von *Bdellovibrio* im Rasen der Wirtszellen sichtbare Lysiszonen.

Die Entwicklung der *Bdellovibrio*-Plaques wird durch hohe Wirtszellzahlen in Verbindung mit nährstoffarmen Medien begünstigt (STOLP u. STARR 1963). Diese verhindern ein starkes Wachstum der Wirtsbakterien, da anderenfalls die Plaquebildung durch deren Stoffwechselprodukte beeinträchtigt würde.

Divalente Kationen beeinflussen das Wachstum der Bdellovibrionen in hohem Maß. Um die Wachstumsbedingungen für die Prädatoren zu optimieren und demzufolge auch eine höhere Auffindungsrate zu realisieren, hat sich in der Diagnostik der Zusatz von Ca^{2+} und Mg^{2+} bewährt. HUANG und STARR (1973b) stellten für verschiedene *Bdellovibrio*-Stämme ein unterschiedliches Kalziumbedürfnis fest, welches wie folgt bestimmt wurde: 109J<100<109D<A3.12<6-5-S. Hierbei ist zu bemerken, dass der Stamm 6-5-S beim Fehlen von Kalzium und Magnesium jegliches Wachstum unterbindet (CROTHERS u. ROBINSON 1971). Die Ergebnisse von HUANG und STARR (1973b) werden durch andere Autoren bekräftigt. So beschreibt auch RITTENBERG (1972) eine optimale Anheftung des *Bdellovibrio*-Stammes 109J ohne den Zusatz von Ca^{2+} und Mg^{2+} , währenddessen der Stamm 109D ohne diese Kationen nur ein schlechtes Anheftungsvermögen aufweist.

Kalzium und Magnesium werden mit vielfältigen Funktionen in Verbindung gebracht. So werden sie für die Anheftung an die Wirtszelle, die Erhaltung des Sphäroplasten, die Reduktion der Latenzperiode, die Steigerung der „Average burst size“ (dem Quotienten aus dem *Bdellovibrio*-Titer am Ende des Anstiegs der *Bdellovibrio*-Zahl

und dem Durchschnittstiter dieser während der lag-Phase), die Katalyse lytischer Enzymaktivitäten sowie die Förderung der Entwicklung der Bdellovibrionen benötigt (SEIDLER u. STARR 1969a; HUANG u. STARR 1973b). Optimale Wachstumsbedingungen bieten eine Kalzium-Konzentration von 2×10^{-3} M und eine Magnesium-Konzentration von 2×10^{-5} M (HUANG u. STARR 1973b).

Weitere Einflußfaktoren auf die Aktivität der Bdellovibrionen stellen deren eigene physiologische Situation sowie die der Wirtszellen, die Inkubationstemperatur, der pH-Wert und die Konzentration des Oberschichtagars dar (VARON u. SHILO 1968; FRY u. STAPLES 1974). Der überwiegende Teil der Bdellovibrionen verfügt über ein Aktivitätsspektrum zwischen 20 und 40°C (VARON u. SHILO 1968), wobei das Optimum bei 30°C liegt (FRY u. STAPLES 1974). Es wurden aber auch psychrotrophe Bdellovibrionen isoliert, welche bei unter 10°C aktiv sind (FRATAMICO u. WHITING 1995). Darüber hinaus ist es offensichtlich einzelnen marinen Bdellovibrionen möglich, bei einer Temperatur von lediglich 4°C Oberflächen zu kolonisieren (KELLEY et al. 1997).

Bdellovibrionen sind in einem pH-Wert-Bereich von 6-9 aktiv (STARR u. SEIDLER 1971). Es existieren jedoch auch Angaben, die diesen Bereich weiter fassen, wobei in diesen Fällen kein optimales Wachstum mehr vorliegt. Eine optimale Entwicklung der Bdellovibrionen ist beim Vorliegen eines pH-Wertes von 7,6 gegeben. Daher findet dieser pH-Wert in der *Bdellovibrio*-Kultivierung Anwendung (THOMASHOW u. RITTENBERG 1978a).

Auch die Konzentration des Oberschichtagars beeinflusst die Entwicklung der Parasiten und demzufolge auch die Zahl der PFU. Die günstigste Agar-Konzentration scheint 0,5-0,6% zu sein (STAPLES u. FRY 1973), wobei ein Wachstum der Bdellovibrionen in einem Bereich von 0,2-1% stattfindet.

2.1.9.1 Metabolische Charakteristika des intrazellulären Wachstums

Das Wachstum der Bdellovibrionen und somit auch deren Stoffwechsel basiert auf aeroben Bedingungen (SIMPSON u. ROBINSON 1968). Hierbei ist hervorzuheben, dass Angehörige des Genus *Bdellovibrio* eine Reihe von hoch effizienten

biochemischen Prozessen nutzen, um Makromoleküle ihrer Wirte abzubauen und diese nachfolgend selbst wiederzuverwenden (VARON u. SHILO 1969b; DIEDRICH et al. 1983). Durch dieses Verhalten stellen *Bdellovibrionen* die am effizientesten wachsenden aeroben Mikroorganismen, die je beschrieben wurden, dar (RUBY et al. 1985). Diese hohe Effizienz spiegelt sich im Metabolismus der verschiedenen Stoffgruppen wider.

Bdellovibrio wächst und vermehrt sich auf Kosten seines Wirtes. Dabei werden die einzelnen Bestandteile der Wirtszelle, wie z.B. Protein und Nukleinsäuren, erst abgebaut (SAIER 1994) und daraufhin entsprechende Komponenten der *Bdellovibrionen* synthetisiert (GALDIERO 1975).

Eine Grundvoraussetzung ist hierbei - neben spezifischen Transportmechanismen - der Membranschaden, welchen *Bdellovibrio* in der Wirtszelle verursacht, und der ausreichend stark ist, um den Austritt von kleinen Molekülen in das Periplasma und somit die Versorgung des Parasiten mit den einzelnen Komponenten der Wirtszelle zu erlauben (CROTHERS u. ROBINSON 1971).

Bdellovibrionen nutzen die Nukleosidmonophosphate ihrer Wirtszellen als Vorläufer für ihre eigene DNA- und RNA-Synthese (MATIN u. RITTENBERG 1972; RITTENBERG u. LANGLEY 1975; ROSSON u. RITTENBERG 1981; RUBY et al. 1985), wobei ein Teil hiervon als Ausgangsmaterial für die Synthese von Zellmaterial ohne Nukleinsäurebestandteile sowie der Energiegewinnung dient (HESPELL u. MERTENS 1978; HESPELL u. ODELSON 1978). *Bdellovibrionen* sind in der Lage, die entsprechenden Ribonukleosid- bzw. Desoxyribonukleosidmonophosphate als intakte, phosphorylierte Formen aufzunehmen (RITTENBERG u. LANGLEY 1975; FRIEDBERG 1978; RUBY u. McCABE 1986) und diese gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren und zu akkumulieren (RUBY et al. 1985; RUBY u. McCABE 1986). Die Existenz eines frei reversiblen Austauschmechanismus stellt hierfür eine Voraussetzung dar. Es wird vermutet, dass zumindest zwei separate Klassen von Transportsystemen vorhanden sind, wobei jede eine partielle Spezifität für entweder Ribonukleosid- oder Desoxyribonukleosidmonophosphate zeigt (RUBY et al. 1985). Am Abbau der Wirt-DNA sind Endo- und Exodesoxyribonukleasen beteiligt, die von *Bdellovibrio* selbst gebildet werden (ROSSON u. RITTENBERG 1979).

Die einzelnen Schritte des Nucleinsäurestoffwechsels lassen sich der Abbildung 4 entsprechend darstellen. So wird die RNA des Wirtes durch von *Bdellovibrio* stammende Nucleasen abgebaut. Bemerkenswert ist hierbei der Transport der Nucleosidmonophosphate in intaktem Zustand mittels eines Nucleotid-transportsystems. Der Großteil der hierdurch für die Prädatoren verfügbaren Nucleosidmonophosphate dient der Synthese von *Bdellovibrio*-eigenen Nucleinsäuren. Ein geringerer Teil der vom Wirt stammenden Nucleotide wird katabolisiert. Durch das Zusammenspiel in *Bdellovibrionen* vorhandener Nucleotidasen, Phosphorylasen und Phosphodesoxyribomutasen werden die Nucleotide schließlich zu Pentose-1-Phosphaten und freien Nucleinsäurebasen abgebaut, wobei lediglich die Pentose-1-Phosphate weitere Verwendung finden und die Nucleinsäurebasen aus der Zelle geschleust werden.

ROSSON und RITTENBERG (1981) wiesen zudem hohe Aktivitäten von Enzymen, die an der Umwandlung von Desoxyribonucleosidmono- zu Desoxyribonucleosid-triphosphaten beteiligt sind, wie z.B. Thymidylat-Synthetase, Thymidylat-Kinase und Nucleosid-Diphosphokinase für die Erzeugung von dTTP, nach. Beim Vergleich von intraperiplasmatisch und axenisch gewachsenen *Bdellovibrionen* zeigten sich hierbei nur geringe Unterschiede - jedoch waren die Enzymaktivitäten im Falle der axenisch gewachsenen Parasiten stets um ein Mehrfaches höher.

Des Weiteren nutzen *Bdellovibrionen* auch ribosomale RNA als Ausgangsmaterial für ihre Nucleinsäure-Synthese (RUBY et al. 1985). So werden die ribosomale 50 und 30 S sowie die 23 und 16 S RNA von als Wirtszellen dienenden *E. coli* nahezu vollständig abgebaut (HESPELL et al. 1975).

Die RNA der Wirtszelle stellt in Form der Nucleosidmonophosphate die Haupt-, wenn nicht gar ausschließliche Vorstufe für die *Bdellovibrio*-RNA dar. Gleichzeitig dient sie als Ausgangsmaterial für etwa 30% (ROSSON u. RITTENBERG 1981) der Synthese von *Bdellovibrio*-DNA (PRITCHARD et al. 1975; HESPELL et al. 1975), währenddessen der ca. 60% ausmachende Hauptteil aus abgebauter Wirt-DNA aufgebaut wird (HESPELL et al. 1975). Um die Ribonucleotide in ihre entsprechenden Desoxyribonucleotide zu konvertieren, nutzt der Parasit hierfür ein Ribonucleotidreduktase-System (HESPELL et al. 1975).

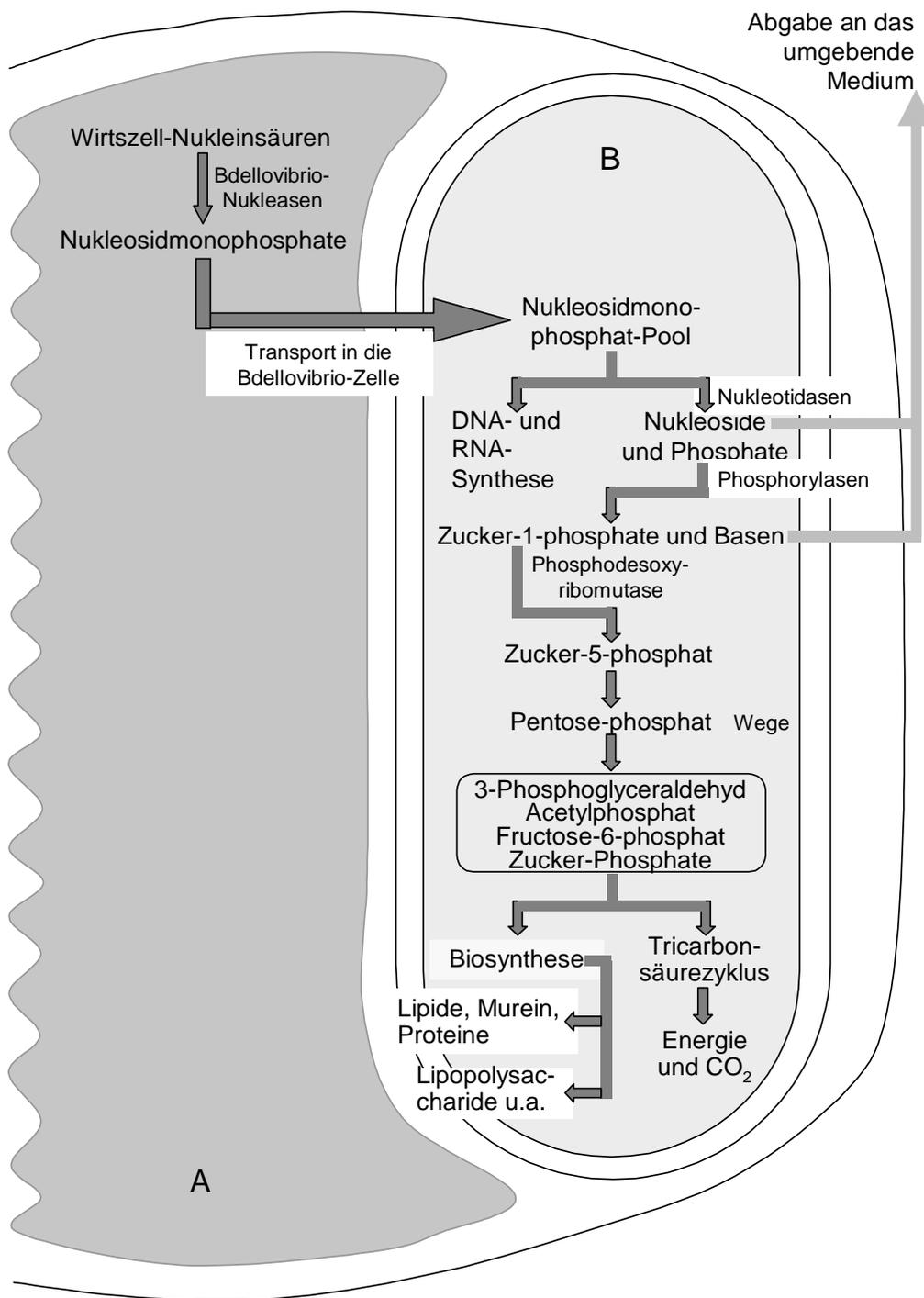


Abb. 4: Schema des vermuteten Metabolismus von Wirts-RNA durch *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J (nach HESPELL u. ODELSON 1978)
 A Zytoplasma der Wirtszelle B *Bdellovibrio*

Das Lipopolysaccharid (LPS) der Bdellovibrionen ähnelt dem anderer gramnegativer Bakterien (NELSON u. RITTENBERG 1981a). Bei der Analyse der einzelnen Fettsäuren bestehen zwischen axenisch und intraperiplasmatisch gewachsenen Vertretern des Genus *Bdellovibrio* jedoch starke Unterschiede. So enthält das LPS intraperiplasmatisch gewachsener Parasiten Komponenten, welche zum einen charakteristisch für axenisch gewachsene Bdellovibrionen und zum anderen typisch für die entsprechenden Wirtszellen sind (NELSON u. RITTENBERG 1981a). Die Menge des erworbenen LPS hängt dabei stark davon ab, ob der Wirt S-LPS oder R-LPS exprimiert. So macht bei einem Wirt mit R-LPS das erworbene LPS ca. 25% des totalen *Bdellovibrio*-LPS aus, wohingegen bei einem Wirt mit S-LPS dieser Anteil vermutlich unerheblich ist (STEIN et al. 1992). Weiterhin wurde von der Fähigkeit der Bdellovibrionen berichtet, neben den Nukleosidmonophosphaten und ATP auch die Phospholipide (RITTENBERG u. LANGLEY 1975) und das Lipid A der Wirte direkt zu verwerten (BAREL u. JURKEVITCH 2001). Bezüglich des Lipids A finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. So beschreiben NELSON und RITTENBERG (1981a und b) die Integration von Lipid A-Komponenten in die Lipopolysaccharidstruktur der Parasiten. Demgegenüber stehen die Untersuchungsergebnisse von SCHWUDKE et al. (2003). Diese fanden beim Vergleich des Lipids A von *Bdellovibrio bacteriovorus* H-D 100 mit dem entsprechenden wirtsunabhängigen H-I 100 neben der - durch das Fehlen negativ geladener Gruppen gekennzeichneten - ungewöhnlichen chemischen Struktur der Lipid As dieser beiden Stämme nur geringe Unterschiede in der Zusammensetzung des Fettsäure-Musters dieser. Hieraus schlossen die Autoren, dass prädatorische Bdellovibrionen ein „angeborenes“ Lipid A synthetisieren.

Die in das eigene LPS inkorporierten Komponenten des Wirtszell-LPS erweisen sich über folgende Zyklen als hoch konserviert (NELSON u. RITTENBERG 1981a). Das axenische LPS ist durch das Fehlen von Glucosamin und das Vorhandensein von Fucosamin als einziger LPS-Aminozuckerquelle gekennzeichnet (NELSON u. RITTENBERG 1981a).

Ähnlich starke Differenzen zwischen axenisch und intraperiplasmatisch gewachsenen Bdellovibrionen bestehen im Hinblick auf die Zusammensetzung des

Fettsäuremusters (KUENEN u. RITTENBERG 1975). *Bdellovibrio* ist in der Lage, sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren des Substratorganismus ohne weitere Modifikation zu inkorporieren. Dabei ahmt *Bdellovibrio* das Fettsäuremuster seines Wirtes nach, ohne dabei die Kontrolle über die gesamte Fettsäurekomposition zu verlieren (KUENEN u. RITTENBERG 1975). Des Weiteren sind die Bdellovibrionen zum Abbau von Fettsäuren, welcher vermutlich mittels β -Oxidation realisiert wird, sowie zu deren Synthese befähigt und können diese auch als Energiequelle nutzen (KUENEN u. RITTENBERG 1975).

Erst vor kurzem wurde nachgewiesen, dass *Bdellovibrio* verschiedene Sphingophospholipid-Komponenten inklusive Phosphoryl- und Phosphonylbindungen synthetisieren kann (WATANABE et al. 2001).

Bemerkenswert ist weiterhin die Eigenschaft der Bdellovibrionen, intakte Porin-Proteine vom Wirt in die eigene Außenmembran einzubauen (DIEDRICH et al. 1983; TALLEY et al. 1987). Ein entsprechendes Vorgehen ist für OmpF und OmpC beschrieben (DIEDRICH et al. 1983; TALLEY et al. 1987). Im Gegensatz hierzu war der Nachweis von LamB, OmpA (DIEDRICH et al. 1984), Lc sowie NmpC in der Außenmembran von *Bdellovibrio* nicht möglich (TALLEY et al. 1987). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von TUDOR und KARP (1994), welche ebenfalls Hinweise auf ein OmpF oder OmpF-kreuzreaktives Protein fanden. Die Fähigkeit der Translokation von Außenmembranproteinen vom Wirt wird durch den *Bdellovibrio*-Stamm, dessen Kultivierungsgeschichte und den Wirt, auf dem der *Bdellovibrio* fortgepflanzt wurde, beeinflusst (TALLEY et al. 1987). So fehlte Parasiten, welche auf Porin-defizienten Wirten gewachsen waren, ein vom Wirt stammendes OmpF. Bdellovibrionen können allerdings beim Fehlen von OmpF im Wirt stattdessen das OmpC Protein erwerben (DIEDRICH et al. 1984). Der Prozeß des Erwerbs von Außenmembranproteinen vom Wirt funktioniert jedoch nur bei Wirten, die R-LPS exprimieren - bei Wirtszellen, die glattes LPS exprimieren, ist er ineffizient (TALLEY et al. 1987). Demgegenüber synthetisierte *Bdellovibrio* in einer anderen Studie unter allen getesteten Bedingungen selber ein OmpF-ähnliches Protein (RAYNER et al. 1985). Unterschiede bestehen auch im Hinblick auf die Funktion der Porine. Während DIEDRICH et al. (1983) dem vom Wirt erworbenen Außenmembranprotein die selbe Funktion wie im Wirt zuschreiben, sollen sich die

vom Parasiten synthetisierten Porine funktionell von den *E. coli* Porinen unterscheiden (RAYNER et al. 1985).

Als weitere Syntheseleistung ist die Produktion einer charakteristischen MDO- (membrane-derived oligosaccharides) ähnlichen Klasse von Oligosacchariden durch *Bdellovibrio bacteriovorus* beschrieben (RUBY u. McCABE 1988). MDOs dienen der Senkung des osmotischen Druckes, der auf die zytoplasmatische Membran einwirkt. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die Wirtszelle während des Wachstums des Parasiten eigene MDOs verliert, wodurch es im Vergleich zum Zytoplasma zu einer Senkung der ionischen Stärke des periplasmatischen Kompartiments kommt, was zu einem erleichterten Austritt der Wirtszellbestandteile in das Periplasma führen könnte, wo sie leicht durch extrazelluläre Enzyme der Bdellovibrionen abbaubar wären. Der Erwerb wirtszelleigener MDOs durch die Prädatoren war nicht nachweisbar (RUBY u. McCABE 1988).

Bdellovibrionen verfügen über die Fähigkeit, die Wand ihres Wirtes biosynthetisch zu modifizieren (RUBY u. RITTENBERG 1984). Diese Eigenschaft äußert sich in der Weise, dass die mit Hilfe einer Peptidase aus dem Peptidoglycan gelöste DAP mittels *Bdellovibrio*-eigenem extrazellulärem Enzym nahezu ausschließlich in Bdelloplastenwand-Peptidoglycan inkorporiert wird, jedoch nicht in die Zellwand der Bdellovibrionen. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchungen von ARAKI und RUBY (1988). Diese Wissenschaftler beobachteten, dass die DAP wahrscheinlich in den Peptidanteil der Peptidoglycanmasse inkorporiert wird, während RUBY und RITTENBERG (1984) ungefähr gleiche Mengen DAP in monomeren und dimeren Peptidoglycan-Fragmenten fanden. Die Anheftung der DAP an das Peptidoglycan erfolgt durch eine kovalente Bindung (RUBY u. RITTENBERG 1984; ARAKI u. RUBY 1988).

Die Mitglieder des Genus *Bdellovibrio* sind mit einer Vielzahl von Enzymen ausgestattet, die der Gewinnung und dem Aufschluß von Bestandteilen der Wirtszelle dienen. Zu diesen gehören Proteasen (ENGELKING u. SEIDLER 1974), Nukleasen (MATIN u. RITTENBERG 1972) und Lipase (HUANG u. STARR 1973a). Die Untersuchung axenischer Bdellovibrionen wies die Präsenz von Katalase,

Peroxidase sowie einer durch reinen Sauerstoff induzierbaren Superoxid-Dismutase nach (STEIN et al. 1982).

Bdellovibrionen sind nicht in der Lage, freie Zucker zu metabolisieren (HESPELL 1976; ROMO et al. 1992). Dies liegt in der Tatsache begründet, dass der Parasit lediglich einen Teil der Enzyme des glykolytischen Weges besitzt (SIMPSON u. ROBINSON 1968). Weiterhin verfügt er nicht über ein vollständiges Phosphoenolpyruvat-zucker-Phosphotransferase System (PTS), wie es bei anderen Bakterien vorkommt (ROMO et al. 1992).

Im Gegensatz hierzu ist *Bdellovibrio* im Besitz des kompletten Trikarbonsäurezyklus (SIMPSON u. ROBINSON 1968; ISHIGURO 1974). Des Weiteren verfügt der Parasit über verschiedene Bestandteile der Atmungskette, wie Cytochrom b (TORRELLA et al. 1978), Cytochrom c und vermutlich über Cytochrom a, wobei Cytochrom a₁ nicht sicher nachgewiesen werden konnte, es aber Hinweise auf das Vorliegen von Cytochrom a₃ gab (SIMPSON u. ROBINSON 1968). Darüber hinaus besitzt *Bdellovibrio* NADH- und NADPH-Oxidasen (SIMPSON u. ROBINSON 1968).

Für die Energieproduktion nutzt der Parasit sowohl die oxidative als auch die Substrat-Phosphorylierung (SIMPSON u. ROBINSON 1968; GADKARI u. STOLP 1975). Die Bildung von ATP erfolgt jedoch primär durch oxidative Phosphorylierung während des Elektronentransportes (HESPELL et al. 1973; GADKARI u. STOLP 1975).

Während des intraperiplasmatischen Wachstums dienen Aminosäuren aus dem Abbau des Proteins der Wirte als Hauptenergiequelle (HESPELL et al. 1973), währenddessen die Energiegewinnung aus Nukleosidmonophosphaten eine untergeordnete Rolle spielt (HESPELL u. ODELSON 1978).

Bdellovibrionen zeichnen sich durch eine ungewöhnlich hohe Respirationsrate aus (RITTENBERG u. SHILO 1970), wobei der RQ für die endogene Respiration mit 0,86 angegeben wird. Während des intraperiplasmatischen Wachstums steigt dieser dann auf für die Verwertung von Aminosäuren typische 1,0 bis 1,1 (HESPELL et al. 1973).

Bemerkenswert ist der ungewöhnlich niedrige Energieaufwand für das intraperiplasmatische Wachstum (HESPELL et al. 1973; FRIEDBERG u. FRIEDBERG 1976), welcher zu einem im Vergleich mit den meisten Bakterien entsprechend hohen Y_{ATP} -

Wert von 25,9 führt (RITTENBERG u. HESPELL 1975). Somit nähert sich *Bdellovibrio* dem theoretischen Maximalwert von 30. Dem gegenüber steht der Energieverbrauch für die Bewegung, welcher im Vergleich mit vielen Eubakterien um mindestens eine Größenordnung höher liegt (HESPELL et al. 1974).

Das reduzierte Energiebedürfnis für das intraperiplasmatische Wachstum resultiert u.a. aus den bereits beschriebenen Einsparungen durch den Erwerb von Porin (DIEDRICH et al. 1983), Nukleosidmonophosphaten (RITTENBERG u. LANGLEY 1975) sowie Fettsäuren vom Wirt (KUENEN u. RITTENBERG 1975).

Setzt man die *Bdellovibrionen* „Hungerbedingungen“ aus, so reagieren diese aufgrund des Fehlens von Reservematerialien, wie z.B. Poly- β -hydroxybutyrat, anders als andere Bakterien, indem sie zuerst ribosomales Material und dann gleichzeitig RNA und Protein zusammen abbauen (HESPELL et al. 1974).

2.1.10 Auswirkungen auf die Wirtszelle

Die intraperiplasmatische Lebensphase der *Bdellovibrionen* wird von drastischen Auswirkungen auf den Metabolismus sowie die Morphologie der Wirtszelle begleitet. Erste, im Phasenmikroskop sichtbare Veränderungen stellen der Verlust der Motilität bei beweglichen Bakterien im Zuge der Anheftung sowie die Überführung der Wirtszelle in einen sphärischen Körper dar (STOLP u. STARR 1963).

Eine frühe Konsequenz der *Bdellovibrio*-Infektion ist die rapide Veränderung der Permeabilität der zytoplasmatischen Membran gegenüber niedermolekularen Molekülen (RITTENBERG u. SHILO 1970; ODELSON et al. 1982; COVER et al. 1984), welche durch Enzyme des Parasiten verursacht werden soll und die während dessen Wachstums anhält. So ist eine gesteigerte Permeabilität z.B. für Acetat und Succinat festzustellen (RITTENBERG u. SHILO 1970). Durch diesen Vorgang ist die Versorgung des Parasiten mit Nährstoffen aus dem Wirtszytoplasma gesichert. GALDIERO (1975) berichtet zudem über den nahezu vollständigen Kalium-Verlust des Wirtszellprotoplasten während der ersten 10-20 Minuten nach dem ersten Kontakt. Eine weitere mögliche Ursache für die gesteigerte Permeabilität stellt das potentielle Modell von TUDOR und KARP (1994) dar, in welchem ein kanalbildendes Protein unspezifisch in die Phospholipid-Doppelschicht der zytoplasmatischen

Membran der Wirtszelle eingefügt wird. Weiterhin wirkt sich der Einfluß von *Bdellovibrio* auch auf die Oberfläche der Substratzelle aus. So ist zu beobachten, dass die Bdelloplastenoberfläche im Vergleich mit der Wirtszelle deutlich hydrophobere Eigenschaften aufweist (COVER u. RITTENBERG 1984).

Auch der Metabolismus der Wirtszelle kommt schnell zum Erliegen. Bereits binnen drei bis sechs Minuten nach der Anheftung des *Bdellovibrio* werden die mRNA- und die Proteinsynthese des Wirtes inhibiert (SAIER 1994). Des weiteren kommt es zum rapiden Absinken des Respirationspotentials des infizierten Wirtes (RITTENBERG u. SHILO 1970) und zum Verlust seiner glykolytischen (HESPELL 1976) sowie der PTS -Aktivität (SAIER 1994).

2.1.11 Anwendungen

Seit der Entdeckung der Bdellovibrionen ist man bestrebt, sich ihre lytischen Eigenschaften zunutze zu machen. Dies wird insbesondere dadurch bestärkt, dass aus der Isolierung des Parasiten aus den einzelnen Habitaten häufig auf dessen Einfluß auf das ökologische Gleichgewicht der mikrobiellen Populationen in der Natur geschlossen bzw. spekuliert wurde.

Bereits 1973 gelang es, *Bdellovibrio* erfolgreich in der Bekämpfung der bakteriellen Fäulnis bei Pflanzen einzusetzen. So konnte mittels des *Bdellovibrio bacteriovorus*-Stammes 17 die Entwicklung von systemischen und lokalen Symptomen der durch *Pseudomonas glycinea* verursachten bakteriellen Fäulnis von Sojabohnen verhindert werden (SCHERFF 1973). Das Verhältnis Prädator zu *Pseudomonas* betrug hierbei 9:1 bzw. 99:1. Zwei weitere getestete *Bdellovibrio*-Stämme waren weniger effektiv.

Einen weiteren Schwerpunkt im Hinblick auf eine Nutzung stellt die Selbstreinigung verschmutzter Gewässer dar, da neben den Vermutungen einer Beteiligung der Bdellovibrionen (STRALEY u. CONTI 1977) eine solche auch tatsächlich nachgewiesen werden konnte (LAMBINA et al. 1987; RICHARDSON 1990).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit wurde von VARON und SHILO (1981) aufgezeigt. Diese nutzten die Fähigkeit der Bdellovibrionen, als Angriffsphase-Zellen zu fungieren, als Indikator für bestimmte Umweltgifte.

Von besonderem Interesse sind im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit bereits vorgenommene Versuche der Nutzung von *Bdellovibrio* im Lebensmittelbereich. So untersuchten NEAL und BANWART (1977) den Einfluß von *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J auf die coliforme Population in Rinderhack und pasteurisierter Milch. Bei Raumtemperatur war das Rinderhack bereits nach 1 d verdorben. Die Zahl der Bdellovibrionen sank während der viertägigen Lagerung. Im Gegensatz hierzu überlebten 65,4% der Prädatoren die Lagerungsdauer, wenn das Rinderhack bei 4°C gelagert wurde. Da pasteurisierte Milch über keine geeignete Population von Wirtszellen verfügt, wurde dieser *E. coli* zugesetzt. So war es möglich, innerhalb von 48 h einen sehr schwach ausgeprägten Anstieg in der Zahl der PFU zu erreichen. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, dass in den getesteten Lebensmitteln kein Wachstum der Bdellovibrionen möglich ist und dass die Präsenz der Parasiten keinen Effekt auf die Reduktion der produkttypischen Flora hat.

Weitaus vielversprechendere Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen von JACKSON und WHITING (1992). Diese testeten die Möglichkeit der Reduktion von *E. coli* durch *B. bacteriovorus* 109J unter variierenden in vitro-Bedingungen und bestimmten somit die optimalen Rahmenbedingungen für einen solchen Einsatz. So scheint die Anwendung des Stammes 109J am effektivsten bei einem Verhältnis Parasit zu Wirt von 5:1, 10:1 oder 30:1, bei Temperaturen zwischen 20 und 30°C sowie einem pH-Wert nahe des Neutralpunktes. Diesen Untersuchungen zufolge stellt der Einsatz von Bdellovibrionen eine neue potentielle Methode dar, um Lebensmittel länger haltbar zu machen und durch in Lebensmitteln befindliche gramnegative Bakterien bedingte Erkrankungen zu reduzieren (JACKSON u. WHITING 1992). Als mögliche Applikationsformen schlagen die Autoren die Anwendung als Spray oder Tauchbad vor.

Auch die Untersuchungen von FRATAMICO und WHITING (1995) bestätigen den Einsatz von *Bdellovibrio* als potentielle Möglichkeit der Kontrolle des Verderbs von Lebensmitteln. Das von ihnen angegebene optimale Verhältnis Parasit zu Wirt beträgt ebenfalls 10:1. Sie geben jedoch zu bedenken, dass die Zahl der pathogenen Erreger und Verderbnisbakterien variiert und demzufolge die Konzentration der Bdellovibrionen für jeden Typ Lebensmittel bestimmt werden muß.

Neben diesen praktisch orientierten Möglichkeiten dient *Bdellovibrio* als wichtiges Modell-System für das Studium der prokaryotischen Entwicklungsbiologie.

2.2 SALMONELLA

Vertreter der Gattung *Salmonella* sind ca. 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm große, ovoide Kurzstäbchen, welche keine Sporen bilden. Aufgrund ihrer peritrichen Begeißelung sind sie beweglich. Eine Ausnahme hiervon stellt die unbewegliche *S. Gallinarum Pullorum* dar (SELBITZ 1992).

2.2.1 Taxonomische Stellung und biochemische Charakteristika der Salmonellen

2.2.1.1 Taxonomische Stellung der Salmonellen

Die Anwendung neuer molekularbiologischer Verfahren im Laufe der letzten Jahre hat auch zur Klärung der taxonomischen Stellung der Salmonellen beigetragen.

Salmonellen lassen sich zur Zeit wie folgt klassifizieren:

Familie: Enterobacteriaceae
Gattung: *Salmonella*
Arten: 1. *Salmonella bongori*
2. *Salmonella enterica*

Anhand von Verwandtschaftsuntersuchungen der DNA ist es möglich, *Salmonella enterica* in sechs verschiedene Subspezies zu gliedern:

Salmonella enterica

subsp. *arizonae*

subsp. *diarizonae*

subsp. *enterica*

subsp. *houtenae*

subsp. *indica*

subsp. *salamae*

Salmonella besitzt verschiedene somatische (O-) und Geißel- (H-) Antigene, aufgrund derer innerhalb der Subspezies eine weitere Unterscheidung in verschiedene Serotypen mit charakteristischen Antigenformeln möglich ist. Das auch heute noch zur Bestimmung von Isolaten genutzte Kauffmann-White-Schema basiert auf dieser unterschiedlichen Antigenität der einzelnen Serotypen. Zur Zeit sind über 2500 solcher Serovare bekannt (KÜHN u. TSCHÄPE 1995). Um zu verdeutlichen, dass es sich nicht um Spezies sondern um Serovare handelt, erfolgt die Kennzeichnung dieser mit einem großen Anfangsbuchstaben und in nicht kursiver Schreibweise. Somit besitzen diese Namen keinen taxonomischen Status (GAREIS 1995).

Im Rahmen der Lebensmittelsicherheit spielt nahezu ausschließlich *S. enterica* subsp. *enterica* eine Rolle. So gehören über 99% aller vom Menschen isolierten Salmonellen dieser Subspezies an (OLD 1992).

Eine weitere Stufe der Differenzierung ist durch die Phagentypisierung gegeben. Diese stellt eine wertvolle Ergänzung für die Unterscheidung der *Salmonella*-Serotypen dar. Der jeweilige Phagentyp wird dabei aus der Sensitivität der Zellen gegenüber der lytischen Aktivität ausgewählter Bakteriophagen bestimmt.

2.2.1.2 Biochemische Charakteristika der Salmonellen

Die biochemischen Charakteristika bieten in der Diagnostik eine auch heute noch

genutzte Möglichkeit der Abgrenzung dieser Keime gegen andere Bakterien.
Die wichtigsten biochemischen Charakteristika sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Biochemische Charakteristika der Salmonellen (nach ROLLE u. MAYR 1993)

Färbeverhalten in der Gramfärbung	-
fakultativ anaerob	+
Reduktion von Nitrat zu Nitrit	+
Verwertung von Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle	+
H ₂ S-Bildung	+ (Ausnahme: <i>S. Choleraesuis</i>)
Glucose-Fermentation unter Gasbildung	+ (Ausnahmen: <i>S. Typhi</i> und <i>S. Gallinarum</i>)
Lysin- und Ornithin-Decarboxylasereaktion	+
Oxidase-Reaktion	-
Indol	-
Urease	-
Cytochromoxidase	-
Hämolyse auf Blutagar	-
Lactose-Abbau	-

Darüber hinaus lassen sich die meisten der Subspezies I-Stämme entsprechend den Angaben der Tabelle 4 charakterisieren.

Tabelle 4: Charakteristika der meisten der Subspezies I-Stämme (nach LE MINOR 1992)

Säure- und Gasbildung aus Glucose, Mannitol, Maltose und Sorbitol	+
Methylrottest	+
Lysin- und Ornithin-Decarboxylasereaktion	+
H ₂ S-Bildung aus Thiosulfat	+
Wachstum auf SIMMON'S Citrat-Medium	+
ONPG-, Indol- und Voges-Proskauer-Test	-
Säurebildung aus Adenitol, Saccharose, Salicin und Lactose	-
Harnstoffspaltung und Gelatine-Hydrolyse	-
Phenylalanin- und Tryptophan-Desaminase	-
Wachstum mit KCN	-

2.2.2 Faktoren, die das Wachstum und Überleben der Salmonellen beeinflussen

Das Wachstum und Überleben der Salmonellen wird - wie bei allen Mikroorganismen - durch viele Faktoren beeinflusst. Zu diesen zählen insbesondere die Temperatur, der pH-Wert, der a_W -Wert, das Redoxpotential sowie das sie umgebende Substrat (D'AOUST 1989). Hierbei unterscheiden sich ubiquitäre Serovaren durch ihre anspruchslose Kultivierung von auf bestimmte Spezies beschränkten Serovaren, welche spezifische Wachstumsfaktoren benötigen (LE MINOR 1992).

Die *Salmonella*-Problematik wird insbesondere dadurch gefördert, dass diese Keime auch außerhalb des tierischen bzw. menschlichen Organismus lange überlebensfähig sind. So ist eine Überlebenszeit dieser Bakterien von über einem Jahr sowohl im Erdboden als auch in Jauchegruben beschrieben (FEHLHABER 1992).

Darüber hinaus können sie auch in diversen Lebensmitteln oftmals beachtliche Zeiträume überdauern - beispielsweise in Rohwurst mehrere Tage bis Wochen, auf den Oberflächen verschiedener Käsesorten drei bis vier Wochen, in gesalzenen Därmen 11 bis 17 Wochen, in Fleischsalat mit einem pH-Wert von 5 mehr als fünf Wochen und in Pökelfleisch ebenfalls mehrere Wochen (FEHLHABER 1992). Diese Tatsache unterstreicht sowohl die Notwendigkeit der Minimierung des Eintrages von Salmonellen in die Lebensmittelkette als auch das Erfordernis der gründlichen Beseitigung dieser evtl. vorhandenen pathogenen Keime von Arbeitsoberflächen und -geräten.

Zwar liegt die optimale Vermehrungstemperatur der zu den mesophilen Mikroorganismen gehörenden Salmonellen zwischen 35 und 37°C (ZIPRIN 1994), jedoch ist eine Vermehrung dieser Keime in Schweinehackfleisch und anderen Lebensmitteln auch noch bei einer minimalen Temperatur von 7°C (SCHMIDT 1990; BAUMGART 1993) sowie einem Maximum von 47°C bzw. 48°C gegeben (KRÄMER 1992; BAUMGART 1993).

Eine weitere Beeinflussung der Überlebenszeit der Salmonellen findet durch die Luftfeuchte, den Ausgangskeimgehalt und in besonderem Maße durch das Material,

dem die Salmonellen anhaften, statt.

Der bei vielen Lebensmitteln übliche Vorgang des Gefrierens führt zwar zu einer Senkung des Anfangskeimgehaltes auf ein relativ geringes Niveau, er ist jedoch nicht dazu geeignet, die Salmonellen abzutöten (FRIES 1994). So können diese Bakterien in gefrorenem Fleisch bei Temperaturen von -18°C bis -20°C viele Monate überleben, wenngleich dies mit einer Reduktion der Keimzahlen einhergeht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass ein Absenken des pH-Wertes unter 6 im Zusammenhang mit dem Gefrierprozeß einen deutlich stärker ausgeprägten letalen Effekt auf die Salmonellen bewirkt (BLOBEL u. SCHLIESSER 1981).

Im Gegensatz zum Gefrierprozeß ist Hitzeeinwirkung zur Abtötung von Salmonellen geeignet. Zu diesem Zweck müssen bestimmte Temperaturen und Zeiten erreicht bzw. gehalten werden. Dies belegen u.a. Untersuchungen der Hitzeresistenz der Salmonellen, welche als Ergebnis eine relativ hohe Überlebensfähigkeit dieser Keime gegenüber Temperaturen zwischen 60°C und 68°C bei unterschiedlich langen Einwirkzeiten erbrachten (FEHLHABER et al. 1992). Es ist festzuhalten, dass Salmonellen in Analogie zu vielen anderen Keimen gegenüber trockener Hitze wesentlich widerstandsfähiger sind als gegen feuchte Hitze (ROLLE u. MAYR 1993).

2.2.3 *Salmonella* als kausales Agens von Lebensmittelvergiftungen

2.2.3.1 Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen

Unter bakteriellen Lebensmittelvergiftungen versteht man akute, nach dem Verzehr von Lebensmitteln auftretende Erkrankungen des Menschen, welche durch Bakterien, ihre Toxine oder durch bakteriell gebildete Abbauprodukte von Lebensmittelbestandteilen verursacht werden (FEHLHABER 1992).

Lebensmittelintoxikationen werden als Lebensmittelvergiftungen dargestellt, welche durch die Aufnahme von Toxinen mit dem Lebensmittel Erkrankungen hervorrufen.

Lebensmittelinfektionen hingegen sind durch Erreger und/oder deren Toxine hervorgerufene Erkrankungen, welche durch die Aufnahme mit Lebensmitteln oder Trinkwasser hervorgerufen werden können. Hierbei ist es unerheblich, ob der Erreger primär im Lebensmittel enthalten ist oder ob er dieses erst nachträglich

kontaminiert hat.

Salmonellen stellen die häufigste Ursache aller registrierten Lebensmittelvergiftungen und demzufolge bezüglich der Lebensmittelsicherheit auch die Hauptsorge auf fast allen Sektoren der Lebensmittelindustrie dar (BELL u. KYRIAKIDES 2002). Hauptsächliche Infektionsquelle sind hierbei Lebensmittel tierischer Herkunft, wobei Fleisch, Geflügelfleisch, Eier, Milch und Erzeugnisse daraus in unterschiedlichem Maße als Ursachen für Salmonellose-Ausbrüche in Erscheinung treten (HARTUNG 2000). Es gelingt jedoch häufig nicht, das Auftreten einer Salmonellose mit einem entsprechenden Lebensmittel in Verbindung zu bringen, obwohl die Wahrscheinlichkeit hierfür aufgrund der Tatsache, dass kontaminierte Lebensmittel die Hauptursache für das Auftreten der Salmonellose beim Menschen darstellen (FEHLHABER et al. 1996), sehr hoch ist. Erschwerend wirkt hierbei auch der Fakt, dass entsprechend kontaminierte Lebensmittel für gewöhnlich „normal“ riechen und schmecken.

Auslösend ist im Erkrankungsgeschehen neben dem Rohverzehr tierischer Lebensmittel der unsachgemäße küchentechnische Umgang mit dem Lebensmittel sowie die Vernachlässigung der kritischen Kontrollpunkte im Herstellungsprozeß (FEHLHABER 1997). Einen entscheidenden Beitrag leistet auch die Kreuz-Kontamination von verzehrfertigen Lebensmitteln durch unangebrachtes Behandeln oder mangelnde persönliche Hygiene (BELL u. KYRIAKIDES 2002).

Die Erfassung mikrobiell bedingter Lebensmittelvergiftungen und akuter Gastroenteritiden - und demzufolge auch der *Salmonella*-Fälle - basiert auf der rechtlichen Grundlage des Infektionsschutzgesetzes § 6 (N. N. 2000) und ist im Falle der meldepflichtigen Krankheitserreger (§ 7) an deren Nachweis gekoppelt. Der Nachweis der Salmonellen gelingt jedoch häufig nicht. So erbrachte z.B. die Untersuchung von 225 mit *Salmonella* kontaminierten Lebensmittelproben bei Anwendung der üblichen, konventionellen Kultivierungs- und Nachweismethoden lediglich bei 30 dieser Proben ein positives Ergebnis (FANG et al. 2003). Es ist davon auszugehen, dass die hieraus sowie durch andere Faktoren resultierende Dunkelziffer entsprechend ca. 10-100 fach größer ist (BELL u. KYRIAKIDES 2002). Darüber hinaus unterliegen aufgrund dieses Gesetzes auch Salmonellenauscheider

nach § 6 der Meldepflicht und dürfen gemäß § 42 weder beim Herstellen noch beim Inverkehrbringen von Lebensmitteln beschäftigt werden.

2.2.3.2 Minimale infektiöse Dosis

Die Höhe der minimalen infektiösen Dosis wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören neben der Virulenz des jeweiligen Serovares auch das Alter, der immunologische Status, der Ernährungszustand und die Magenfunktion des einzelnen Individuums (MÜLLER 1979).

Bei der Bestimmung einer minimalen infektiösen Dosis ist auch der Grad der Adaptation der Serotypen an den jeweiligen Wirt zu beachten. So kann man zwischen speziell auf den jeweiligen Wirt beschränkten Salmonellen, wie z.B. *S. Typhi* und *S. Gallinarum-Pullorum*, an den Wirt adaptierten Salmonellen, wie beispielsweise *S. Choleraesuis* und *S. Dublin*, und Serovaren ohne Restriktionen unterscheiden (BELL u. KYRIAKIDES 2002). Während die erste Gruppe - außer bei den speziell auf den Menschen beschränkten Spezies, welche heute in den Industrieländern fast gänzlich bedeutungslos sind - in der Regel keine humanen Erkrankungen auslöst, ist die zweite Gruppe neben ihrer Infektiosität für Tiere auch durch die Möglichkeit der Erkrankung von Menschen gekennzeichnet.

Die minimale Infektionsdosis kann stark variieren. Laut Angabe von SCHMIDT (1990) sind für das Auslösen einer Gastroenteritis bei einem gesunden Erwachsenen 10^5 bis 10^6 koloniebildende Einheiten pro Gramm aufgenommenem Lebensmittel notwendig. Im Gegensatz hierzu berichtet KIST (1993) von einer Mindestdosis für Erwachsene von 10^6 - 10^8 bzw. für Kinder von 10^3 vermehrungsfähigen Salmonellen. Anhand von retrospektiven Untersuchungen nach Salmonellose-Epidemien wurden wahrscheinliche Infektionsdosen errechnet, welche zwischen 10^2 und 10^{11} schwankten. Demzufolge kann lediglich davon ausgegangen werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung mit der Erhöhung der Infektionsdosis steigt. Der Begriff der „minimalen infektiösen Dosis“ ist somit im Falle der Salmonellose aufgrund der extremen Schwankungsbreite nur von begrenztem Wert.

Generell gilt, dass kleine Kinder, Alte und Personen, die an einer chronischen Krankheit leiden oder eine Immunsuppression aufweisen, besonders anfällig für eine

Salmonellose sind.

Auch die Zusammensetzung des Nahrungsmittels kann zu einer Erkrankung bei relativ geringer Keimmenge beitragen. So schützen einige Lebensmittel, wie beispielsweise Schokolade, Käse oder Salami aufgrund ihres hohen Fettgehaltes die Salmonellen vor den niedrigen pH-Werten des Magens, so dass weniger als 100 Keime krankheitsauslösend wirken können (BELL u. KYRIAKIDES 2002).

2.2.3.3 Virulenzfaktoren der Salmonellen

Salmonellen sind in der Lage, bei Mensch und Tier systemische und gastroenteritische Krankheitsbilder hervorzurufen. Demzufolge müssen sie entsprechende pathogenetische Faktoren ausbilden. Um eine Infektion auszulösen, ist weiterhin die Überwindung einer Kaskade der Erregerabwehr notwendig.

Nach der erfolgreichen Passage des Magens kommt es zuerst zur Kolonisation im Intestinaltrakt, welche durch Fimbrien realisiert wird. Hierbei ist zu bemerken, dass Salmonellen über eine Vielzahl verschiedener Fimbrientypen verfügen. Diese versetzen die Salmonellen in die Lage, sich an verschiedenen Zielorten anzusiedeln und somit unterschiedliche pathogenetische Wege einzuschlagen.

Darüber hinaus ist die Bildung von Exotoxinen von entscheidender Bedeutung für die Pathogenität der Salmonellose.

2.2.3.4 Klinisches Bild und Pathogenese der Salmonellose beim Menschen

Das Bild der durch die verschiedenen Salmonellen hervorgerufenen Erkrankungen reicht von der Gastroenteritis bis hin zum Typhoid und zur Septikämie. Im Hinblick auf die Aufnahme von Salmonellen mit der Nahrung ist jedoch primär die Enteritis-Salmonellose von Interesse, welche streng von den systemischen, generalisiert verlaufenden Salmonellosen zu trennen ist (TSCHÄPE u. KÜHN 1993).

Die Pathogenese der Enteritis-Salmonellose beginnt mit der oralen Aufnahme von *Salmonella*. Dies geschieht in der Regel über den Verzehr infizierter bzw. kontaminierter Lebensmittel. Die Rolle einer Infektion von Mensch zu Mensch ist als unbedeutend einzuschätzen.

Nach einer Inkubationszeit von 6-48 h kommt es zu plötzlichen Bauchschmerzen und meist zu wässrigem Durchfall. Unter Umständen ist auch die Beimengung von Blut im Stuhl möglich. Weiterhin können Nausea, Erbrechen sowie Kopf- und auch Gelenkschmerzen auftreten. Die innere Körpertemperatur ist meist mäßig, bis maximal 39°C, erhöht oder es tritt kein Fieber auf. Oft werden Cholera-ähnliche Krankheitsbilder und Kreislaufkollaps (SCHOTTMÜLLER 1994) beobachtet, wohingegen noch schwerere klinische Verläufe mit höherem Fieber nur gelegentlich vorkommen. Für gewöhnlich ist die Symptomatik nur wenige Tage, in der Regel zwischen 2 und 7 Tage, ausgeprägt.

Erkrankte Personen scheiden den Erreger meist nur kurz aus. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit der Ausbildung von Dauerausscheidern, welche insbesondere im Bereich der Lebensmittelindustrie verheerenden Schaden verursachen können.

Die Mortalitätsrate ist gering und wird mit 0,1% angegeben.

Nach der Magenpassage gelangen die Salmonellen in den Dünndarm, in welchem sie mit Hilfe ihrer Adhäsionsfimbrien kolonisieren können. Im weiteren Verlauf kommt es zur Ausbildung eines Biofilms im Bereich des oberen und mittleren Dünndarms. Weitere, für die Invasion der Schleimhäute notwendige molekulare Mechanismen basieren auf bakteriellen Struktur- und sezernierten Proteinen (HENSEL 2001). So ist es gelungen, als einen initialen Vorgang für die Invasion und die Flüssigkeitssekretion die Rolle des *Salmonella*-Pathogenitätsinsel-1-codierten Typ III-Sekretionssystems (TTSS) mit seinen Strukturproteinen, diversen sezernierten Proteinen und ihren Chaperonen sowie den Regulatoren im Rahmen der Translokation von sezernierten Effektorproteinen in die epitheliale Zielzelle zu entschlüsseln (JONES et al. 1998; HENSEL 2001). Einmal in engem Kontakt mit dem Epithel wird die Degeneration der Mikrovilli der Enterozyten induziert (LU u. WALKER 2001). Des weiteren kräuselt sich die Membran im Kontaktbereich der Salmonellen mit den Enterozyten, gefolgt von der Endozytose der Erreger in die Wirtszellen (LU u. WALKER 2001).

Von großer Bedeutung für die Ausbildung der klinischen Symptomatik des Durchfalls ist die einsetzende Bildung des Enterotoxins Stn. Dieses führt nach der Bindung an spezifische Rezeptoren über die Induktion eines sekundären Messengers zur Fehlregulation des Wasserhaushaltes der Enterozyten. Die Folge ist ein schnell einsetzender Efflux von Wasser und Elektrolyten, welcher zur Diarrhoe führt. Hierdurch wird das Ausschwemmen der Salmonellen bedingt. Zusätzlich zur Diarrhoe kann es bei der Kolonisierung der Peyer'schen Platten auf subepitheliale Wege auch zur Invasion der M-Zellen und daraus resultierend zum Auftreten von Fieber kommen.

Die für die Ausbildung der Enteritis-Salmonellose notwendige Toxinproduktion und -ausschleusung findet sich nur bei einem relativ geringen Teil der *Salmonella enterica*-Stämme. Darüber hinaus existieren unter diesen nur wenige, welche über eine hohe Toxinbildung verfügen.

Die Toxinogenität der Salmonellen scheint für den eigentlichen Wirt lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies wird dadurch bestärkt, dass bei auf den jeweiligen Wirt beschränkten Salmonellen nahezu keine Toxinbildung erkennbar ist. Aufgrund der Tatsache, dass die Enteritis-Salmonellose verursachenden Stämme sowohl systemische Erkrankungen beim Tier als auch gastroenteritische Bilder beim Menschen verursachen, können diese Erreger als pathogenetische „Alles-Könner“ bezeichnet werden (TSCHÄPE 1996).

2.2.3.5 Inzidenz der Enteritis-Salmonellose

Salmonella stellt das wichtigste kausale Agens der Lebensmittelvergiftungen weltweit dar. So sind in den meisten Ländern jedes Jahr hunderte von Ausbrüchen der Salmonellose im Zusammenhang mit Lebensmitteln zu verzeichnen (BELL und KYRIAKIDES 2002). Hierbei tritt die Salmonellose meist sporadisch bei einzelnen Personen auf - weitaus spektakulärer sind jedoch Ausbrüche, bei denen eine sehr große Anzahl von Menschen betroffen ist, wie z.B. 361 Fälle in England und Wales im Jahre 2000 (HORBY et al. 2003) oder gar 200.000 Fälle bei einem einzelnen Ausbruch, welcher auf eine einzige Quelle zurückgeführt werden konnte

(HENNESSY et al. 1996).

Die statistische Erhebung in Deutschland weist die Salmonellose als am häufigsten erfasste Ursache von Durchfallerkrankungen beim Menschen aus (HARTUNG 2002). In den Industrieländern ist jedoch in den letzten Jahren ein rückläufiger Trend zu beobachten (BELL u. KYRIAKIDES 2002).

Laut Schätzungen ziehen sich allein in den USA jedes Jahr 76 Millionen Menschen eine Lebensmittelvergiftung zu, was in 325.000 Fällen zu einer stationären Behandlung und in etwa 5000 Fällen zum Tod führt (GOLDRICK 2003). In Deutschland starben allein im Jahr 2000 76 Menschen, bei denen als Todesursache *Salmonella* festgestellt wurde (HARTUNG 2002). Angesichts dieser Fakten ist die nach wie vor große Bedeutung der Salmonellose ersichtlich. In den USA sind zwar die durch *Campylobacter* und *Listeria* bedingten Erkrankungen rückläufig - ein Rückgang der *Salmonella*- bzw. *E. coli*-Fälle deutet sich jedoch nicht an (N. N. 2003).

Während die Anzahl der bakteriell bedingten Enteritiden beim Menschen in der Bundesrepublik Deutschland vor 1970 im Bereich von 12.000 pro Jahr lag und von diesen nahezu alle auf Salmonellen zurückzuführen waren, stieg die Anzahl der erfaßten Salmonellose-Fälle stetig und erreichte 1980 einen Wert von 48.537. Diesem Anstieg folgte in den darauffolgenden Jahren ein Rückgang auf 30.566 Fälle (PÖHN et al. 1991).

Seit dieser Zeit war eine kontinuierliche Zunahme der bakteriell bedingten Lebensmittelvergiftungen sowie auch insbesondere der meldepflichtigen Salmonellose zu verzeichnen (KÜHN 1995b). So stieg die Zahl der Salmonellose-Erkrankungen 1990 auf etwa 100.000, 1991 auf ca. 135.000 und fand ihren bisherigen Höhepunkt 1992 mit ungefähr 195.400 Fällen (SCHROETER et al. 1992; KÜHN 1993; RASCH 1996).

Seitdem ist ein rückläufiger Trend zu beobachten. Traten 1993 noch 140.435 Fälle auf (HARTUNG 1995), so waren es 1997 nur noch 109.499 (ROBERT KOCH INSTITUT UND BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN 1998) und 1998 ebenfalls etwa 100.000. In den Jahren 1999 und 2000 schließlich wurden 85.000 bzw. 79.500 Salmonellose-Fälle gemeldet (ROBERT KOCH INSTITUT UND BUNDESINSTITUT

FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN 2001).

Demgegenüber steht das Jahr 2001. In diesem Jahr kam erstmals die Umsetzung des Infektionsschutzgesetzes zum Tragen. So ist die Erfassung erstmals an Falldefinitionen gekoppelt, wodurch zum Vergleich mit den Vorjahreszahlen die Gesamtzahl der 2001 übermittelten Fälle ausschlaggebend ist. Diese stieg im Gegensatz zum Trend der letzten Jahre und erreichte einen Wert von 83.792. Im Jahr 2002 wurden 72.377 Salmonellose-Fälle gemeldet (ROBERT KOCH INSTITUT 2003).

Ähnliche Trends lassen sich für die letzten Jahre auch in Europa feststellen. So war im Jahr 1997 ein vorläufiger Höchststand gemeldeter Salmonellosen zu verzeichnen (FISHER 1999). Jedoch ist auch hier ein kontinuierlicher Rückgang zu verzeichnen.

2.2.3.6 Dominierender Erreger der Enteritis-Salmonellose

Im Hinblick auf die lebensmittelhygienische Bedeutung sind die derzeit in Europa vorherrschenden Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*. In Deutschland dominierte im Jahr 2002 *S. Enteritidis* mit einem Anteil von 75% (ROBERT KOCH INSTITUT 2003). Jedoch werden im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen auch die Serovare *S. Agona*, *S. St. Paul*, *S. Infantis*, *S. Manhattan* u.a. häufig in Verbindung gebracht (RASCH 1993). Darüber hinaus haben geänderte Verzehrsgewohnheiten, internationaler Handel mit Lebensmitteln wie auch der zunehmende Urlauberverkehr in den letzten Jahren zum Auftreten seltener und unerwarteter *Salmonella*-Serovare geführt.

Die Vorherrschaft einzelner Serovare unterliegt einem ständigen Wechsel (KÜHN 1995a). So wurden die Enteritis-Salmonellose-Fälle in den 70er Jahren bis Mitte der 80er Jahre durch *S. Typhimurium* dominiert (RABSCH u. KÜHN 1992). Seit etwa 1985 hat *S. Enteritidis* die Spitzenposition inne (SCHROETER et al. 1992), wobei jedoch zu bemerken ist, dass seit Beginn der 90er Jahre auch wieder ein Ansteigen der Nachweisrate des Serovares *S. Typhimurium* zu verzeichnen ist. Ursächlich kann

diese Entwicklung auf das Ende der 80er Jahre beginnende *Salmonella*-Kontrollprogramm in der Geflügelindustrie zurückgeführt werden.

Anhand der Typisierungsergebnisse des Serovars *S. Enteritidis* in den Jahren 1992 bis 1994 war hierbei die Dominanz des Phagentyps 4/6 zu verzeichnen (KÜHN 1995b). Eintragsquelle in die Lebensmittelkette stellten diesbezüglich vor allem Hühner und deren Eier dar (RASCH 1996).

Problematisch ist im Zusammenhang mit der Salmonellose der in den vergangenen zehn Jahren zu verzeichnende drastische Anstieg von Multiresistenzen in vielen europäischen Ländern (O'BRIEN u. de VALK 2003), wodurch die erfolgreiche Behandlung erkrankter Patienten stark erschwert wird. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Phagentypen des Serovars *S. Typhimurium*, insbesondere DT 104 und 204, wobei die Dominanz des bis in die 80er Jahre hinein vorherrschenden Phagotyps DT 204 mittlerweile durch den Phagotyp DT 104 abgelöst wurde (GEBREYES et al. 2000; POPPE et al. 2001). Hierbei ist der Phagotyp DT 104 häufig gegen mindestens fünf Antibiotika resistent (BELL u. KYRIAKIDES 2002). Ähnliche Tendenzen zeigen auch aktuelle Studien. So waren von 27.059 klinischen *Salmonella*-Isolaten im Jahr 2000 40% gegen mindestens eine antimikrobielle Substanz resistent und 18% zeigten Multiresistenzen gegen vier oder mehr solcher Stoffe (THRELFALL et al. 2003). Ähnliche Tendenzen finden sich z.T. auch bereits in den Produktionsstätten der Lebensmittel - von 496 *Salmonella*-Isolaten aus deutschen Hähnchenmast- und -schlachtenanlagen erwiesen sich 33,3% gegen mindestens einen antimikrobiellen Wirkstoff resistent und 78,8% der resistenten Isolate waren gegenüber drei und mehr Wirkstoffen resistent (WICHMANN-SCHAUER et al. 2001).

Angesichts dieser alarmierenden Fakten wird die Notwendigkeit der Bekämpfung der Salmonellen im gesamten Bereich der Lebensmittelproduktion deutlich. Dies schließt auch die Stufe der Desinfektion von Arbeitsflächen und -geräten im Prozeß der Lebensmittelherstellung ein. Da auch hier regelmäßig Resistenzen gegen die verwendeten Desinfektionsmittel auftreten, erscheint es überaus wünschenswert,

sich diesen Tendenzen mit einem wirkungsvollen biologischen „Desinfektionsmittel“ entgegenzustellen, welches überdies hinaus aufgrund des Fehlens chemischer Inhaltsstoffe als sehr umweltschonend anzusehen ist.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Stämme

Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene *Bdellovibrio*- (*B.*) Stämme ausgewählt, welche ein breites Wirtsspektrum aufwiesen und sich im Hinblick auf ihre Lysiseigenschaften als besonders geeignet gezeigt hatten (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ-Nr. 50701 und 50705 bzw. ATCC-Nr. 15356 und 15362). Diese beiden Stämme wurden freundlicherweise vom Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig zur Verfügung gestellt. Die auf ihre Eignung als Wirtszellen für die *Bdellovibrionen* untersuchten *Salmonellen* stammen aus der Stammsammlung des Institutes für Lebensmittelhygiene, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig. Bei diesen Stämmen handelt es sich vorrangig um Isolate aus verschiedenen Lebensmitteln, wodurch ein besonders enger Realitätsbezug zu in der Lebensmittelwirtschaft vorkommenden Keimen gegeben ist. Nähere Angaben zur Herkunft dieser Stämme sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Isolierungsquellen der *Salmonella*-Stämme

Stamm-Nr.	Huhn	Pute	Rind	Schaf	Schwein	andere	keine Angabe
1							x
2	x						
3							x
4	x						
5	x						
6	x						
7	x						
8	x*						
9	x						
10	x*						
11	x*						
12			x				
13						Igel	
14						Hygienetupfer	
15						Hygienetupfer	
16	x						
17	x						
18				x			
21	x						
22			x				
23	x*						
24	x*						
25	x*						
26	x*						
27						Fisch	
28						Remouladen- sauce	
29	x*						
30	x*						
31	x*						
32						Volleimasse	
33							x
34							x
35							x
36	x						
37	x						
38	x						
39	x						
40	x						
41	x						
42	x						
43						Gülle	
44			x				

Stamm-Nr.	Huhn	Pute	Rind	Schaf	Schwein	andere	keine Angabe
45	x						
46			x				
47			x				
48			x				
49					x		
50					x		
51		x					
52		x					
53							x
54	x*						
55	x*						
56						Hartkäse	
57						Tzaziki	
58						klare Suppe	
59	x*						
60			x				
61	x*						
62	x*						
63						Weincreme	
64	x*						
65					x		
66					x		
67					x		
68					x		
69					x		
70					x		
71					x		
72					x		
73					x		
74					x		
75					x		

* Hühnerei

Zur Prüfung gelangten 73 Stämme, von denen 49 dem Serovar *S. Enteritidis*, 15 dem Serovar *S. Typhimurium* und 6 dem Serovar *S. Agona* angehörten sowie je ein Stamm der Serovare *S. Newington*, *S. Cholerae suis* und *S. Dublin*. Durch die Auswahl der genannten Stämme konnte somit besonders der Bedeutung der Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* als häufigen Verursachern von Lebensmittel-assoziierten Erkrankungen Rechnung getragen werden.

Die Typisierung einzelner noch nicht phagotypisierter *S. Typhimurium*-Stämme

erfolgte im Robert Koch-Institut, Wernigerode. Eine Übersicht über die einzelnen Phagotypen der Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* ist den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen.

Des Weiteren wurde ein *Staphylococcus aureus*-Stamm auf seine Lysierbarkeit untersucht, welcher als Negativkontrolle diente.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Phagotypen des Serovars *S. Enteritidis* mit den zugehörigen Untersuchungsnummern der einzelnen Stämme

1/ 1	3/ 2	4/ 6	6/ 4	7	17	30/17	34/ 17
5	11	39	31	10	16	66	36
9		4	32	12	17		37
13		6		42			2
14		7		45			38
15		8		46			3
44		40		47			26
		41		23			56
		43		24			27
		54		25			28
		58		55			57
		29		64			30
		60					61
		63					62

Tabelle 7: Zugehörigkeit der einzelnen Stämme zu verschiedenen Phagotypen des Serovars *S. Typhimurium*

DT 012	DT 049	DT 104	DT 120	DT 204
70	1	59	67	48
	21	73	68	18
			69	65
			71	
			72	
			74	
			75	

3.2 Nachweismethode

3.2.1 Kultivierungsbedingungen für den Einsatz der Wirtsbakterien im Zweikomponentensystem

Da die Kultivierungsbedingungen des Wirtes deutlichen Einfluß auf die Infektionsfähigkeit der *Bdellovibrionen* haben (TORRELLA et al. 1978), wurden diese möglichst konstant gehalten.

Die Wirtszellen wurden auf Yeast extract-glucose-calcium carbonat agar (YDC-Agar; STOLP u. STARR 1963) überimpft und für 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Der YDC-Agar nach Stolp und Starr setzt sich wie folgt zusammen:

Yeast extract (Difco, Detroit, USA)	1%
Glucose	2 %
CaCO ₃ (leicht gefällt)	2%
Agar (Bactoagar, Difco)	1,5%

Im Anschluß wurden auf die Petrischalen je ca. 5 ml Aqua dest. gegeben, die Wirtszellen vorsichtig abgewaschen und in sterile Zentrifugationsröhrchen mit Schraubverschluß überführt. Die weitere Behandlung der so gewonnenen Wirtszellsuspension bestand in der Ergänzung des Volumens auf 45 ml mit Aqua dest., dem Schütteln (VF2, IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland) und der Zentrifugation bei 5000 x g für 10 Minuten bei 5°C (Universal 16 R, Hettich, Deutschland). Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt.

3.2.2 Doppelschichtagar-Methode

Obwohl die Überprüfung der Lysierbarkeit von Wirtszellen durch *Bdellovibrio* in Flüssigkulturen eine höhere Sensitivität aufweist, gelangte für die Bestimmung der Plaquezahl und Plaquegröße sowie für die Kultivierung der *Bdellovibrionen* die von STOLP und PETZOLD (1962) beschriebene modifizierte Doppelschichtagar-Methode zum Einsatz, welche sich für die Routinekultivierung und Diagnostik von

Bdellovibrionen seit langem bewährt hat. Diese Methode ermöglicht im Vergleich mit der Kultivierung in flüssigen Medien eine höhere Konstanz der Umweltbedingungen und erscheint im Hinblick auf die Anwendung von Bdellovibrionen auf Oberflächen als praxisnäher, da sie den Voraussetzungen im Anwendungsbereich eher entspricht.

Dem Doppelschichtagar, welcher aus einer Ober- und einer Unterschicht besteht, wird zur Förderung der Aktivität der Bdellovibrionen Tris-YP-Medium in beide Schichten zugesetzt. Das Tris-YP-Medium setzt sich wie folgt zusammen:

Yeast extract (Difco)	3.0 g
Peptone (Difco)	0.6 g
Tris-buffer (50 mM, pH 7,5)	1000.0 ml

3.2.2.1 Herstellung des Unterschichtagars

Die Herstellung des Unterschichtagars folgte den Angaben von SEIDLER und STARR (1969b). Hierzu wurden 12 g Bactoagar (Difco, Detroit, USA) zu 1000 ml destilliertem Wasser, welches 3 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$ und 2 mM $CaCl_2 \times 2H_2O$ enthielt, zugegeben, gelöst und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C erfolgte der Zusatz von 100 ml sterilem Tris-YP-Medium, und der so hergestellte Agar wurde in die einzelnen Petrischalen gegossen. Vor ihrem Einsatz lagerten die fertigen Agarplatten 2-3 Tage unter sterilen Kautelen bei Raumtemperatur.

3.2.2.2 Herstellung des Oberschichtagars

Auch die Herstellung des Oberschichtagars folgte den Angaben von SEIDLER und STARR (1969b). Wiederum wurde das Aqua dest. mit 3 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$ und 2 mM $CaCl_2 \times 2H_2O$ versetzt. Zu 1000 ml dieser Mischung wurden 6 g Bactoagar (Difco, Detroit, USA) gegeben und gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C erfolgte die

Zugabe von 100 ml sterilem Tris-YP-Medium. Von diesem Gemisch wurden jeweils 5 ml in sterile Röhren abgefüllt und autoklaviert.

Um den Zusatz der für eine optimierte *Bdellovibrio*-Aktivität benötigten Mg^{2+} und Ca^{2+} zu erleichtern, wurde in einem vorgeschalteten Arbeitsschritt zuerst ein zehnfach konzentriertes „Grundmedium“, welches die vorgenannten Kationen enthielt, hergestellt. Vor der Bereitung der Ober- bzw. Unterschicht erfolgte die Mischung von jeweils 100 ml dieser Stammlösung mit 900 ml Aqua dest. Dieses Gemisch diente als Ausgangslösung für die weitere Verarbeitung.

3.2.2.3 Tropfmethode

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf der Anwendung der Tropfmethode. Zuvor waren in einem Vorversuch die Ergebnisse der Bestimmung der Plaquezahl sowie Plaquegröße zwischen Tropf- und Gießmethode verglichen worden, wobei zwischen diesen Methoden keine unterschiedlichen Ergebnisse festzustellen waren.

Die den Oberschichtagar enthaltenden Röhren wurden bei 100°C erhitzt bis sich der Agar vollständig gelöst hatte und anschließend, um eine optimale Verarbeitungstemperatur zu erreichen sowie den Übergang des Agars in den festen Aggregatzustand zu verhindern, in ein 50°C warmes Wasserbad (WB 7-45, Memmert, Schwabach, Deutschland) verbracht. Die Vorbereitung der Wirtszellen fand auf die bereits beschriebene Weise statt. Die Resuspension des nach dem letzten Waschschrift verbliebenen Pellets erfolgte in Aqua dest. In der Folge gelangte diese Zellsuspension schnellst möglich zur Verarbeitung bzw. wurde kurzzeitig bei 8°C zwischengelagert. Von der Wirtszellsuspension wurde je 1 ml in die die Oberschicht enthaltenden Röhren zupipettiert, intensiv geschüttelt (VF 2, IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland) und nach dem Abflammen des Röhrenrandes blasenfrei auf die Unterschicht gegossen. Um ein gleichmäßiges Festwerden der Oberschicht zu ermöglichen, blieben die fertigen Agarplatten binnen der sich anschließenden 30 Minuten sicher vor evtl. Bewegung auf einer ebenen Fläche stehen. Von der entsprechend verdünnten *Bdellovibrio*-Suspension wurden je 10 µl

mittels einer Pipette auf die Oberschicht der Doppelschichtagarplatten getropft, ohne dabei den Agar zu beschädigen. Das Auftragen dieses Tropfens erfolgte linienförmig auf dem Agar, um beim späteren Ablesen das Auszählen der einzelnen Plaques sowie die Bestimmung des Plaquedurchmessers zu erleichtern.

3.2.2.4 Gießmethode

Die Herstellung der Ober- und Unterschicht erfolgte wie bereits beschrieben.

Nach der Inkubation des gelösten Oberschichtagars bei 50°C wurden diesem 100 µl der *Bdellovibrio*-Suspension sowie 1000 µl der gewünschten Wirtszellen zugesetzt, intensiv gemischt und zügig auf die Unterschicht gegossen. Diese Agarplatten wurden wiederum 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei 30°C aerob bebrütet.

3.3 Passagierung der *Bdellovibrio*-Stämme

Zur Passagierung der *Bdellovibrio*-Stämme wurde stets der *Salmonella*-Stamm 1 verwendet. Hierbei gelangten ebenfalls die Doppelschichtagarplatten in Verbindung mit der Tropfmethode zum Einsatz. Nach der Bebrütung dieser Doppelschichtagarplatten war es möglich, den Rand der Lysiszonen mittels einer Pipette auszustechen und in 10 mM *N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES-Puffer, Merck, Darmstadt, Deutschland), welche auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt worden war, zu verbringen. Im Anschluß wurde diese Suspension intensiv geschüttelt. Nachdem 20 µl für die Untersuchung im Phasenkontrastmikroskop (Jenamed 2, Zeiss, Jena, Deutschland) entnommen worden waren, erfolgte die Filtration des verbliebenen Restes der Suspension durch einen sterilen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Die gewählte Porengröße erlaubt die Passage von *Bdellovibrio*, währenddessen die Wirtszellen zurückgehalten werden. Das so gewonnene Filtrat wurde wiederum auf Doppelschichtagarplatten, welche 10^{10}

Wirtszellen des *Salmonella*-Stamm 1 enthielten, getropft, vier Tage bei 30°C aerob bebrütet und anschließend bei 4°C gelagert.

3.4 Einstellen der Wirtszellzahl

Um den gleichbleibenden Einsatz von 5×10^9 Wirtszellen pro Doppelschichtagarplatte zu gewährleisten, wurden für jeden *Salmonella*-Stamm sowie für die zur Bestimmung der PFU verwendeten Wirtszellen Extinktionskurven erstellt.

Die auf ihre Lysierbarkeit durch *Bdellovibrio* zu prüfenden Stämme wurden auf Glucose-Yeast-Extrakt-Agarplatten überimpft und 24 Stunden aerob bei 30°C bebrütet. Danach erfolgte die Gewinnung der Wirtszellen auf die bereits oben beschriebene Weise und die Resuspension des nach dem letzten Zentrifugieren erhaltenen Pellets in Aqua dest. Von dieser Suspension wurden zwei Verdünnungsreihen in Zehnerschritten bis zu einer Endverdünnung von 10^{-8} angefertigt. Von den einzelnen Verdünnungsstufen gelangten jeweils 100 µl zum Ausspateln auf vier Nähragarplatten sowie zur darauf folgenden 24stündigen aeroben Bebrütung bei 30°C und anschließenden Bestimmung der Zahl der koloniebildenden Einheiten. Schließlich fand die Bildung des arithmetischen Mittels aus den Einzelwerten der Keimzählung statt.

Parallel hierzu wurde der Extinktionswert der Ausgangssuspension im Photometer (Pharmacia Novaspec II, Pharmacia LKB Biochrom, Cambridge, England) bei 600 nm gemessen. Im weiteren Verlauf fanden eine Verdünnung dieser Ausgangssuspension zu gleichen Teilen mit Aqua dest. und wiederum die Bestimmung des Extinktionswertes bei 600 nm statt. Dieser Vorgang wurde weitere achtmal durchgeführt, so daß insgesamt 10 Meßwerte pro Meßreihe vorlagen. Diese Vorgehensweise wurde anhand der gleichen Ausgangssuspension wiederholt.

Die erhaltenen Keimzahlen wurden den ermittelten Extinktionswerten gegenübergestellt, wobei den folgenden Meßwerten jeweils die Hälfte der vorangegangenen CFU zugeordnet wurde. Beim Wert 5×10^9 der x-Achse konnte somit der gewünschte Extinktionswert ermittelt werden.

Für die eigentliche Bestimmung der Plaquezahlen und -größen wurden die Wirtszellsuspensionen dann wiederum unter Zuhilfenahme des Photometers (Pharmacia Novaspec II, Pharmacia LKB Biochrom, Cambridge, England) entsprechend bis auf den für diesen Wirtszellstamm ermittelten Extinktionswert verdünnt.

3.5 Einstellen der *Bdellovibrio*-Zahl

Um eine möglichst genaue Bestimmung der Anzahl der tatsächlich zur Plaquebildung befähigten *Bdellovibrionen* zu erreichen, gelangte die Doppelschichtagar-Methode zum Einsatz. Von dem beim Passagieren gewonnenen Filtrat wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten bis zu einer Endverdünnung von 10^{-4} hergestellt. Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils 10 μl im Doppelansatz auf Doppelschichtagarplatten, welche als Wirtszellen *Salmonella* Enteritidis, *E. coli*, *Ps. fluorescens*, *Citrobacter freundii* oder *Proteus mirabilis* in einer Konzentration von 5×10^9 Zellen pro Platte enthielten, getropft, wobei bei jedem Einstellen der *Bdellovibrio*-Zahl alle fünf genannten Spezies Verwendung fanden. Diese hatten sich in Vorversuchen als für die beiden *Bdellovibrio*-Stämme gut geeignete Wirtszellen erwiesen. Nach 4 Tagen aerober Bebrütung bei 30°C wurde die *Bdellovibrio*-Zahl als arithmetisches Mittel der plaque forming units (PFU) bestimmt. Daraufhin fand eine Verdünnung des Ausgangsfiltrates mit 10 mM HEPES auf den gewünschten Wert von 5×10^5 PFU ml^{-1} statt.

3.6 Bestimmung der Plaquezahl

Da ein unterschiedlicher Grad der Lysierbarkeit der einzelnen *Salmonella*-Stämme insbesondere beim Vergleich der beiden *Bdellovibrio*-Stämme zu erwarten bzw. nicht auszuschließen war, diente die Verdünnung mit der gewünschten Konzentration von 5×10^5 PFU ml^{-1} wiederum als Ausgang einer Verdünnungsreihe in Zehnerschritten,

wobei die Endverdünnung 10^{-4} betrug. Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils 10 µl auf zehn Doppelschichtagarplatten, in welchen 5×10^9 Keime des jeweils zu prüfenden Wirtszellstammes enthalten waren, getropft.

Die Ablesung der Plaquezahl erfolgte am 4. Tag der aeroben Bebrütung bei 30°C. Darüber hinaus fand an den Tagen 8 und 11 eine nochmalige Kontrolle statt.

Dieser Versuchsansatz wurde zeitlich versetzt wiederholt. Aus diesen zwei Ansätzen wurde die Plaquezahl wiederum als arithmetisches Mittel der plaque forming units (PFU) bestimmt.

3.7 Bestimmung der Plaquegröße

Die Bestimmung der Plaquegröße erfolgte in der Verdünnungsstufe, in welcher auch die Plaquezahl abgelesen wurde. Für die Feststellung der Plaquegröße diente jeweils der Median. Analog zur Bestimmung der Plaquezahl fand die Messung der Plaquegröße ebenfalls am 4., 8. und 11. Tag statt. Auch bei diesem Merkmal wurden die Doppelschichtagarplatten aus beiden Ansätzen einbezogen. Die Auswertung dieses Merkmals erfolgte anhand des Wertes vom Tag 11.

3.8 Biostatistische Auswertung

Die biostatistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Statistikprogrammen SPSS für Windows 9.0 sowie Excel 97. Die Prüfung auf Normalverteilung mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests ergab deutliche Abweichungen der Werte von der Normalverteilung.

Als statistische Lageparameter wurden neben dem arithmetischen Mittelwert, die Standardabweichung, der Median als Zentralwert sowie das erste und dritte Quartil, das Minimum und Maximum berechnet. Für die Prüfung auf Signifikanz gelangte der parameterfreie (verteilungsunabhängige) U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon zum Einsatz.

4. ERGEBNISSE

Alle untersuchten *Salmonella*-Stämme erwiesen sich ohne Ausnahme als durch beide *Bdellovibrio*-Stämme lysierbar, was sich in der Plaquebildung auf den verwendeten Doppelschichtagarplatten äußerte. Hierbei war festzustellen, dass der *Bdellovibrio*-Stamm 50701 bei nahezu allen getesteten *Salmonella*-Stämmen höhere PFU-Werte sowie größere Plaquedurchmesser als der Stamm 50705 verursachte, welches jedoch nur im Falle der Phagotypen 7 und 34/17 des Serovars *S. Enteritidis* sowie DT 049 und DT 204 des Serovars *S. Typhimurium* durch eine statistisch nachweisbare Signifikanz zu belegen war. Die Abbildung 5 zeigt typische kreisrunde Plaques, welche von den Prädatoren verursacht wurden, und verdeutlicht beispielhaft die Unterschiede der beiden *Bdellovibrio*-Stämme im Hinblick auf die Plaquegröße.

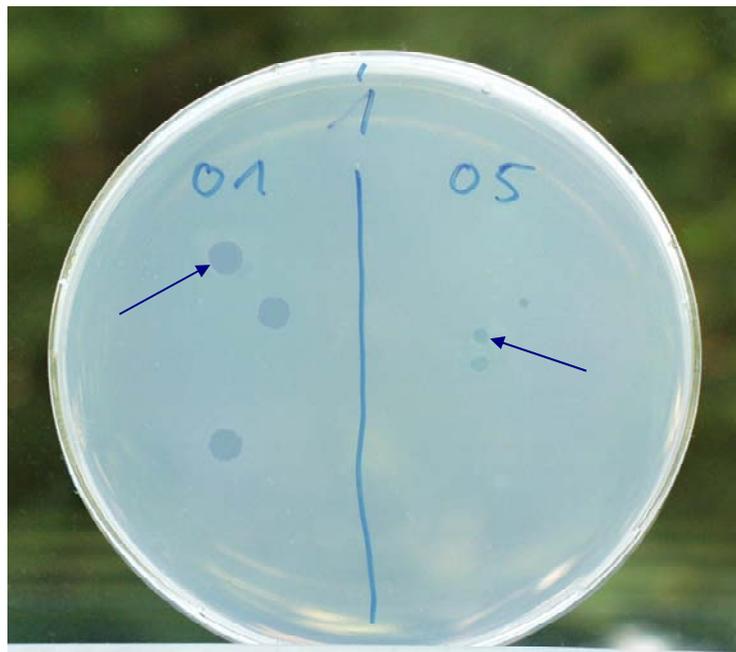


Abb. 5: Doppelschichtagar-Platte mit durch *Bdellovibrio* hervorgerufenen Plaques
links: *B.*-Stamm 50701 rechts: *B.*-Stamm 50705
Wirtszellen: *S. Enteritidis* (Stamm-Nr. 1)

Alle gebildeten Plaques zeichneten sich durch klare Lysiszonen aus. Bereits zum Zeitpunkt der ersten Ablesung der Doppelschichtagar-Platten am Tag vier der Inkubation zeigte sich für beide *Bdellovibrio*-Stämme auf allen *Salmonella*-Stämmen Plaquebildung - eine verzögerte Plaquebildung wurde nicht beobachtet. Zwischen den beiden zeitlich versetzten Versuchsansätzen waren keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen.

Wie erwartet, ließ sich der als Negativkontrolle benutzte *Staphylococcus aureus*-Stamm nicht lysieren.

4.1 Ergebnisse der Lysierbarkeit der einzelnen Stämme

In der Tabelle 8 sind die erzielten Plaquezahlen (Anzahl der von 1 ml der 5×10^5 PFU ml^{-1} enthaltenden Ausgangs-*Bdellovibrio*-Suspension gebildeten Plaques) und -größen (Durchmesser der Plaques) auf den einzelnen *Salmonella*-Stämmen des Serovars *S. Enteritidis* unter Nennung der jeweiligen Phagotypen aufgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse der Serovare *S. Typhimurium* und *S. Agona* sowie weiterer *Salmonella*-Serovare finden sich in den Tabellen 9 bzw. 10.

Tabelle 8: Übersicht über die erzielten Plaquezahlen und -größen auf den Stämmen des Serovars S. Enteritidis

Phagotyp	Stamm-Nr.	<i>Bdellovibrio</i> -Stamm 50701		<i>Bdellovibrio</i> -Stamm 50705	
		Plaquezahl x10 ^{5*}	Plaquegröße in cm ²	Plaquezahl x10 ^{5*}	Plaquegröße in cm ²
1/1	5	3,2±1,2	2,4	1,7±1,3	2,0
	9	3,0±1,4	1,9	3,2±1,5	1,6
	13	2,3±1,1	2,3	2,5±1,0	2,1
	14	1,3±0,5	2,4	2,1±1,2	2,1
	15	2,9±1,5	2,2	3,8±1,4	2,1
	44	3,8±1,5	2,0	3,7±1,3	1,7
3/2	11	4,4±1,5	2,4	4,2±1,7	2,0
4/6	4	2,1±1,5	1,7	1,8±1,3	1,6
	6	3,9±1,5	2,4	2,8±1,2	2,2
	7	2,2±1,2	2,3	3,2±1,8	2,1
	8	2,2±1,0	2,4	1,3±0,6	2,1
	29	2,2±1,0	2,4	2,5±1,3	2,1
	39	3,9±1,5	2,3	4,7±1,0	2,1
	40	5,3±1,7	2,3	4,9±1,5	1,8
	41	4,8±1,3	2,3	3,9±1,6	1,9
	43	5,0±1,3	2,3	4,0±1,6	1,8
	54	3,8±1,0	2,4	3,7±1,3	2,1
	58	3,5±0,9	1,8	3,0±1,2	1,7
60	3,3±1,2	2,4	2,7±1,0	1,8	
4/6	63	5,0±1,3	2,3	4,7±1,2	2,1
6/4	31	5,3±1,3	2,5	5,2±1,6	2,3
	32	4,0±1,6	1,9	3,9±1,7	1,7
7	10	3,6±1,5	2,2	4,4±1,6	2,1
	12	2,2±1,1	2,2	2,7±1,4	2,0
	23	2,3±0,9	2,3	1,8±0,9	2,0
	24	2,5±1,4	2,2	2,4±1,1	2,0
	25	3,9±1,5	2,4	2,3±1,2	2,1
	42	4,7±1,6	2	4,1±1,3	1,8
	45	3,8±1,8	2,2	2,6±1,1	1,9
	46	4,2±1,1	2,1	1,7±0,9	1,9
	47	5,0±1,1	2,1	4,7±1,3	1,9
	55	3,5±1,3	2,2	2,2±0,5	1,9
	64	4,4±1,0	2,2	3,5±1,0	1,9
17	16	2,0±1,0	2,3	2,7±1,3	1,9
	17	2,7±1,0	2,2	2,4±1,2	1,9
30/17	66	4,7±1,1	2,1	4,4±1,3	1,7
34/17	2	5,0±1,4	2,8	4,8±1,6	2,7
	3	4,7±1,4	2,3	3,8±1,2	1,9
	26	3,7±1,5	2,5	2,1±1,4	2,1
	27	4,5±1,5	2,4	3,4±1,2	2,2
	28	4,4±1,7	2,4	3,6±1,5	2,1

34/17	30	1,9±1,3	2,4	1,4±0,7	2,1
	36	4,1±1,4	2,1	3,4±1,5	1,9
	37	5,0±1,2	2,4	3,6±1,1	2
	38	4,1±1,6	2,2	2,2±0,6	1,9
	56	4,1±1,6	2	4,3±1,3	1,8
	57	4,2±1,1	2	4,4±1,1	1,9
	61	4,1±1,5	2	4,5±1,1	1,8
	62	4,9±1,3	2,3	4,8±1,3	1,9

* Bestimmung der Plaquezahl pro ml als arithmetisches Mittel der PFU mit Angabe der Standardabweichung

▫ Plaquegröße am Tag 11 (Median)

Tabelle 9: Übersicht über die erzielten Plaquezahlen und -größen auf den Stämmen des Serovars *S. Typhimurium*

Phagotyp	Stamm-Nr.	<i>Bdellovibrio</i> -Stamm 50701		<i>Bdellovibrio</i> -Stamm 50705	
		Plaquezahl x10 ^{5*}	Plaquegröße in cm [▫]	Plaquezahl x10 ^{5*}	Plaquegröße in cm [▫]
DT 012	70	2,9±1,1	2,4	1,8±0,8	1,8
DT 049	1	3,8±1,6	2,1	3,3±1,6	1,6
	21	3,2±1,3	2,4	1,7±0,8	2,1
DT 104	59	5,1±1,2	2,1	4,0±1,1	1,8
	73	2,4±0,9	2,2	2,2±0,9	1,9
DT 120	67	3,5±1,3	2,2	3,2±1,1	1,8
	68	3,8±1,3	2,3	3,4±1,2	1,8
DT 120	69	3,6±1,4	2,2	3,0±1,4	1,9
	71	3,9±1,2	2,3	3,8±1,5	1,8
	72	4,4±1,3	2,2	3,3±0,7	1,9
	74	3,3±1,2	2,4	2,3±0,8	1,8
	75	2,3±1,1	2,1	1,7±0,7	1,9
DT 204	18	2,3±1,1	1,8	3,0±1,3	1,2
	48	4,8±1,4	2,2	3,5±1,4	1,8
	65	5,1±1,1	2,2	3,9±1,1	1,9

* Bestimmung der Plaquezahl pro ml als arithmetisches Mittel der PFU mit Angabe der Standardabweichung

▫ Plaquegröße am Tag 11 (Median)

Tabelle 10: Übersicht über die erzielten Plaquezahlen und -größen auf den Stämmen des Serovars S. Agona u.a.

Serovar	Stamm-Nr.	<i>Bdellovibrio</i> -Stamm 50701		<i>Bdellovibrio</i> -Stamm 50705	
		Plaquezahl $\times 10^{5*}$	Plaquegröße in cm^{\square}	Plaquezahl $\times 10^{5*}$	Plaquegröße in cm^{\square}
S. Agona	22	$3,8 \pm 1,4$	2,3	$3,0 \pm 1,1$	2,1
	49	$2,5 \pm 1,0$	2,4	$2,4 \pm 1,0$	1,7
	50	$4,2 \pm 1,5$	2,4	$1,9 \pm 0,8$	1,9
	51	$4,0 \pm 1,5$	2,4	$2,4 \pm 1,1$	1,8
	52	$4,4 \pm 1,1$	2,3	$2,9 \pm 1,3$	2,1
	53	$4,2 \pm 1,0$	2,4	$3,8 \pm 1,2$	1,8
S. Newington	33	$2,8 \pm 1,2$	2,1	$3,7 \pm 1,1$	1,7
S. Cholerae suis	34	$4,5 \pm 1,5$	2,2	$4,4 \pm 1,4$	2,1
S. Dublin	35	$2,6 \pm 1,3$	1,6	$2,9 \pm 1,2$	1,7

* Bestimmung der Plaquezahl pro ml als arithmetisches Mittel der PFU mit Angabe der Standardabweichung

\square Plaquegröße am Tag 11 (Median)

4.2 Ergebnisse der Lysierbarkeit der einzelnen Phagotypen

Im Hinblick auf die Lysierbarkeit der einzelnen Phagotypen der Serovare S. Typhimurium und S. Enteritidis ließen sich die in den Abbildungen 6 und 7 dargestellten Mittelwerte bestimmen. Hierbei ist festzustellen, dass bei beiden *Bdellovibrio*-Stämmen in Bezug auf das Serovar S. Typhimurium die höchste Plaquezahl beim Phagotyp DT 204, gefolgt vom Phagotyp DT 104 erzielt wurde.

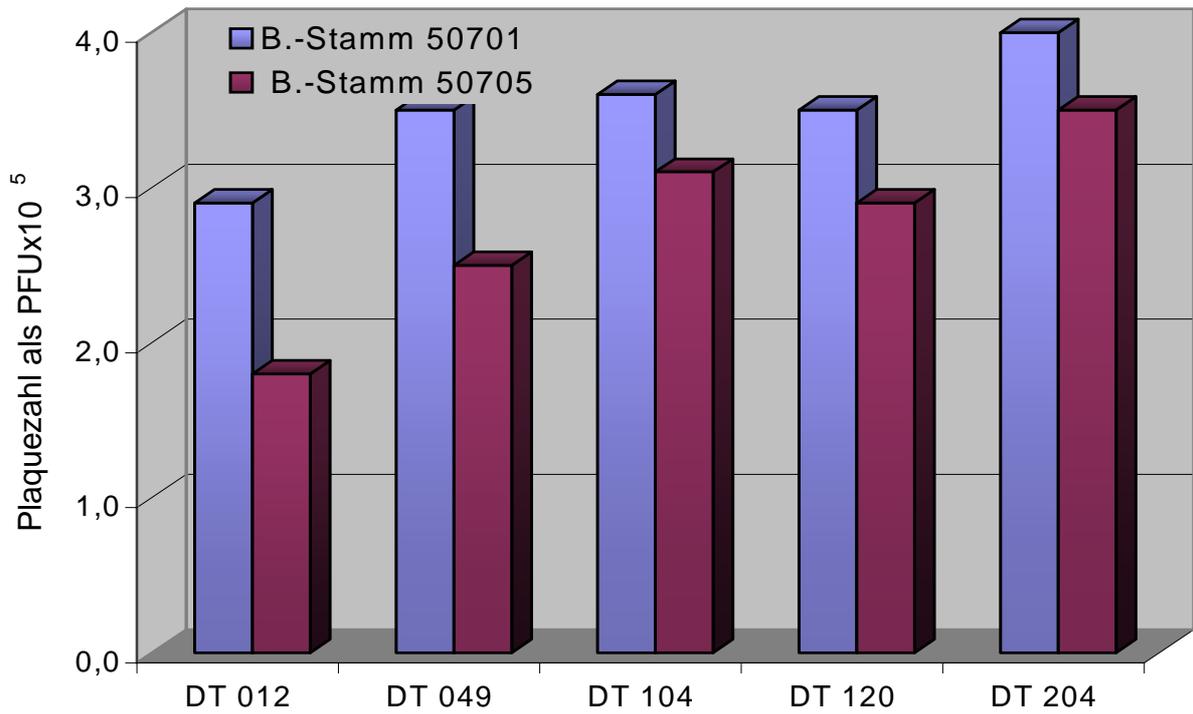


Abb. 6: Plaquezahlen auf den Phagotypen des Serovars *S. Typhimurium*

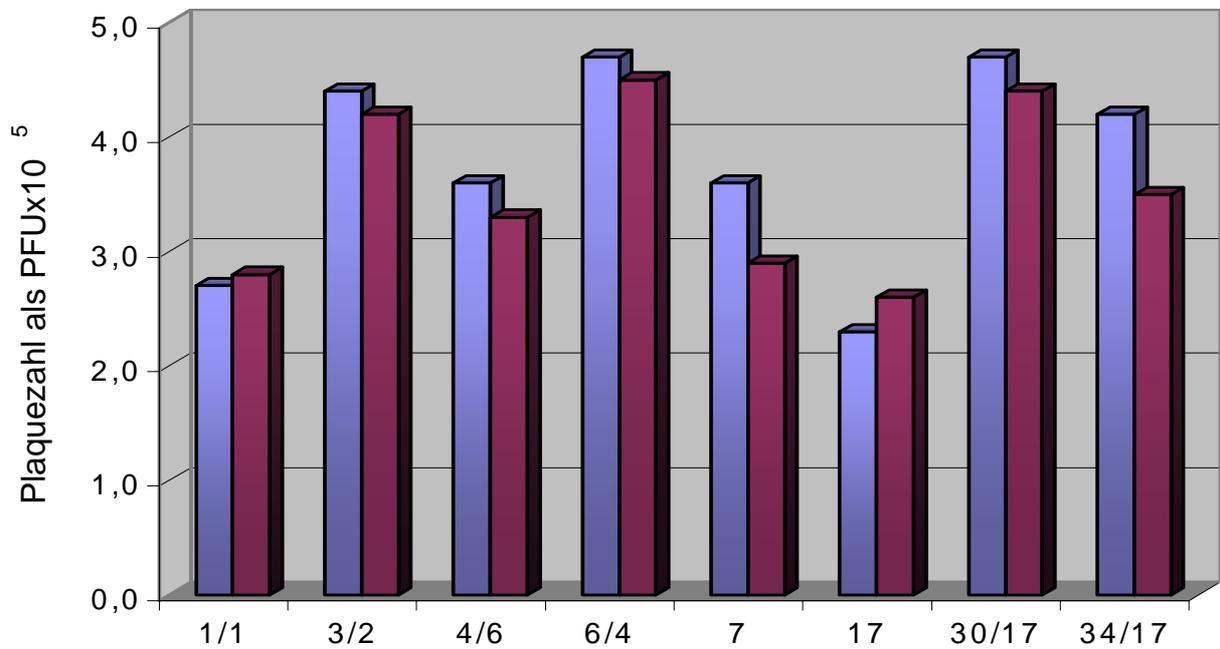


Abb. 7: Plaquezahlen auf den Phagotypen des Serovars *S. Enteritidis*

Auch im Bezug auf die Plaquebildungsrate auf den einzelnen Phagotypen des Serovars *S. Enteritidis* verhalten sich beide *Bdellovibrio*-Stämme bezüglich des Rankings dieser nahezu gleich. So lassen sich die Phagotypen 6/4 und 30/17 durch *Bdellovibrio*-Stamm 50701 am besten lysieren. Ihnen folgt der Phagotyp 3/2. Die höchste Plaquezahl erreicht der *Bdellovibrio*-Stamm 50705 auf dem Phagotyp 6/4, knapp gefolgt vom Phagotyp 30/17. An dritter Stelle findet sich der Phagotyp 3/2.

Um die Lyse auf den Phagotypen der Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* zu vergleichen, wurden die Werte der Plaquezahlen einer statistischen Analyse unterzogen. Die Tabellen 11 und 12 geben Aufschluß über das Vorliegen signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Phagotypen.

Tabelle 11: Statistisch signifikante Unterschiede der Plaquezahlen auf den Phagotypen bei der Lyse durch *B.*-Stamm 50701

		S. Typhimurium				S. Enteritidis							
		DT 049	DT 104	DT 120	DT 204	1/1	3/2	4/6	6/4	7	17	30/17	34/17
S. Typhimurium	DT 012	n.s.	n.s.	n.s.	s.	n.s.	s.	n.s.	s.	n.s.	n.s.	s.	s.
	DT 049	-	n.s.	n.s.	n.s.	s.	n.s.	n.s.	s.	n.s.	s.	s.	s.
	DT 104		-	n.s.	n.s.	s.	n.s.	n.s.	s.	n.s.	s.	s.	s.
	DT 120			-	s.	s.	s.	n.s.	s.	n.s.	s.	s.	s.
	DT 204				-	s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	s.	n.s.	n.s.
S. Enteritidis	1/1					-	s.	s.	s.	s.	n.s.	s.	s.
	3/2						-	n.s.	n.s.	n.s.	s.	n.s.	n.s.
	4/6							-	s.	n.s.	s.	s.	s.
	6/4								-	s.	s.	n.s.	n.s.
	7									-	s.	s.	s.
	17										-	s.	s.
	30/17											-	n.s.

s. statistisch signifikant

n.s. nicht statistisch signifikant

Tabelle 12: Statistisch signifikante Unterschiede der Plaquezahlen auf den Phagotypen bei der Lyse durch *B.*-Stamm 50705

		S. Typhimurium				S. Enteritidis							
		DT 049	DT 104	DT 120	DT 204	1/1	3/2	4/6	6/4	7	17	30/17	34/17
S. Typhimurium	DT 012	n.s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.	s.
	DT 049	-	s.	s.	s.	n.s.	s.	s.	s.	s.	n.s.	s.	s.
	DT 104		-	n.s.	n.s.	n.s.	s.	n.s.	s.	n.s.	n.s.	s.	n.s.
	DT 120			-	s.	n.s.	s.	s.	s.	n.s.	n.s.	s.	s.
	DT 204				-	s.	n.s.	n.s.	s.	s.	s.	s.	n.s.
S. Enteritidis	1/1					-	s.	s.	s.	n.s.	n.s.	s.	s.
	3/2						-	s.	n.s.	s.	s.	n.s.	n.s.
	4/6							-	s.	s.	n.s.	s.	n.s.
	6/4								-	s.	s.	n.s.	s.
	7									-	n.s.	s.	s.
	17										-	s.	s.
	30/17											-	s.

s. statistisch signifikant

n.s. nicht statistisch signifikant

Darüber hinaus wurden auf den Phagotypen der Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* die in den Abbildungen 8 und 9 dargestellten Plaquegrößen ermittelt.

Die größten Plaques bildete *Bdellovibrio*-Stamm 50701 auf dem Phagotyp DT 104 des Serovars *S. Typhimurium* und dem Phagotyp 17 des Serovars *S. Enteritidis*. Diesen folgten die Phagotypen DT 049 und DT 120 bzw. 34/17. Der *Bdellovibrio*-Stamm 50705 erzielte hingegen die größten Plaques auf den Wirtszellen des Phagotyps DT 120 des Serovars *S. Typhimurium*. Weiterhin steht im Gegensatz zu den Ergebnissen des Stammes 50701 beim Stamm 50705 der Phagotyp 1/1 des Serovars *S. Enteritidis* an erster Stelle.

Auffallend ist im Hinblick auf die Plaquegrößen, dass die Werte sehr eng zusammen

liegen und dass für die Unterschiede der Plaquegrößen der einzelnen Phagotypen keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte.

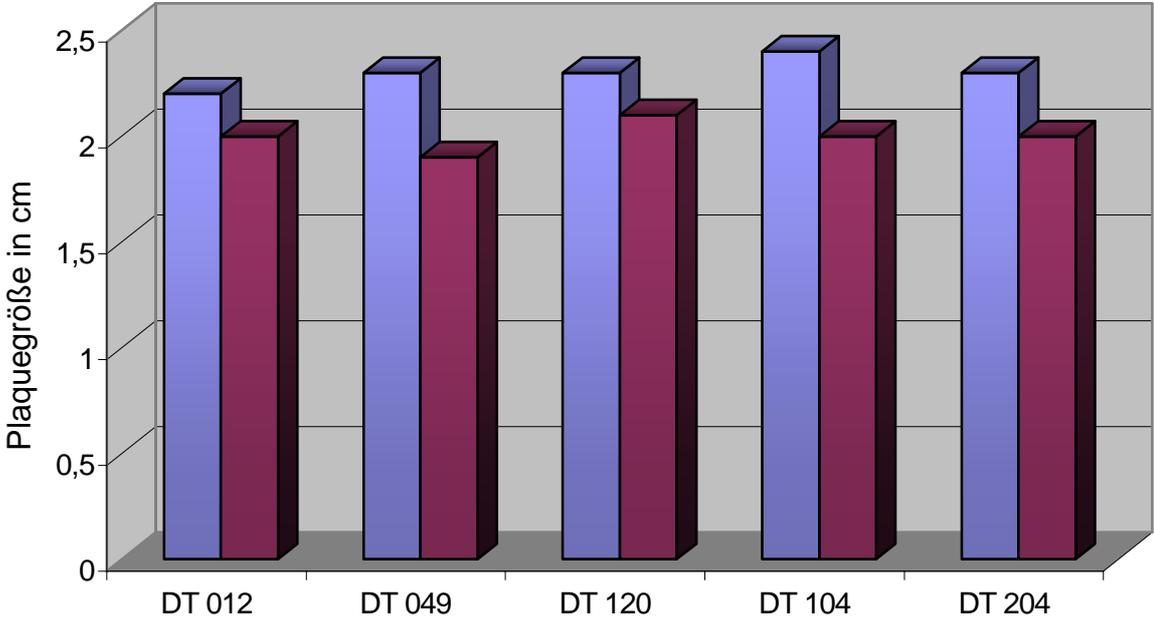


Abb. 8: Plaquegrößen auf den Phagotypen des Serovars *S. Typhimurium*, Legende s. Abb. 9

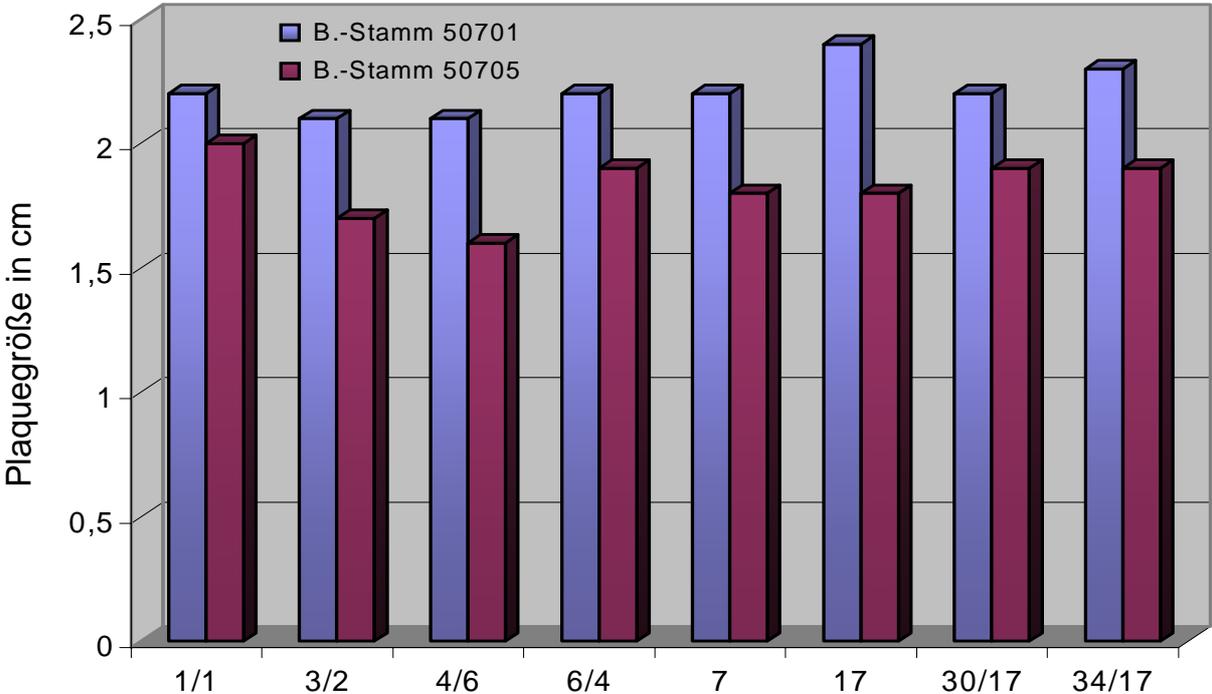


Abb. 9: Plaquegrößen auf den Phagotypen des Serovars *S. Enteritidis*

4.3 Ergebnisse der Lysierbarkeit der verschiedenen Serovare

Basierend auf den für die einzelnen *Salmonella*-Stämme ermittelten Werte wurden auf den Serovaren *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Agona* die aus den Abbildungen 10 und 11 zu entnehmenden Plaquezahlen und -größen errechnet.

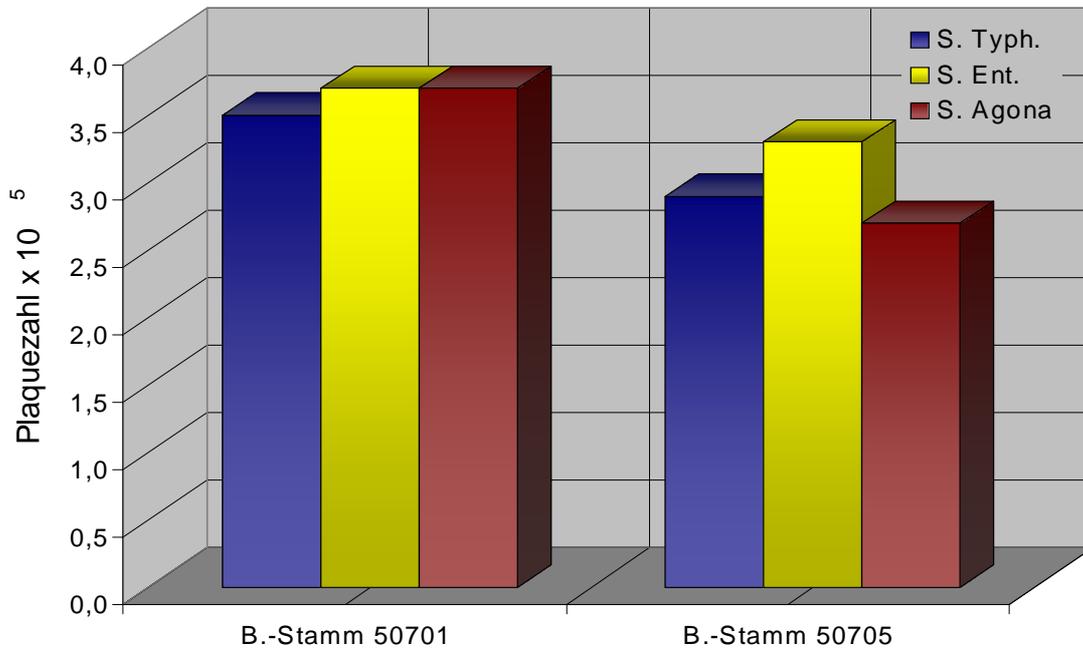


Abb. 10: Plaquezahlen auf den verschiedenen Serovare

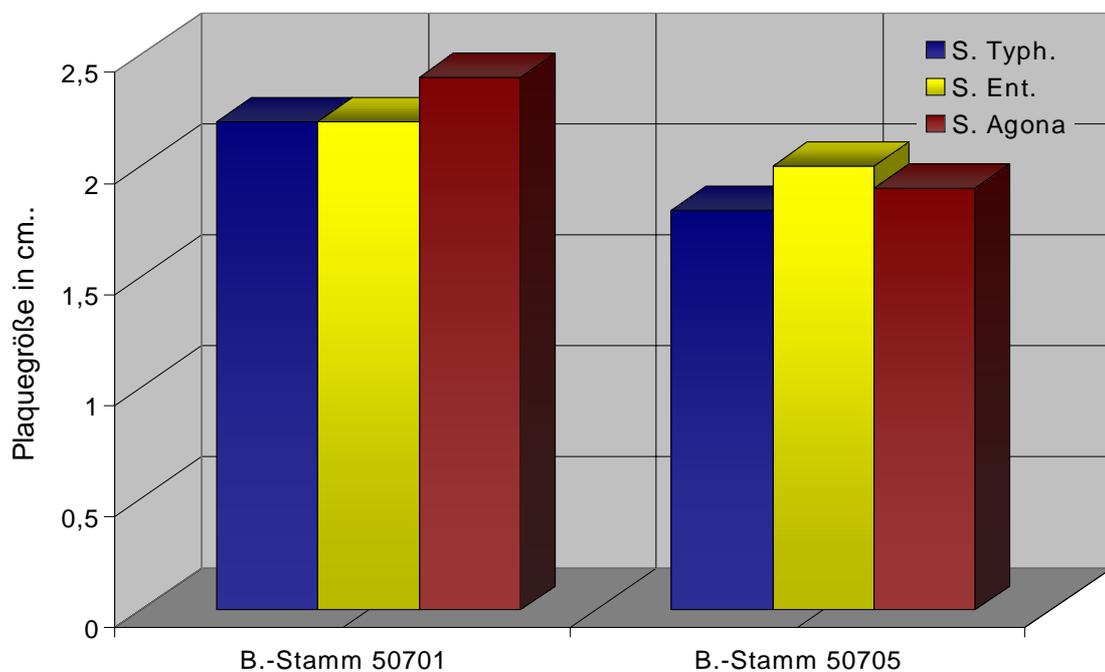


Abb. 11: Plaquegrößen auf den verschiedenen Serovare

Die Unterschiede in der Lysierbarkeit der Serovaren war nur im Falle der Plaquezahlen des *Bdellovibrio*-Stammes 50705 zwischen den Serovaren *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* sowie für *S. Enteritidis* und *S. Agona* statistisch signifikant.

5. DISKUSSION

Die durchgeführten Untersuchungen erfolgten im Hinblick auf die Möglichkeit einer Nutzung von *Bdellovibrionen* als biologisches „Desinfektionsmittel“ im Bereich der Lebensmittelindustrie.

Die Lysierbarkeit aller getesteten *Salmonella*-Stämme durch beide *Bdellovibrio*-Stämme bekräftigt den Ansatz einer solchen Nutzung.

Obwohl beide *Bdellovibrio*-Stämme im Hinblick auf diese Nutzung grundsätzlich als geeignet anzusehen sind, zeigt der Vergleich zwischen ihnen bezüglich der Plaquezahlen als auch der Plaquegrößen eine bessere Eignung des Stammes 50701 gegenüber dem Stamm 50705.

5.1 Ergebnisse der Lysierbarkeit der einzelnen Stämme

In der Literatur ist das Auftreten kleiner Plaques in Verbindung mit einer relativ geringen Anzahl dieser beschrieben worden (HOENIGER et al. 1972). Weiterhin bilden auch spontan entstandene H-I-Mutanten nur kleine Plaques (COTTER u. THOMASHOW 1992b). In den eigenen Untersuchungen war eine scheinbare Beziehung zwischen den Plaquezahlen und den Plaquegrößen zwar beim Großteil der Fälle, jedoch nicht immer gegeben. So weist der *Bdellovibrio*-Stamm 50705 auf dem *Salmonella*-Stamm 66 (Phagotyp 30/17 des Serovars *S. Enteritidis*) zwar eine relativ hohe Plaquezahl aber eine verhältnismäßig geringe Plaquegröße auf. Die Plaquegröße dürfte jedoch im Hinblick auf einen Einsatz von *Bdellovibrio* als Charakterisierungsmerkmal der Lyseeigenschaften von untergeordneter Bedeutung

sein, da sie Ausdruck der Anzahl der Nachkommen der *Bdellovibrionen* sowie deren Bewegungsfähigkeit ist und bei einer Anwendung eine Lyse „from without“ angestrebt wird. Darüber hinaus unterschieden sich die Plaquegrößen bei keinem Vergleich signifikant, so dass aus diesem Merkmal auf keine Unterschiede in der Eignung der *Salmonellen* für die beiden *Bdellovibrion*-Stämme geschlossen werden kann. Das Ergebnis der relativ gleichen Plaquegrößen scheint nicht sehr verwunderlich, da alle getesteten Wirtszell-Stämme der Gattung *Salmonella* bzw. ein Großteil der Stämme sogar dem gleichen Phagotypen angehören. Somit kann dieses Ergebnis möglicherweise auf die nur geringfügige Schwankung innerhalb der Größe zwischen den einzelnen *Salmonella*-Zellen zurückgeführt werden. In Anbetracht der Tatsache, dass die Zahl der Nachkommen durch die Größe der jeweiligen Wirtszelle beeinflusst wird (KESSEL u. SHILO 1976), wäre dieses Ergebnis somit erklärbar. Andererseits muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass dieses Merkmal zur Feststellung des Grades der Eignung zur Lyse gramnegativer Bakterien durch *Bdellovibrionen* nicht geeignet sein könnte. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Unterschiede in den erreichten Plaquezahlen denkbar.

Die erzielten Plaquezahlen beider *Bdellovibrion*-Stämme schwanken zwischen den Stämmen. Solche Schwankungen lassen sich sowohl zwischen den Stämmen der verschiedenen Serovaren als auch innerhalb der einzelnen Phagotypen beobachten. Dieses Phänomen steht im Einklang mit den früheren Beschreibungen von STOLP und PETZOLD (1962) sowie TORRELLA et al. (1978), bei denen zumindest Unterschiede in der Lysierbarkeit von Stämmen der gleichen Spezies aufgetreten waren. Des Weiteren befindet sich dieses Ergebnis in Übereinstimmung mit der Beobachtung von VARON und SHILO (1969a), dass sich eine größere Zahl *Bdellovibrionen* an rauhe *Salmonella*- bzw. *E. coli*-Stämme, denen die O-spezifische Seitenkette fehlt, anheftet bzw. mit der Vermutung einer Beteiligung des R-Antigens an der Anheftung der *Bdellovibrionen* durch HOUSTON et al. (1974). Auch SCHELLING und CONTI (1986) sahen die wahrscheinliche Ursache für die Spezifität innerhalb eines *Bdellovibrion*-Stammes bzw. zwischen verschiedenen *Bdellovibrion*-Stämmen in der Beteiligung der spezifischen Erkennung von Oberflächenkomponenten des angegriffenen Bakteriums. Darüber hinaus vermuteten SCHOEFFIELD und WILLIAMS (1990), dass die Effektivität der Wirte bei der

Bestimmung der *Bdellovibrio*-Zahl auch ein Stamm-spezifisches Phänomen ist, welches von den O-Antigenen der Wirte abhängt. Die eigenen Untersuchungsergebnisse bestätigen weiterhin die Feststellung einer direkten Abhängigkeit der Zahl der Plaques im Verhältnis zum Titer der Impfsuspension der *Bdellovibrionen* vom jeweiligen Wirtstamm von BURGER et al. (1968).

Die verhältnismäßig hohen Standardabweichungen des Merkmales Plaquezahl sind nicht ungewöhnlich. So handelt es sich bei den untersuchten *Bdellovibrionen* wie auch den *Salmonellen* um biologische Untersuchungsobjekte, so dass mit einer gewissen Schwankung der Werte gerechnet werden muß. Des weiteren finden sich in der Literatur Berichte über starke Schwankungen bei der Quantifizierung der Zahl der *Bdellovibrionen*. So zeigte auch WILLIAMS (1988), dass die *Bdellovibrio*-Zahl, welche wie im vorliegenden Fall als PFU bestimmt worden war, bei der Untersuchung der selben Probe im Doppelansatz eine breite Variation aufwies, wie an der auch in der Arbeit dieses Autors auftretenden relativ hohen Standardabweichung ersichtlich war.

Die Ursache der verschiedenen Plaquezahlen auf den einzelnen *Salmonella*-Stämmen dürfte neben stets auftretenden methodischen Fehlern, wie z.B. Pipettierungenauigkeiten und inhomogener Verteilung der Zellen in den Suspensionen, in den Unterschieden in der Zusammensetzung der Zellwand der einzelnen *Salmonellen*, insbesondere unterschiedlicher S- und R-Antigene, begründet liegen.

5.2 Ergebnisse der Lysierbarkeit der einzelnen Phagotypen

Die Ergebnisse der Lysierbarkeit der einzelnen *Salmonella*-Stämme lassen sich im Hinblick auf ihre Zugehörigkeit zu den verschiedenen Phagotypen der einzelnen *Salmonella*-Serovare vergleichen.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass sich besonders dem Phagotypen DT 204 angehörige *Salmonella*-Stämme bei beiden *Bdellovibrio*-Stämmen durch ihre im Vergleich mit den anderen Phagotypen des Serovars S.

Typhimurium höhere Plaquezahl und somit bessere Lysierbarkeit auszeichnen. Demgegenüber zeigt sich auf dem als Enteritis-Salmonellose-Verursacher bedeutenden Phagotyp 4/6 im Vergleich mit den anderen Phagotypen des Serovars S. Enteritidis nur eine mittelmäßige Plaquezahl und demzufolge Lysierbarkeit.

Die verhältnismäßig gute Lysierbarkeit des Phagotypen DT 204 ist besonders hervorzuheben, da diese Erreger sich durch ihre Multiresistenz gegenüber mindestens 5 verschiedenen antibiotischen Substanzen auszeichnen (SKOV et al. 2001). Sie stellen somit ernstzunehmende „Problemkeime“ dar, welche auch das Risiko der Resistenzbildung gegen verschiedenste chemische Desinfektionsmittel beherbergen. Die Gefahr der Resistenzbildung scheint hingegen im Falle von *Bdellovibrio* äußerst gering zu sein (STOLP u. STARR 1963; STOLP 1968).

5.3 Ergebnisse der Lysierbarkeit der verschiedenen Serovare

Unterschiede lassen sich auch im Hinblick auf die Lysierbarkeit der verschiedenen Serovare durch die beiden *Bdellovibrio*-Stämme erkennen.

Die aus den eigenen Untersuchungen erzielten Ergebnisse der Lysierbarkeit der verschiedenen Serovare widersprechen den Aussagen von FRATAMICO und WHITING (1995). Diese hatten aus ihren Untersuchungen geschlußfolgert, dass sich nur bestimmte Serotypen der Genera *Escherichia* und *Salmonella* für einen Angriff durch *Bdellovibrio* eignen. Der Gegensatz dieser zwei Ergebnisse kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden - (i) die genannten Autoren arbeiteten zwar ebenfalls mit einem *Bdellovibrio bacteriovorus*-Stamm - sie verwendeten jedoch im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit den Stamm 109J und (ii) untersuchten sie das Wirtsspektrum in einer Flüssigkultur. Diese Flüssigkultur bestand aus 10 ml Puffer mit 5×10^9 CFU/ml der entsprechenden Wirtszellen und 1×10^{10} PFU/ml *Bdellovibrio*en. Der Ansatz wurde insgesamt für 7h bei 30°C inkubiert, und zu bestimmten Zeiten wurden Teilproben entnommen und die Zahl der CFU nach entsprechender Inkubationszeit bestimmt. Zusätzlich wurden Negativkontrollen, die nur Puffer und Wirtszellen enthielten, mitgeführt. Die Wirtszellen wurden als für einen Angriff durch *Bdellovibrio* geeignet angesehen, wenn nach den 7h eine Reduktion der log-Zahl von größer 1,5 zu verzeichnen war. Demzufolge würde laut den

Untersuchungen dieser Autoren lediglich *S. Poona* einen geeigneten Wirt für *Bdellovibrio* darstellen und *S. Arizonae*, *S. Dublin*, vier Stämme des Serovars *S. Enteritidis*, *S. Senftenberg* sowie zwei Stämme des Serovars *S. Typhimurium* nicht. Dies steht nicht nur im krassen Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen sondern auch zu den Publikationen verschiedenster Autoren, so z.B. von TALLEY et al. (1987) sowie COVER et al. (1984), welche *E. coli* als Wirtszellen für *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J nutzten. Somit ist die Richtigkeit der Schlußfolgerungen aus den Untersuchungen von FRATAMICO und WHITING (1995) mehr als fragwürdig.

Vorgenannte Unstimmigkeiten verdeutlichen zudem nochmals die Schwierigkeiten des Versuches einer Quantifizierung der Lysierbarkeit verschiedener Wirte durch *Bdellovibrio*.

5.4 Anwendung der Bdellovibrionen im Lebensmittelbereich

Eine Anwendung der Bdellovibrionen im Lebensmittelbereich setzt eine Vielzahl von Bedingungen voraus. So gilt es, neben einer für alle Anwendungsbereiche notwendigen Überprüfung der Eignung der Rahmenbedingungen für Bdellovibrionen auch die möglichen Auswirkungen eines Kontaktes mit den Nahrungsmitteln bei einem solchen Einsatz zu bedenken. Die folgenden Abschnitte sind diesen Problemen gewidmet.

5.4.1 Apathogenität

Die erste unbedingte Voraussetzung stellt bei einem Einsatz der Bdellovibrionen im Bereich der Nahrungsmittelindustrie die Apathogenität der anzuwendenden Bakterien gegenüber dem Menschen dar. Die Mikroorganismen müssen in dieser Hinsicht biologisch stabil sein. Dies sollte durch gezielte regelmäßige Untersuchungen geprüft werden.

Auf die Apathogenität der Bdellovibrionen weisen die folgenden Sachverhalte hin:

- (i) Vor ihrer zufälligen Entdeckung im Jahre 1962 sowie danach sind Bdellovibrionen nie als Krankheitserreger in Erscheinung getreten.
- (ii) In den Untersuchungen von LENZ und HESPELL (1978) führte die Inkubation von *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J, *B. stolpii* Uki2 oder *B. starii* A3.12 mit eukaryotischen tierischen Zellen, wie Zellen aus Mäuselebern, Hamsternieren oder boviner Milchdrüse, weder zur Anheftung der Bdellovibrionen an diese noch zu einem Wachstum. Im Gegensatz hierzu waren bei der Inkubation von *Bdellovibrio* mit Erythrozyten-Suspensionen von Rindern oder Kaninchen eine sehr geringe Anheftung und Penetration, jedoch kein Wachstum zu beobachten. Wurden die Bdellovibrionen mittels biotechnischer Verfahren in den perivitellinen Spalt oder Zytoplasma von Kanincheneiern eingebracht, war nach 18-24 h weder ein signifikanter Verlust noch ein Anstieg der Bdellovibrionen festzustellen. Somit scheinen diese Parasiten nicht zum intrazellulären Wachstum in eukaryonten Zellen befähigt zu sein.
- (iii) Als Drittes ist der Nachweis von Bdellovibrionen aus dem Intestinum von Mensch (HU u. LIU 1990; EDAO 2000) und Tier (IBRAHIMOV 1977; EDAO 2000) zu nennen. Überdies deuten die Ergebnisse von EDAO (2000) an, dass der eubiotische Zustand der Magen-Darm-Flora von Mensch und Tier durch einen relativ hohen Gehalt an Bdellovibrionen gekennzeichnet ist.

Vorgenannte Sachverhalte schließen ein Restrisiko beim Einsatz von *Bdellovibrio* insbesondere im oder am Lebensmittel nicht aus. Eine abschließende und sichere Beurteilung der Apathogenität dieses Bakteriums erfordert somit in jedem Fall weitere Untersuchungen.

5.4.2 Resistenzen

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die Ausbildung von Resistenzen dar. Hierbei ist in erster Linie die mögliche Einschränkung der Wirksamkeit der Bdellovibrionen bei der Eliminierung unerwünschter Keime zu beleuchten.

Generell scheint das Auftreten von *Bdellovibrio*-resistenten Bakterien in einer

Population geeigneter Wirtszellen ein äußerst seltenes Ereignis zu sein. So gelang es STOLP und STARR (1963) nicht, in einer Population von *E. amylovora* *Bdellovibrio*-resistente Mutanten zu selektieren. Weiterhin wurden auch in den darauf folgenden Jahren keine solchen Resistenzen beobachtet (STOLP 1968; STOLP 1973). Darüber hinaus zeigten die Untersuchungen von KOVAL und BAYER (1997) die Lysierbarkeit bekapselter Bakterien. Demgegenüber stehen die Unempfindlichkeit gramnegativer Bakterien, die von einem S-Layer umgeben sind (KOVAL u. HYNES 1991), und die einzige Publikation der Entwicklung einer Resistenz gegen *Bdellovibrio*. So stellte VARON (1979) in seinen Untersuchungen mit *Photobacterium leiognathi* E28 und *Bdellovibrio* BM4 in einem Chemostat bis zum sechsten Tag eine typische Oszillation der Zahlen der beiden Bakterien fest. Danach änderte sich das Muster, und die Wirtspopulation, die anfänglich homogen war, zeigte morphologisch unterschiedliche Kolonie-Typen. Diese bestanden aus zwei verschiedenen genetischen Typen, von denen einer den Wildtyp (Typ A) darstellte und der andere sich durch sein mehr opaques und dunkles Wachstum (Typ B) auszeichnete. Die Unterschiede waren nicht nur morphologisch, sondern auch im Verhaltensmuster der beiden Typen ausgeprägt. Wenn man Suspensionen beider Typen mit 10 *Bdellovibrionen* pro Wirtszelle mischte, attackierte und penetrierte *Bdellovibrio* die Typ A-Wirtszellen sofort, wohingegen beim Typ B keine Aktivität festzustellen war. Der Plaqueassay ergab ähnliche Ergebnisse - so war der Typ B im Vergleich zu Typ A durch eine mindestens 10^7 mal geringere Effizienz beim Ausbringen der *Bdellovibrionen* auf Doppelschichtagar-Platten gekennzeichnet. Die Ausbildung solcher resistenten Wirtszellen trat bei der Inkubation im Chemostat unter den gleichen Bedingungen - scheinbar im Gegensatz zum sonstigen Vorgehen - wiederholt auf.

Bei einer Anwendung der *Bdellovibrionen* zur biologischen Kontrolle von beispielsweise Salmonellen ist jedoch nicht von einer solchen Problematik auszugehen. So würden in diesem Fall weder eine Inkubation über einen mehrere Tage andauernden Zeitraum erfolgen noch könnte man die Umweltbedingungen derart konstant wie in einem Chemostaten halten.

Des weiteren soll auch der Gesichtspunkt der Resistenzbildung gegenüber antibiotisch wirksamen Stoffen, insbesondere die Ausbildung einer erworbenen

Resistenz, beleuchtet werden. Diese Resistenzen, welche eine erfolgreiche antibiotische Therapie vieler Erkrankungen des Menschen sehr erschweren, haben in den letzten Jahren stark zugenommen. Sie stellen weiterhin den Auslöser für viele gesetzliche Änderungen und Einschränkungen auf dem Gebiet der kurativen Veterinärmedizin, vorrangig - jedoch nicht ausschließlich - in der Therapie von der Lebensmittelgewinnung dienenden Tieren, dar. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit spielen Resistenzen gegen antibiotisch wirksame Stoffe jedoch nur eine untergeordnete Rolle, da *Bdellovibrio* nicht als Therapeutikum angewendet werden soll und die primäre Sorge der Möglichkeit der Einschränkung der Wirksamkeit der Bdellovibrionen gegenüber unerwünschten Keimen gilt. Trotzdem muß bei jeder Anwendung von Bakterien mit der Ausbildung bzw. Übertragung antibiotischer Resistenzen gerechnet werden.

Erworbene Resistenzen gegen antibiotisch wirksame Substanzen können entweder durch spontane Genmutationen oder durch die Übertragung von Resistenz-tragenden Zellbestandteilen (R-Faktoren) entstehen (ROLLE u. MAYR 1993). Letzteres ist auf drei verschiedenen Wegen - der Transformation, der Transduktion oder der Konjugation - möglich. Während die Transformation nur eine untergeordnete Rolle spielt und die Transduktion einen sehr speziesspezifischen Prozeß darstellt, spielt die Hauptrolle in der Übertragung von Resistenz-tragenden Zellbestandteilen die Konjugation. Hierbei kommt es über einen Proteinfaden, den F-Pilus, zum Transfer der R-Faktoren. Dieser Mechanismus dominiert bei den gramnegativen Bakterien und wäre demzufolge theoretisch auch bei den Bdellovibrionen möglich. Die große Bedeutung der Konjugation besteht in ihrer nicht speziesspezifischen Übertragung, so dass ein Austausch von Plasmiden auch zwischen physiologischen und pathogenen Keimen möglich ist.

Das vorgenannte Prozesse partiell auch in Bdellovibrionen möglich sind, haben verschiedene Wissenschaftler demonstriert. Bereits STOLP und STARR (1963) zeigten die Möglichkeit der Selektion Streptomycin-resistenter Bdellovibrionen. Des weiteren gelang ROBERTS und RANU (1987) die Übertragung von DNA des *Bdellovibrio*-angreifenden Bakteriophagen MAC-1 in einen H-I-*Bdellovibrio bacteriovorus*-Stamm. Auch war es COTTER und THOMASHOW (1992a) möglich, von *E. coli* stammende Plasmide auf *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J zu übertragen. Diese Plasmide führten zum einen zur Steigerung des Plaquebildungsvermögens -

es gelang andererseits jedoch z.T. auch, Antibiotika-resistente Rezipienten zu erzeugen. In wieweit es den Bdellovibrionen möglich ist, solche Resistenzen wiederum an andere gramnegative Bakterien weiterzugeben, ist derzeit noch unklar.

5.4.3 Keimspektrum

Der sinnvolle Einsatz von Bdellovibrionen zum Zwecke der biologischen Kontrolle im Bereich der Lebensmittelproduktion setzt das Bekanntsein des Erregerspektrums des jeweiligen Anwendungsgebietes dar. So macht die Anwendung nur beim Vorliegen unerwünschter gramnegativer Erreger Sinn. Handelt es sich bei den zu bekämpfenden Keimen jedoch um grampositive Bakterien, wie z.B. den ebenfalls häufig auftretenden *Staphylococcus aureus*, so können diese, da *Bdellovibrio* nicht in der Lage ist, grampositive Keime zu lysieren, nicht reduziert werden. Des Weiteren besteht keine Aktivität der Bdellovibrionen gegenüber nicht bakteriellen Erregern, wie Viren, Hefen oder Pilzen.

Darüber hinaus erscheint eine Anwendung der Bdellovibrionen zur biologischen Kontrolle von gramnegativen Keimen bei zeitgleichem Vorliegen unerwünschter grampositiver Bakterien problematisch, da nach der Eliminierung der gramnegativen Keime unter Umständen ein übermäßiges Wachstum der grampositiven Flora - und demzufolge auch der unerwünschten grampositiven Bakterien - zu erwarten ist.

Weiterhin ist mit einer von VARON (1981) beschriebenen Beeinflussung des Interaktionsprozesses von *Bdellovibrio* mit den Wirtszellen durch die Anwesenheit anderer Bakterien zu rechnen, unabhängig davon, ob diese als Wirte dienen oder nicht. Der Grad der Beeinflussung variiert jedoch zwischen den verschiedenen Bakterien. Ein dämpfender Effekt wird auch durch das mathematische Modell des Zusammenspiels von Bdellovibrionen und Wirtszellen beim Vorhandensein zusätzlicher Bakterien, mit denen die Bdellovibrionen kollidieren können, von WILKINSON (2001) vorausgesagt. Diese Effekte müssen jedoch - besonders vor einem möglichen Einsatz der Bdellovibrionen - eingehend untersucht werden. So steht die Umsetzung des Modells von WILKINSON noch gänzlich aus und in den Untersuchungen von VARON wurde mit Konzentrationen von 10^8 Bakterien und einem Prädator/Wirt-Verhältnis von 5:1 gearbeitet. Somit erscheint eine Optimierung

der *Bdellovibrio*-Wirkung, d.h. die Minimierung dieser nachteiligen Effekte, durchaus möglich. Weiterhin muß auch die Wirkung nicht bakterieller Erreger geprüft werden, da zumindest eine Kollision mit diesen und somit ein negativer Einfluß auf die Wirkung der Bdellovibrionen in Form eines verzögerten Wirkungseintrittes bzw. im Falle der Anheftung von einer Reduktion der Zahl der effektiv zur Verfügung stehenden Bdellovibrionen möglich ist.

5.4.4 Keimgehalt

Der Keimgehalt an unerwünschten Bakterien ist ebenfalls für die Bestimmung der notwendigen „Arbeitskonzentration“ der Bdellovibrionen zu berücksichtigen. Verschiedene Arbeiten haben den starken Einfluß unterschiedlicher Prädator/Wirt-Verhältnisse auf die Anheftung bzw. die Wirkung der Bdellovibrionen deutlich gemacht. So demonstrierten VARON und SHILO (1968) einen Anstieg des Prozentsatzes der an die Substratzellen angehefteten Parasitenpopulation beim Absenken des Verhältnisses Parasit zu Wirt. Für die Reduktion bzw. Eliminierung von unerwünschten gramnegativen Bakterien muß die Einwirkzeit jedoch möglichst kurz sein. Daher ist eine Steigerung des Prädator-Wirt-Verhältnisses indiziert. Dieses resultiert in einer rapideren Abnahme der zu bekämpfenden Keime (FRATAMICO u. WHITING 1995). In der Arbeit von JACKSON und WHITING (1992) konnte eine Reduktion von *E. coli* K12 um eine log-Stufe binnen weniger als 1h bei einer Relation Parasit zu Wirt von 5:1, 10:1 oder 30:1 erzielt werden. Dem entspricht auch die Schlußfolgerung eines scheinbar optimalen Verhältnisses Prädator/Wirt von 10:1 durch FRATAMICO und WHITING (1995). Des weiteren weisen auch diese Autoren darauf hin, dass der Gehalt an pathogenen Keimen und Verderbis-auslösenden Bakterien berücksichtigt werden muß. FRATAMICO und WHITING (1995) schlossen weiterhin, dass bei einer Anwendung der Bdellovibrionen zur biologischen Kontrolle von Verderbniserregern in Nahrungsmitteln die Bestimmung der Konzentration der Bdellovibrionen für jeden Typ von Lebensmittel erforderlich ist. Die bloße Bestimmung der Konzentration der Bdellovibrionen für jeden Lebensmitteltyp erscheint jedoch nicht ausreichend. So müßten bei einer solchen Anwendung auch insbesondere eine Berücksichtigung der Keimbelastung der Ausgangsmaterialien für

die entsprechenden Lebensmittel als auch betriebsspezifische Gegebenheiten, welche zu einer Beeinflussung der Keimzahl führen können, Beachtung finden.

Die genannten Prädator-Wirt-Verhältnisse von 10:1 bzw. 30:1 erscheinen für eine Anwendung der *Bdellovibrionen* vorerst als empfehlenswert. Eine endgültige Aussage hierzu erfordert jedoch dringend weitere Untersuchungen, wobei besonders die oben aufgeführte Problematik der Einflußnahme durch andere Bakterien und nicht bakterielle Erreger zu klären ist.

5.4.5 Temperatur

Als weiterer im Hinblick auf eine mögliche Nutzung der *Bdellovibrionen* zu beachtender Punkt ist die Temperatur im Anwendungsbereich zu nennen. Wie bereits ausgeführt, liegt das Aktivitätsspektrum der meisten *Bdellovibrio*-Stämme im Bereich zwischen 20 und 40°C (VARON u. SHILO 1968). Somit ist die Möglichkeit einer Nutzung dieser bei Raumtemperatur gegeben. Darüber hinaus ist jedoch auch die Anwendung psychrotropher Stämme bei Kühlschrank-Temperaturen oder beispielsweise unter den rechtlich fixierten Temperaturen im Bereich der Zerlegung von Fleisch denkbar. Dies könnte durch einzelne *Bdellovibrio*-Stämme, deren Aktivitätsspektrum auch Temperaturen von unter 10°C einschließt (FRATAMICO u. WHITING 1995) oder durch Prädatoren, welche auch bei 4°C Oberflächen kolonisieren können (KELLEY et al. 1997), ermöglicht werden. Somit ist bei optimaler Wahl des *Bdellovibrio*-Stammes eine Nutzung dieser Parasiten bei unterschiedlichen, in der Lebensmittelwirtschaft üblichen Temperaturen denkbar.

5.4.6 pH-Wert

Einen weiteren zu berücksichtigenden Aspekt stellt der im Anwendungsbereich herrschende pH-Wert dar. Dieser sollte zwecks optimaler Wirkung der *Bdellovibrionen* möglichst nah an deren optimalen Aktivitäts-pH-Wert liegen. Hierbei

ist festzuhalten, dass die Prädatoren in einem pH-Wert-Bereich von 6-9 aktiv sind (STARR u. SEIDLER 1971), wobei eine optimale Entwicklung beim Vorliegen eines pH-Wertes von 7,6 gegeben ist. Da viele Lebensmittel über einen pH-Wert nahe des Neutralpunktes verfügen, bilden diese bzw. führt deren Verteilung im Laufe der verschiedenen Arbeitsprozesse auf den Oberflächen zu einer für das Wirken von *Bdellovibrio* geeigneten Umgebung.

Darüber hinaus ist auch eine Anwendung im Zusammenhang mit Lebensmitteln, deren pH-Wert vom Neutralpunkt abweicht, durchaus nicht abwegig. Hierbei ist nämlich zu bedenken, dass jede klassische Desinfektion von Flächen nur nach einer entsprechenden vorausgegangenen Reinigung wirkungsvoll ist. Dieser Schritt wäre auch für eine mögliche biologische Kontrolle unerwünschter Keime durch *Bdellovibrio* vorzuschalten. Da viele Reinigungsmittel ebenfalls keine neutralen pH-Werte besitzen, ist in diesem Zusammenhang ein abschließendes gründliches Abspülen dieser Substanzen wichtig. Durch diesen Reinigungsschritt wird neben einer Entfernung der die Bakterien schützenden Schmutzschichten im Falle des Abweichens der Lebensmittel vom Neutralpunkt auch eine Minderung dieses Einflusses auf den pH-Wert der Oberfläche ausgeübt und es entsteht ein Verdünnungseffekt. Somit mindert sich der Einfluß des pH-Wertes auf die Wirksamkeit der Parasiten. Demzufolge spielt der pH-Wert lediglich bei einer möglichen Nutzung direkt am oder im Lebensmittel, z.B. zum Zweck der Kontrolle von Verderbniserregern, eine hervorstechende Rolle.

5.4.7 Sauerstoff

Da Bdellovibrionen zu den obligat aeroben Bakterien gehören, erfordert ihr erfolgreicher Einsatz aerobe Bedingungen. Somit ergeben sich, da im Lebensmittelbereich größtenteils unter atmosphärischem Sauerstoffdruck gearbeitet wird, viele Anwendungsmöglichkeiten. Lediglich die Verwendung von Bdellovibrionen direkt in einzelnen Nahrungsmitteln sowie der Einsatz in Verbindung mit der Anwendung von Schutzatmosphären erscheinen zweifelhaft bzw. schließen sich aus. Demgegenüber steht der Einsatz auf diversen Oberflächen, welcher als erfolgsversprechend anzusehen ist.

5.4.8 Anwendungsverfahren

Der Einsatz von Bdellovibrionen im Lebensmittelbereich erlaubt mehrere Ansätze - (i) die Dekontamination von Arbeitsflächen und -geräten, (ii) die verlängerte Haltbarmachung von Nahrungsmitteln durch gezielte Minderung der Zahl von Verderbniserregern und (iii) die Kontrolle von gramnegativen pathogenen Bakterien im Lebensmittel.

Die in diesem Zusammenhang an erster Stelle genannte Anwendung ist dabei als am vielversprechendsten anzusehen, da die Umweltfaktoren hier für die Wirkung der Bdellovibrionen am günstigsten sind. So ist in diesem Fall die entsprechende Versorgung der Prädatoren mit Sauerstoff gegeben, und die Temperaturen lassen sich beispielsweise in den Produktionsstätten außerhalb der Arbeitszeiten an das Optimum angleichen. Wie oben bereits ausgeführt, kann der pH-Wert beim Abweichen vom Neutralpunkt durch den vorgeschalteten Reinigungsschritt zumindest partiell neutralisiert werden.

Die Anwendungen von *Bdellovibrio* direkt im Lebensmittel sind sowohl zum Zweck der Reduktion von Verderbniserregern als auch zur Kontrolle von pathogenen gramnegativen Bakterien als wesentlich problembehafteter zu beurteilen. So kann bei einer solchen Anwendung im Lebensmittel weder die Versorgung mit Sauerstoff gewährleistet werden noch ist die Verschiebung des pH-Wertes möglich. Darüber hinaus ist bei einer Temperaturerhöhung von negativen Auswirkungen auf die Qualität des Lebensmittels auszugehen. Insofern kann die von JACKSON und WHITING (1992) aufgestellte These, dass die Anwendung von Bdellovibrionen eine neue potentielle Methode darstellt, um Lebensmittel länger haltbar zu machen und Lebensmittel-bedingte, durch gramnegative Bakterien hervorgerufene, Erkrankungen zu reduzieren, beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht unterstützt werden. Diese Nutzung ist lediglich zur Oberflächenbehandlung bestimmter Lebensmittel denkbar und aufgrund der eben gemachten Ausführungen auch hier nicht ohne Weiteres möglich.

In jedem Fall ist ein Einsatz der Bdellovibrionen bei der Behandlung von Oberflächen an Arbeitsplätzen und -geräten sehr vielversprechend, da diese Anwendung dem

natürlichen Verhalten der Prädatoren, sich an Oberflächen zu heften, sehr entgegenkommt. Somit ist beispielsweise auch im Tauchbad mit einer hohen Effizienz der *Bdellovibrio*-Wirkung zu rechnen. Erste Erfolge bei der Reduktion pathogener *E. coli* und Salmonellen, welche sich an rostfreien Stahloberflächen befanden, durch Bdellovibrionen wurden von FRATAMICO (1995) beschrieben. Darüber hinaus wiesen KELLEY et al. (1997) nach, dass die Zahl der marinen Bdellovibrionen auf allen von ihnen untersuchten Oberflächen, so auch auf Glas und Polystyren, unter Wasser mit der Zeit stieg, und dass in Abwesenheit von Salz eine Kolonisation nicht halotoleranter Bdellovibrionen erfolgte. Von ähnlichen Beobachtungen, nämlich der Anheftung von *B. bacteriovorus* 109J an Glas und andere feuchte Oberflächen berichtete auch RITTENBERG (1972).

Wie bereits festgestellt, muß vor jeglicher möglichen Anwendung der Bdellovibrionen im Lebensmittelbereich anhand weiterer Untersuchungen noch die Apathogenität dieser sicher bewiesen werden.

Im Hinblick auf die Applikationsform sind sowohl die Anwendung als Spray als auch der Einsatz eines Tauchbades denkbar. Von Vorteil ist die Tatsache, dass die prädatoreischen Eigenschaften während der Lyophilisation nicht verlorengehen (SHILO u. BRUFF 1965), wodurch eine lange Haltbarkeit der Bdellovibrionen möglich wird. Weiterhin wäre im Hinblick auf die Konservierung der Prädatoren auch der Einsatz von Bdellozysten denkbar, wodurch sich jedoch das Wirtsspektrum entsprechend auf das des *Bdellovibrio bacteriovorus*-Stammes W beschränken würde, da dieser, wie bereits erwähnt, der einzige *Bdellovibrio*-Stamm mit Bildung von Bdellozysten ist.

Diese theoretischen Überlegungen wurden bereits praktisch umgesetzt. So steht ein am Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig entwickeltes Verfahren zur Verfügung, welches die großtechnische Herstellung von Bdellozysten-Suspensionen und deren Stabilisierung für Langzeitwecke erlaubt (KRÜGER et al. 1999).

Abschließend ist nochmals auf das enorme Potential dieser Methode zu verweisen. So bietet die Anwendung der Bdellovibrionen im Lebensmittelbereich die Möglichkeit

einer gezielten umweltfreundlichen Kontrolle unerwünschter Keime insbesondere im Zusammenhang mit im Laufe des Produktionsprozesses kontaminierten Oberflächen, wobei eine Nutzung in jedem Fall eine gründliche Untersuchung der einzelnen Einflußfaktoren wie auch des Keimspektrums voraussetzt.

Durch weitere Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet steht zu erwarten, dass sich die Anwendung in vielerlei Hinsicht - wie z.B. durch die Wahl geeigneter *Bdellovibrio*-Stämme für die jeweilige Problemstellung - optimieren lässt bzw. dass bestehende Bedenken möglicherweise ausgeräumt werden können, so dass auch eine sichere Eliminierung eventuell vorhandener Salmonellen erreicht werden kann.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur Lyse von Salmonellen durch *Bdellovibrio bacteriovorus*

Beate Schlottermüller

**Institut für Lebensmittelhygiene, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität
Leipzig**

Eingereicht im September 2003

Schlüsselworte: *Bdellovibrio*, *Salmonella*, biologische Desinfektion

109 Seiten, 11 Abbildungen, 12 Tabellen, 218 Literaturangaben

Bdellovibrionen sind einzigartige Bakterien, welche in der Lage sind, eine Vielzahl geeigneter gramnegativer Bakterien zu lysieren. Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1962 ist man daher bestrebt, sich diese Eigenschaft zunutze zu machen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einer grundlegenden Untersuchung im Hinblick auf eine mögliche Nutzung der Bdellovibrionen in der Lebensmittelwirtschaft die Lysierbarkeit verschiedener, hauptsächlich aus Lebensmitteln isolierter *Salmonella*-Stämme durch *Bdellovibrio bacteriovorus* zu prüfen sowie mögliche Unterschiede aufzudecken.

Untersucht wurden 73 verschiedene, vorrangig den Serovaren *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* angehörende, *Salmonella*-Stämme hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber zwei verschiedenen *Bdellovibrio*-Stämmen. Zu diesem Zweck fand die für den Nachweis von Bdellovibrionen modifizierte Doppelschichtagarmethode Anwendung. Bei dieser Methode, bei welcher Bdellovibrionen und Wirtszellen in einem semisoliden Medium zusammengebracht werden, bilden sich beim Vorliegen geeigneter Wirte kreisrunde Lysiszonen. Als Parameter für die Lysierbarkeit dienten die Bestimmung der Zahl der plaque forming units (PFU) bei stets gleich hohem Eintrag an Bdellovibrionen sowie die Ermittlung des Durchmessers der Plaques.

Alle untersuchten *Salmonella*-Stämme erwiesen sich ausnahmslos als durch beide *Bdellovibrio*-Stämme lysierbar, was sich auf den verwendeten Doppelschichtagarplatten in der Bildung klarer Plaques bereits am 4. Tag der Inkubation äußerte. Hierbei war festzustellen, dass der *Bdellovibrio*-Stamm 50701 bei nahezu allen

getesteten *Salmonella*-Stämmen höhere PFU-Werte sowie größere Plaque-durchmesser als der Stamm 50705 verursachte, welches jedoch nur in einigen Fällen durch eine statistisch nachweisbare Signifikanz zu belegen war. Die Plaquezahlen differierten zwischen den einzelnen Stämmen, den Phagotypen sowie den getesteten Serovaren. Auch hier waren zum Teil signifikante Unterschiede feststellbar. Beide *Bdellovibrio*-Stämme zeigten bezüglich der Plaquezahlen ein ähnliches Verhalten. Die Bestimmung der Plaquegrößen erbrachte keine deutlichen Unterschiede.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen die grundsätzliche Eignung beider untersuchter *Bdellovibrio*-Stämme für den biologischen Abbau von Salmonellen, wobei der Stamm 50701 aufgrund seiner besseren Lyse-Eigenschaften dem Stamm 50705 vorzuziehen wäre. Als Anwendungsmöglichkeit empfiehlt sich besonders die Nutzung der Bdellovibrionen zur Eliminierung unerwünschter gramnegativer Bakterien auf Arbeitsflächen und -geräten. Vor einer solchen Anwendung müssen jedoch, um die Apathogenität der Bdellovibrionen sicherzustellen, noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Weiterhin setzt ein möglicher Einsatz im Lebensmittelbereich die Kenntnis der exakten Rahmenbedingungen voraus. So ist die Frage der Beeinflussung der Wirkung der Bdellovibrionen auf die zu eliminierenden Bakterien durch das im Anwendungsbereich vorkommende Keimspektrum weitestgehend ungeklärt. Auch die Ausbildung von Resistenzen der zu bekämpfenden Keime gegenüber der Wirkung von *Bdellovibrio* bedarf weiterer Klärung, wenngleich die Wahrscheinlichkeit einer solchen als eher gering einzuschätzen ist. Des Weiteren muß vor dem Einsatz von *Bdellovibrio* der zu erwartende Keimgehalt bekannt sein, da nur dann die notwendige Konzentration der Bdellovibrionen bestimmt werden kann. Darüber hinaus sollten zur Ermöglichung einer optimalen Wirkung der Prädatoren die Temperatur und der pH-Wert im Anwendungsbereich möglichst nah am entsprechenden Optimum des jeweiligen *Bdellovibrio*-Stammes liegen. Weniger problematisch erscheint das Sauerstoff-Bedürfnis der Prädatoren, da im Lebensmittelbereich meist unter atmosphärischem Sauerstoffdruck gearbeitet wird.

Im Hinblick auf die Entwicklung eines praxisreifen und sicheren Verfahrens zur biologischen Kontrolle unerwünschter Keime im Lebensmittelbereich mittels *Bdellovibrio* sind dringend weitere Untersuchungen erforderlich.

7. SUMMARY

Investigations on the lysis of *Salmonella* by *Bdellovibrio bacteriovorus*

Beate Schlottermüller

Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in September 2003

Keywords: *Bdellovibrio*, *Salmonella*, biological disinfection

109 pages, 11 figures, 12 tables, 218 references

Bdellovibrios are unique bacteria that are able to lyse a wide variety of susceptible Gram-negative bacteria. Since their first recognition in 1962 one has been trying to make use of this behaviour.

Aim of this study was making a basic investigation towards a possible using of bdellovibrios in food processing and preparation by testing lysis of different *Salmonella*-strains, primarily stemming from foods, by *Bdellovibrio bacteriovorus* as well as to check differences between them.

73 several *Salmonella*-strains - especially of serovars *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* - were tested with regard to their behaviour towards two different *Bdellovibrio*-strains by using modified double layer technique in which bdellovibrios and hosts are mixed in a semisolid medium. In the presence of suitable preys bdellovibrios form typical round plaques on lawns of hosts. As parameters of lysis the number of plaque forming units (PFU) at the same high level of bdellovibrios was determined, as well as the diameter of plaques.

All tested *Salmonella*-strains were lysed by the two *Bdellovibrio*-strains, as could be seen in forming clear plaques even at day 4 of incubation. *Bdellovibrio*-strain 50701 caused higher PFU counts as well as bigger plaque sizes than strain 50705 on nearly all examined *Salmonella*-strains, which was only in some cases statistically significant. Plaque numbers differed between the several strains, phagotypes and serovars. These differences were significant in part. Both *Bdellovibrio*-strains behaved similar concerning plaque numbers. Determining plaque sizes showed no distinct divergences.

Present results show the basic suitability of both tested *Bdellovibrio*-strains for

biological reduction of *Salmonella*, whereby strain 50701 seems to be more suitable. Application of bdellovibrios for elimination of pathogenic and spoilage bacteria is most useful on surfaces of equipment. Before such an application there have to be done further investigations to make sure bdellovibrios are not harmful, and the exact circumstances have to be checked. The question of influencing *Bdellovibrio*'s behaviour towards undesired bacteria by other micro-organisms is still unanswered. Also the rising of resistances to *Bdellovibrio* is not yet clear although the likelihood of such a process is very small. Moreover the expected number of bacteria has to be known since without this information it is not possible to determine the necessary concentration of *Bdellovibrio*. In addition the temperature and the pH-value should be as close as possible to the optimum of the appropriate *Bdellovibrio*-strain. Less complicated seems to be the oxygen requirement of the predators because most manipulations in food processing are done under atmospheric conditions.

With regard to development of a practical and save method to control pathogenic and spoilage bacteria in food processing and preparation by *Bdellovibrio* further investigations are urgent required.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Abram D, Castro e Melo J, Chou D. Penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into host cells. J Bacteriol 1974;118:663-80.

Abram D, Davis BK. Structural properties and features of parasitic *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1970;104:948-65.

Alguero M, Gaju N , Esteve I. Bacterial predation studies in anaerobic freshwater habitats. Acta Congr Espanol Limnol 1987;4:65-74.

Althausen M, Samsonoff WA, Anderson C, Conti SF. Isolation and preliminary characterization of bacteriophage for *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Virol 1972;10:516-24.

Araki Y, Ruby EG. A soluble enzyme activity that attaches free diaminopimelic acid to bdelloplast peptidoglycan. Biochemistry 1988;27:2624-9.

Baer ML, Ravel J, Chun J, Hill RT, Williams HN. A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starii* into a new genus, *Bacteriovorax* gen. nov. as *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starii* comb. nov., respectively. Int J Syst Evol Microbiol 2000;50:219-24.

Barel G, Jurkevitch E. Analysis of phenotypic diversity among host-independent mutants of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. Arch Microbiol 2001;176:211-6.

Baumgart A. Mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln. 3. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag; 1993.

Bell C, Kyriakides A. Salmonella: A practical approach to the organism and its control in foods. Oxford: Blackwell Science Ltd; 2002.

Blobel H, Schliesser T. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1981.

Brentlinger KL, Hafenstein S, Novak CR, Fane BA, Borgon R, McKenna R, et al. Microviridae, a family divided: Isolation, characterization, and genome sequence of ϕ MH2K, a bacteriophage of the obligate intracellular parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 2002;184:1089-94.

Burger A, Drews G, Ladwig R. Wirkkreis und Infektionszyklus eines neu isolierten *Bdellovibrio bacteriovorus*-Stammes. Archiv Mikrobiol 1968;61:261-79.

Burnham JC, Conti SF. Genus *Bdellovibrio*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984. S. 118-23.

Burnham JC, Hashimoto T, Conti SF. Electron microscopic observations on the penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into gram-negative bacterial hosts. J Bacteriol 1968; 96:1366-81.

Burnham JC, Hashimoto T, Conti SF. Ultrastructure and cell division of a facultatively parasitic strain of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1970;101:997-1004.

Burnham JC, Collart SA, Highison BW. Entrapment and lysis of the cyanobacterium *Phormidium loricatum* by aqueous colonies of *Mycococcus xanthus* PC02. Arch Microbiol 1981;129:285-94.

Casida LE, Jr. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. Intern J Sys Bacteriol 1982;32:539-45.

Chemeris NA, Afigenova AV, Tsarikayeva TS. The role of carbohydrate-protein recognition in the process of *Bdellovibrio* attachment to host bacterial cells. (orig. russ.) Mikrobiologiya 1984;53:556-8.

Cotter TW, Thomashow MF. A conjugation procedure for *Bdellovibrio bacteriovorus* and its use to identify DNA sequences that enhance the plaque-forming ability of a spontaneous host-independent mutant. J Bacteriol 1992a;174:6011-7.

Cotter TW, Thomashow MF. Identification of a *Bdellovibrio bacteriovorus* genetic locus, hit, associated with host-independent phenotype. J Bacteriol 1992b;174:6018-24.

Cover WH, Martinez RJ, Rittenberg SC. Permeability of the boundary layers of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J and its bdelloplasts to small hydrophilic molecules. J Bacteriol 1984;157:385-90.

Cover WH, Rittenberg SC. Change in the surface hydrophobicity of substrate cells during bdelloplast formation by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. J Bacteriol 1984;157:391-7.

Crothers SF, Robinson J. Changes in the permeability of *Escherichia coli* during parasitization by *Bdellovibrio bacteriovorus*. Can J Microbiol 1971;17:689-97.

D'Aoust JY. *Salmonella*. In: Doyle MP, Hrsg. Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker; 1989. S. 327-445.

Diedrich DL, Denny CF, Hashimoto T, Conti SF. Facultatively parasitic strain of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1970;101:989-96.

Diedrich DL, Portnoy CA, Conti SF. *Bdellovibrio* possesses a prey-derived OmpF protein in its outer membrane. Curr Microbiol 1983;8:51-6.

Diedrich DL, Portnoy Duran C, Conti SF. Acquisition of *Escherichia coli* outer membrane proteins by *Bdellovibrio* sp. strain 109D. J Bacteriol 1984;159:329-34.

Edao A. Untersuchungen zum Vorkommen und zur Bedeutung von *Bdellovibrio bacteriovorus* im Magen-Darm-Trakt von Tieren und Menschen sowie in der Umwelt [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2000.

Eksztejn M, Varon M. Elongation and cell division in *Bdellovibrio bacteriovorus*. Arch Microbiol 1977;114:175-81.

Engelking HM, Seidler RS. The involvement of extracellular enzymes in the metabolism of *Bdellovibrio*. Arch Microbiol 1974;95:293-304.

Fackrell HB, Robinson J. Purification and characterization of a lytic peptidase produced by *Bdellovibrio bacteriovorus* 6-5-S. Can J Microbiol 1973;19:659-66.

Fang Q, Brockmann S, Botzenhart K, Wiedemann A. Improved detection of *Salmonella* spp. in foods by fluorescent in situ hybridization with 23 S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. J Food Prot 2003;66:723-31.

Fehlhaber K. Mikroorganismen. In: Fehlhaber K, Janetschke P, Hrsg. Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1992. S. 24-83.

Fehlhaber K. Gefährdung durch Salmonellen in Lebensmitteln - Bewertung von Salmonellenbefunden. Proceedings Behr's Seminar; 1997 Apr 17; Hamburg. 1997.

Fehlhaber K, Krüger A, Schnabel M, Krutsch HW. *Salmonella* - Vorkommen bei tauglich beurteilten Schlachtschweinen. Fleischwirtsch 1996;76:1167-9.

Fehlhaber K, Lingstädt H, Reglich K, Braun P. Investigations of biological properties of *Salmonella* Enteritidis relevant for food hygiene. Proceedings des 3. Weltkongreß Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen C4; 1992; Berlin. 1992.

Filip Z, Schmelz P, Smed-Hildmann R. *Bdellovibrio* sp. - A predator under groundwater conditions? A short communication. Water Sci Technol 1991;24:321-4.

Fisher IST. The Enter-net international surveillance network - how it works. Euro Surveill 1999;4:52-5.

Fratamico, PM. Isolation of bdellovibrios that prey on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* species. 1995 (zitiert vom 26.10.1995):1<<http://www.nalusda.gov/ttic/tektran/data/000006/48/0000064842.html>>.

Fratamico PM, Whiting RC. Ability of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J to lyse Gram-negative food-borne pathogenic and spoilage bacteria. J Food Prot 1995;58:160-4.

Friedberg D. Growth of host dependent *Bdellovibrio* in host cell free system. Arch Microbiol 1978;116:185-90.

Friedberg D, Friedberg I. Membrane-associated, energy-linked reactions in *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1976;127:1382-8.

Fries R. Einfluß des Tiefgefrierens auf die Wiederfindungsrate von Mikroorganismen. Proceedings der 35. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene" der DVG; 1994 Sep 27-30; Garmisch-Partenkirchen. Gießen: Verlag der DVG e.V.; 1994.

Fry JC, Staples DG. The occurrence and role of *Bdellovibrio bacteriovorus* in a polluted river. *Water Res* 1974;8:1029-35.

Fry JC, Staples DG. Distribution of *Bdellovibrio bacteriovorus* in sewage works, river water, and sediments. *Appl Environ Microbiol* 1976;31:469-74.

Gadkari D, Stolp H. Energy metabolism of *Bdellovibrio bacteriovorus*. I. Energy production, ATP pool, energy charge. *Arch Microbiol* 1975;102:179-85.

Galdiero F. Membrane damage and incorporation of *Escherichia coli* components into *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Zbl Bakt Hyg, I. Abt Orig A* 1975; 230:203-9.

Gareis M. Salmonellen - Ein Überblick. *Fleischwirtsch* 1995;75:954-7.

Gebreyes WA, Davies PR, Morrow WE, Funk JA, Altier D. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. *J Clin Microbiol* 2000;38:4633-6.

Germida JJ. Isolation of *Bdellovibrio* spp. that prey on *Azospirillum brasilense* in soil. *Can J Microbiol* 1987;33:459-61.

Gloor L, Klubek B, Seidler RJ. Molecular heterogeneity of the bdellovibrios: metallo and serine proteases unique to each species. *Arch Microbiol* 1974;95:45-56.

Goldrick BA. Emerging infections: Foodborne disease. *Am J Nurs* 2003;103:105.

Gordon RF, Stein MA, Diedrich DL. Heat shock-induced axenic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* 1993;175:2157-61.

Gray KM, Ruby EG. Unbalanced growth as a normal feature of development of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Arch Microbiol* 1989;152:420-4.

Gray KM, Ruby EG. Prey-derived signals regulating duration of the developmental growth phase of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* 1990;172:4002-7.

Guerrero R, Pedros-Alio C, Esteve I, Mas J, Chase D, Margulis L. Predatory prokaryotes: Predation and primary consumption evolved in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2138-42.

Hartung M. Ergebnisse der Jahreseerhebung 1994 über Salmonellenbefunde. Proceedings der 48. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS); 1995 Jun 20-22; Berlin. 1995.

Hartung M. Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 1999. BgVV-Hefte 08/2000. Berlin. 2000

Hartung M. Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 2001. BgVV-Hefte 06/2002. Berlin. 2002

Hashimoto T, Diedrich DL, Conti SF. Isolation of a bacteriophage for *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Virol* 1970;5:97-8.

Hensel A. Neue Erkenntnisse zur Pathogenese der Salmonellen. Bericht des 24. Kongresses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. Leitthema: „Aktuelle Forschung“; 2001 Apr 4-7; Bad Nauheim. Gießen: Verlag der DVG e.V.; 2001. S. 296-7.

Hennessy TW, Hedberg CW, Slutsker L, White KE, Besser-Wiek JM, Moen ME, et al. A national outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections from ice cream. N Engl J Med 1996;334:1281-6.

Hespell RB. Glycolytic and tricarboxylic acid cycle enzyme activities during intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* on *Escherichia coli*. J Bacteriol 1976;128:677-80.

Hespell RB, Mertens M. Effects of nucleic acid compounds on viability and cell composition of *Bdellovibrio bacteriovorus* during starvation. Arch Microbiol 1978;116:151-9.

Hespell RB, Miozzari GF, Rittenberg SC. Ribonucleic acid destruction and synthesis during intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1975;123:481-91.

Hespell RB, Odelson DA. Metabolism of RNA-ribose by *Bdellovibrio bacteriovorus* during intraperiplasmic growth on *Escherichia coli*. J Bacteriol 1978;136:936-46.

Hespell RB, Paster BJ, Macke TJ, Woese CR. The origin and phylogeny of the Bdellovibrios. Syst Appl Microbiol 1984;5:196-203.

Hespell RB, Rosson RA, Thomashow MF, Rittenberg SC. Respiration of *Bdellovibrio bacteriovorus* strain 109J and its energy substrates for intraperiplasmic growth. J Bacteriol 1973;113:1280-8.

Hespell RB, Thomashow MF, Rittenberg SC. Changes in cell composition and viability of *Bdellovibrio bacteriovorus* during starvation. Arch Microbiol 1974;97:313-27.

Hoener JFM, Ladwig R, Moor H. The fine structure of “resting bodies” of *Bdellovibrio* sp. strain W developed in *Rhodospirillum rubrum*. Can J Microbiol 1972;18:87-92.

Horby PW, O'Brien SJ, Adak GK, Graham C, Hawker JI, Hunter P, et al. A national outbreak of multi-resistant *Salmonella* enterica serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. Epidemiol Infect 2003;130:169-78.

Horowitz AT, Kessel M, Shilo M. Growth cycle of predacious Bdellovibrios in a host-free extract system and some properties of the host extract. J Bacteriol 1974;117:270-82.

Houston KJ, Aldridge KE, Magee LA. The effect of R antigen on the attachment of

Bdellovibrio bacteriovorus to *Salmonella* Typhimurium. Acta Microbiol Pol 1974;6: 253-5.

Hu L, Liu BY. Isolation of *Bdellovibrio bacteriovorus*. Chinese J Microbiol Immunol 1990;10:95-8.

Huang JC-C, Starr MP. Possible enzymatic bases of bacteriolysis by bdellovibrios. Archiv Mikrobiol 1973a;89:147-67.

Huang JC-C, Starr MP. Effects of calcium and magnesium ions and host viability on growth of *Bdellovibrio*. Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol 1973b;39:151-67.

Ibrahimov FK. Dissemination of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the animal body and their interaction with the casuative agents of acute intestinal infections. J Hyg and Sanit 1977;1:60-1.

Ishiguro EE. A growth initiation factor for host-independent derivates of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1973;115:243-52.

Ishiguro EE. Minimum nutritional requirements for growth of host-independent derivates of *Bdellovibrio bacteriovorus* strain 109 Davis. Can J Microbiol 1974;20: 263-5.

Jackson L, Whiting RC. Reduction of an *Escherichia coli* K12 population by *Bdellovibrio bacteriovorus* under various in vitro conditions of parasite: host ratio, temperature, or pH. J Food Prot 1992;55:859-61.

Jones MA, Wood MW, Mullan PB, Watson RR, Wallis TS, Galyov EE. Secreted effector proteins of *Salmonella* Dublin act in concert to induce enteritis. Infect Immun 1998;66:5799-804.

Jurkevitch E, Minz D, Ramati B, Barel G. Prey range characterization, ribotyping and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. Appl Environ Microbiol 2000;66:2365-71.

Kelley JL, Turng BF, Williams HN, Baier ML. Effect of temperature, salinity and substrate on the colonization of surfaces in situ by aquatic bdellovibrios. Appl Environ Microbiol 1997;63:84-90.

Kessel M, Shilo M. Relationship of *Bdellovibrio* elongation and fission to host cell size. J Bacteriol 1976;128:477-80.

Kist M. Epidemiologie humaner Salmonellosen: Abhängigkeit von Verbreitungswegen, Infektionsdosis und Pathogenität der Erreger. Proceedings "Salmonellosen - Schicksal oder Fehlverhalten?" der TÜV-Akademie Rheinland; 1993 Jun 15-16; Köln. 1993.

Klein DA, Casida, Jr LE. Occurrence and enumeration of *Bdellovibrio bacteriovorus* in soil capable of parasitizing *E. coli* and indigenous soil bacteria. Can J Microbiol 1967;13:1235-41.

Koval SF, Bayer ME. Bacterial capsules: no barrier against *Bdellovibrio*. *Microbiology* 1997;143:749-53.

Koval SF, Hynes SH. Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* 1991;173:2244-9.

Krämer J. *Lebensmittelmikrobiologie*. 2. Auflage. Stuttgart: Ulmer Verlag; 1992.

Krüger M, Hagenau K, Edao A. Biologisches Desinfektionsmittel: *Bdellovibrio*-Bakterien. Transferbrief Leipzig 1999; 2/99: 6.

Kühn H. Vorkommen von Enteritis-Salmonellen beim Menschen. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 1993;100:255-8.

Kühn H. Epidemiology of Salmonellosis in Germany. *Biotest Bull* 1995a;5:157-70.

Kühn H. Vorkommen und epidemische Verbreitung. In: Kühn H, Tschäpe H, Hrsg. *Salmonellosen des Menschen - Epidemiologische und ätiologische Aspekte*. München: MMV Medizin Verlag; 1995b. RKI-Schriften 3/95, S. 19-35.

Kühn H, Tschäpe H. *Salmonellosen des Menschen - Epidemiologische und ätiologische Aspekte*. München: MMV Medizin Verlag; 1995. RKI-Schriften 3/95, S. 5-18.

Kuenen JG, Rittenberg SC. Incorporation of long-chain fatty acids of the substrate organism by *Bdellovibrio bacteriovorus* during intraperiplasmic growth. *J Bacteriol* 1975;121:1145-57.

Lamarre AG, Straley SC, Conti SF. Chemotaxis toward amino acids by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* 1977;131:201-7.

Lambina VA, Afigenova AV, Penabad SR, Konolova SM, Pushkareva AP. *Micavibrio admirandus* gen. et sp. nov. (orig. russ.) *Mikrobiologija* 1982;51:103-6.

Lambina VA, Ledova LA, Churkina LG. Importance of *Bdellovibrio* in regulating microbial cenoses and self-purification processes in domestic sewage. (orig. russ.) *Mikrobiologija* 1987;56:860-4.

Lambina VA, Ledova LA, Situkhina NS. The participation of *Bdellovibrio* in the process of sewage self-purification. (orig. russ.) *Mikrobiologija* 1981;50:140-6.

Le Minor L. The genus *Salmonella*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, Hrsg. *The Procaryotes*, Vol. III. 2. Auflage. New York: Springer-Verlag; 1992. S. 2760-74.

Lenz RW, Hespell RB. Attempts to grow *Bdellovibrio* micurgically- injected into animal cells. *Arch Microbiol* 1978;119:245-8.

Lu L, Walker WA. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the

gastrointestinal epithelium. Am J Clin Nutr 2001;73 Suppl:1124-30.

Marbach A, Varon M, Shilo M. Properties of marine *Bdellovibrios*. Microb Ecol 1976; 2:284-95.

McCann MP, Solimeo HT, Cusick F, Panuti B, McCullen C. Developmentally regulated protein synthesis during intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. Can J Microbiol 1998;44:50-5.

Mamkaeva KA, Plyushch AV, Titova NN, Gromov BV. Dynamics of attack on cells of *Chlorella* in a culture infected by the parasitic bacterium *Vampirovibrio chlorellavorus*. (orig. russ.) Mikrobioloia 1988;57:116-9.

Matin A, Rittenberg SC. Kinetics of deoxyribonucleic acid destruction and synthesis during growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* strain 109J on *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. J Bacteriol 1972;111:664-73.

Müller HE. Über die unterschiedliche Infektiosität und Pathogenität von 187 *Salmonella*-Serotypen. Bundesgesundhbl 1979;22:329-38.

Neal JJ, Banwart GJ. *Bdellovibrio* in Foods. Journal of Food Science 1977;42:555-6.

Nelson DR, Rittenberg SC. Incorporation of substrate cell lipid A components into the lipopolysaccharide of intraperiplasmically grown *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1981a;147:860-8.

Nelson DR, Rittenberg SC. Partial characterization of lipid A of intraperiplasmically grown *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1981b;147:869-74.

NN. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG) vom 20.07.2000. BGBl. I S. 1045, zuletzt geändert durch Art. 11 §3 des Gesetzes zur Neuordnung des gesundheitlichen Verbraucherschutzes und der Lebensmittelsicherheit vom 06.08.2002. BGBl. I S. 3082.

NN. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses-selected sites, United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2003;18:340-3.

O'Brien SJ, de Valk H. *Salmonella* - "old" organism, continued challenges! Euro Surveill 2003;8:29-31.

Odelson DA, Patterson MA, Hespell RB. Periplasmic enzymes in *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Bdellovibrio stolpii*. J Bacteriol 1982;151:756-763.

Old DC. Nomenclature of *Salmonella*. J Med Microbiol 1992;37:361-3.

Parker CA, Grove PL. *Bdellovibrio bacteriovorus* parasitizing *Rhizobium* in Western Australia. J Appl Bacteriol 1970;33:253-5.

Pöhn HP, Zastrow K-D, Grossmann R. Infektionskrankheiten: Epidemiologische

Situation 1989 in der Bundesrepublik Deutschland. Bundesgesundhbl 1991;34:199-202.

Poppe C, Ayroud M, Ollis G, Chirino-Trejo M, Smart N, Quessy S, et al. Trends in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animals, foods of animal origin, and the environment of animal production in Canada, 1994-1997. Microb Drug Resist 2001;7:197-212.

Pritchard MA, Langley D, Rittenberg SC. Effects of methotrexate on intraperiplasmic and axenic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1975;121:1131-6.

Rabsch W, Kühn H. Complex typing of *Salmonella* as a tool for the epidemiological surveillance from 1972-1991. Proceedings of the 3rd World Congress of Foodborne Infections and Intoxications; 1992 Jun 16-19; Berlin. 1992.

Rasch G. Meldepflichtige Infektionskrankheiten in Deutschland. Bundesgesundhbl 1993;36:481-4.

Rasch G. Lebensmittelinfektionen beim Konsumenten verursacht durch Zoonoseerreger. Proceedings des 392. Seminar "Lebensmittelsicherheit durch Gesundheits- und Umweltschutz im Tierbereich" der FGU Berlin e.V.; 1996 Sep 25-27; Berlin. 1996.

Rayner JR, Cover WH, Martinez RJ, Rittenberg SC. *Bdellovibrio bacteriovorus* synthesizes an OmpF-like outer membrane protein during both axenic and intraperiplasmic growth. J Bacteriol 1985;163:595-9.

Reiner AM, Shilo M. Host-independent growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* in microbial extracts. J gen Microbiol 1969;59:401-10.

Rice TD, Williams HN, Turng BF. Susceptibility of bacteria in estuarine environments to autochthonous bdellovibrios. Microb Ecol 1998;35:256-64.

Richardson IR. The incidence of *Bdellovibrio* spp. in man-made water systems: coexistence with legionellas. J Appl Bacteriol 1990;69:134-40.

Rittenberg SC. Nonidentity of *Bdellovibrio* strains 109D and 109J. J Bacteriol 1972;109:432-3.

Rittenberg SC. *Bdellovibrio*: attack, penetration, and growth on its prey. Amer Soc Microbiol News 1983;49:435-9.

Rittenberg SC, Hespell RB. Energy efficiency of intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1975;121:1158-65.

Rittenberg SC, Langley D. Utilization of nucleoside monophosphates per se for intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1975;121:1137-44.

Rittenberg SC, Shilo M. Early host damage in the infection cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1970;102:149-60.

Robert Koch Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2002. Berlin: Robert Koch Institut; 2003.

Robert Koch Institut und Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. Jahresbericht 1997 über meldepflichtige Infektionskrankheiten in Deutschland. Teil 1: Darminfektionen - Salmonellose. Epidemiol Bull 1998;8:47.

Robert Koch Institut und Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. Jahresstatistik 2000: Enteritis infectiosa nach wichtigen Erregern. Epidemiol Bull 2001;22:157.

Roberts RC, Keefer MA, Ranu RS. Characterization of *Bdellovibrio bacteriovorus* bacteriophage MAC-1. J gen Microbiol 1987;133:3065-70.

Roberts RC, Ranu RS. Transfection of *Bdellovibrio bacteriovorus* with bacteriophage MAC-1 DNA. FEMS Microbiol Lett 1987;43:207-11.

Rolle M, Mayr A. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus anderen Fachgebieten. 6. Auflage. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1993.

Romo AJ, Ruby EG, Saier, Jr MH. Effect of *Bdellovibrio bacteriovorus* infection on the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Escherichia coli*: evidence for activation of cytoplasmic proteolysis. Res Microbiol 1992;143:5-14.

Rosson RA, Rittenberg SC. Regulated breakdown of *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid during intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. J Bacteriol 1979;140:620-33.

Rosson RA, Rittenberg SC. Pyrimidine metabolism of *Bdellovibrio bacteriovorus* grown intraperiplasmically and axenically. J Bacteriol 1981;146:108-16.

Ruby EG. The genus *Bdellovibrio*. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, editors. The procaryotes. 2nd ed. New York: Springer Verlag; 1991. p. 3400-15.

Ruby EG, McCabe JB. An ATP transport in the intracellular bacterium, *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. J Bacteriol 1986;167:1066-70.

Ruby EG, McCabe JB. Metabolism of periplasmic membrane-derived oligosaccharides by the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. J Bacteriol 1988;170:646-52.

Ruby EG, McCabe JB, Barke JI. Uptake of intact nucleoside monophosphates by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. J Bacteriol 1985;163:1087-94.

Ruby EG, Rittenberg SC. Differentiation after premature release of intraperiplasmically growing *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1983;154:32-40.

Ruby EG, Rittenberg SC. Attachment of diaminopimelic acid to bdelloplast peptidoglycan during intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. J Bacteriol 1984;158:597-602.

Saier MH. Protein uptake into *E. coli* during *Bdellovibrio* infection. A process of reverse secretion? FEBS Lett 1994;337:14-7.

Schelling M, Conti S. Host receptor sites involved in the attachment of *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Bdellovibrio stolpii*. FEMS Microbiol Lett 1986;36:319-23.

Scherff RH. Control of bacterial blight of soybean by *Bdellovibrio bacteriovorus*. Phytopathology 1973;63:400-2.

Scherff RH, DeVay JE, Carroll TW. Ultrastructure of host-parasite relationships involving reproduction of *Bdellovibrio bacteriovorus* in host bacteria. Phytopathology 1966;56:627-3.

Schmidt U. Kontrolle von Lebensmittelvergiftungen bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen. In: Kulmbacher Reihe, Bd. 10, 1990. S. 44-67.

Schoeffield AJ, Williams HN. Efficiencies of recovery of bdellovibrios from brackish-water environments by using various bacterial species as prey. Appl Environ Microbiol 1990;56:230-6.

Schottmüller H. Zur Ätiologie der akuten Gastroenteritis (Cholera nostras). Münch Wschr 1994;7:294-7.

Schroeter A, Hartung M, Pietzsch O, Rabsch W, Helmuth R. Zum *Salmonella*-Enteritidis-Geschehen in der Bundesrepublik Deutschland. Bundesgesundhbl 1992; 35:377-83.

Schwudke D, Strauch E, Krüger M, Appel B. Taxonomic studies of predatory bdellovibrios based on 16S rRNA analysis, ribotyping and the hit locus and characterization of isolates from the gut of animals. Syst Appl Microbiol 2001;24: 385-94.

Schwudke D, Linscheid M, Strauch E, Appel B, Zähringer U, Moll H, et al. The obligate predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* possesses a neutral lipid A containing α -D-mannoses that replace phosphate residues. Similarities and differences between the lipid As and the smooth-form lipopolysaccharides of the wild type strain *Bdellovibrio bacteriovorus* HD 100 and its host independent derivative HI 100. J Biol Chem. im Druck 2003.

Seidler RJ, Mandel M, Baptist JN. Molecular heterogeneity of the bdellovibrios: evidence of two new species. J Bacteriol 1972;109:209-17.

Seidler RJ, Starr MP. Structure of the flagellum of *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1968;95:1952-5.

Seidler RJ, Starr MP. Factors affecting the intracellular parasitic growth of

Bdellovibrio bacteriovorus developing within *Escherichia coli*. J Bacteriol 1969a;97:912-23.

Seidler RJ, Starr MP. Isolation and characterization of host-independent Bdellovibrios. J Bacteriol 1969b;100:769-85.

Seidler RJ, Starr MP, Mandel M. Deoxyribonucleic acid characterization of bdellovibrios. J Bacteriol 1969;100:786-90.

Selbitz H-J. Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1992.

Shilo M. Morphological and physiological aspects of the interaction of *Bdellovibrio* with host bacteria. Curr Top Microbiol Immunol 1969;50:174-204.

Shilo M, Bruff B. Lysis of gram-negative bacteria by host-independent ectoparasitic *Bdellovibrio bacteriovorus* isolates. J gen Microbiol 1965;40:317-28.

Simpson FJ, Robinson J. Some energy-producing systems in *Bdellovibrio bacteriovorus*, strain 6-5-S. Can J Biochem 1968;46:865-73.

Skov MN, Langvad B, Baggesen DL. Transmission of multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 between farms - investigated by the combined use of epidemiological and genotyping data. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other Foodborne Pathogens in Pork; 2001 Sep 2-5; Leipzig. 2001. p. 205-7.

Snellen JE, Starr MP. Ultrastructural aspects of localized membrane damage in *Spirillum serpens* VHL early in its association with *Bdellovibrio bacteriovorus*. Arch Microbiol 1974;100:179-95.

Snyder AR, Williams HN, Baer ML, Walker KE, Stine OC. 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity. Int J Syst Evol Microbiol 2002;52:2089-94.

Staples DG, Fry JC. Factors which influence the enumeration of *Bdellovibrio bacteriovorus* in sewage and river water. J Appl Bacteriol 1973;36:1-11.

Starr MP, Baigent NL. Parasitic interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* with other bacteria. J Bacteriol 1966;91:2006-2017.

Starr MP, Seidler RJ. The bdellovibrios. Ann Rev Microbiol 1971;25:649-78.

Stein RS, Barber LE, Hassan HM. Biosynthesis of oxygen-detoxifying enzymes in *Bdellovibrio stolpii*. J Bacteriol 1982;152:792-6.

Stein MA, McAllister SA, Torian BE, Diedrich DL. Acquisition of apparently intact and unmodified lipopolysaccharides from *Escherichia coli* by *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1992;174:2858-64.

Stolp H. Lysis von Bakterien durch den Parasiten *Bdellovibrio bacteriovorus*. Film C972. Göttingen, Institut für den wissenschaftlichen Film. Begleittext in Publikationen Wissenschaftlicher Film, 1967; Bd. A II: 695-706.

Stolp H. *Bdellovibrio bacteriovorus* - ein räuberischer Bakterienparasit. Naturwissenschaften 1968;55:57-63.

Stolp H. The bdellovibrios: bacterial parasites of bacteria. Annu Rev Phytopathol 1973;11:53-76.

Stolp H. The genus *Bdellovibrio*. In: Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A, Schlegel HG, editors. The procaryotes, Vol. 1. Berlin: Springer-Verlag KG; 1981. p. 618-29.

Stolp H, Petzold H. Untersuchungen über einen obligat parasitischen Mikroorganismus mit lytischer Aktivität für Pseudomonas-Bakterien. Phytopathol Z 1962;45:364-90.

Stolp H, Starr MP. *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol 1963;29:217-48.

Straley SC, Conti SF. Chemotaxis in *Bdellovibrio bacteriovorus*. J Bacteriol 1974; 120:549-51.

Straley SC, Conti SF. Chemotaxis by *Bdellovibrio bacteriovorus* toward prey. J Bacteriol 1977;132:628-40.

Straley SC, Lamarre AG, Lawrence LJ, Conti SF. Chemotaxis of *Bdellovibrio bacteriovorus* toward pure compounds. J Bacteriol 1979;140:634-42.

Sullivan CW, Casida, Jr LE. Parasitism of *Azotobacter* and *Rhizobium* species by *Bdellovibrio bacteriovorus*. Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol 1968;34: 188-96.

Talley BG, McDade, Jr RL, Diedrich DL. Verification of the protein in the outer membrane of *Bdellovibrio bacteriovorus* as the OmpF protein of its *Escherichia coli* prey. J Bacteriol 1987;169:694-8.

Taylor VI, Baumann P, Reichelt JL, Allen RD. Isolation, enumeration and host range of marine bdellovibrios. Arch Microbiol 1974;98:101-14.

Thomashow MF, Cotter TW. *Bdellovibrio* host dependence: the search for signal molecules and genes that regulate the intraperiplasmic growth cycle. J Bacteriol 1992;174:5767-71.

Thomashow MF, Rittenberg SC. Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: solubilization of *Escherichia coli* peptidoglycan. J Bacteriol 1978a;135:998-1007.

Thomashow MF, Rittenberg SC. Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: attachment of long chain fatty acids to *E. coli* peptidoglycan. J Bacteriol 1978b; 135:1015-23.

Thomashow LS, Rittenberg SC. Waveform analysis and structure of flagella and basal complexes from *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. J Bacteriol 1985a;163:1038-46.

Thomashow LS, Rittenberg SC. Isolation and composition of sheated flagella from *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. J Bacteriol 1985b;163:1047-54.

Threlfall EJ, Fisher IST, Berghold C. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe 2000: results of international multi-centre surveillance. Euro Surveill 2003;8:41-5.

Tomov A, Kassovsky V, Chorbadjiiska L, Tsvetkova E, Tsanev N, Vencheva Z. Lytic activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* against bacteria of the family Legionellaceae. Zbl Bakt Hyg, I. Abt Orig A 1982;252:96-100.

Torrella F, Guerrero R, Seidler RJ. Further taxonomic characterization of the genus *Bdellovibrio*. Can J Microbiol 1978;24:1387-94.

Tschäpe H. Ursachen des Auf und Ab der Salmonellosen des Menschen. Bundesgesundhbl 1996;39:260-3.

Tschäpe H, Kühn H. Virulenz und Verbreitung der Enteritis-Salmonellen. In: Zeitz M, Caspary WF, Bockemühl J, Lux G, Hrsg. Ökosystem Darm. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1993. S. 14-38.

Tudor JJ, Conti SF. Characterization of bdellocysts of *Bdellovibrio* sp. J Bacteriol 1977a;131:314-22.

Tudor JJ, Conti SF. Ultrastructural changes during encystment and germination of *Bdellovibrio* sp. J Bacteriol 1977b;131:323-30.

Tudor JJ, Conti SF. Characterization of germination and activation of *Bdellovibrio* bdellocysts. J Bacteriol 1978;133:130-8.

Tudor JJ, Karp MA. Translocation of an outer membrane protein into prey cytoplasmic membranes by *Bdellovibrio*. J Bacteriol 1994;176:948-52.

Tudor JJ, McCann MP, Acrich IA. A new model for the penetration of prey cells by bdellovibrios. J Bacteriol 1990;172:2421-6.

Varon M. Selection of predation-resistant bacteria in continuous culture. Nature 1979; 277:386-8.

Varon M. Interaction of *Bdellovibrio* with its prey in mixed microbial populations. Microb Ecol 1981;7:97-105.

Varon M, Fine M, Stein A. The maintenance of *Bdellovibrio* at low prey density. *Microb Ecol* 1984;10:95-8.

Varon M, Levisohn R. Three-membered parasitic system: A bacteriophage, *Bdellovibrio bacteriovorus*, and *Escherichia coli*. *J Virol* 1972;9:519-25.

Varon M, Shilo M. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria. I. Kinetic studies of attachment and invasion of *Escherichia coli* B by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* 1968;95:744-53.

Varon M, Shilo M. Attachment of *Bdellovibrio bacteriovorus* to cell wall mutants of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1969a;97:977-9.

Varon M, Shilo M. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria. II. Intracellular growth and development of *Bdellovibrio bacteriovorus* in liquid cultures. *J Bacteriol* 1969b;99:136-41.

Varon M, Shilo M. Inhibition of predatory activities of *Bdellovibrio* by various environmental pollutants. *Microb Ecol* 1981;7:107-11.

Varon M, Zeigler BP. Bacterial predator-prey interaction at low prey density. *Appl Environ Microbiol* 1978;36:11-7.

Watanabe Y, Nakajima M, Hoshino T, Jayasimhulu K, Brooks EE, Kaneshiro ES. A novel sphingophosphonolipid head group 1-hydroxy-2-aminoethyl phosphonate in *Bdellovibrio stolpii*. *Lipids* 2001;36:513-9.

Wichmann-Schauer H, Ellerbroek L, Dorn C, Schröter A, Helmuth R. Antibiotikaresistenz bei Salmonellen aus Hähnchenmast- und schlachtbetrieben. Proceedings der 42. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG; 2001 Sep 25-28; Garmisch-Partenkirchen. Gießen: Verlag der DVG e.V.; 2001.

Wilkinson MHF. Predation in the presence of decoys: An inhibitory factor on pathogen control by bacteriophages or bdellovibrios in dense and diverse ecosystems. *J theor Biol* 2001;208:27-36.

Williams HN. A study of the occurrence and distribution of *Bdellovibrios* in estuarine sediment over an annual cycle. *Microb Ecol* 1988;15:9-20.

Williams HN, Falkler, Jr WA, Shay DE. Incidence of marine bdellovibrios lytic against *Vibrio parahaemolyticus* in Cheapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 1980;40:970-2.

Williams HN, Falkler, Jr WA, Shay DE. Seasonal distribution of bdellovibrios at the mouth of the Patuxent River in the Chesapeake Bay. *Can J Microbiol* 1982;28:111-6.

Williams HN, Kelley JI, Baer ML, Turng B-F. The association of bdellovibrios with surfaces in the aquatic environment. *Can J Microbiol* 1995a;41:1142-7.

Williams HN, Schoeffield AJ, Guether D, Kelley J, Shah D, Falkler, Jr WA. Recovery of bdellovibrios from submerged surfaces and other aquatic habitats. *Microb Ecol*

1995b;29:39-48.

Ziprin RL. *Salmonella*. In: Hui YH, Gorham JR, Murell KD, Cliver DO, Hrsg. Foodborne disease handbook. Vol. 1. Diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker; 1994. p. 253-318.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die stets freundliche und persönlich engagierte Unterstützung während der Durchführung und Erstellung der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Fehlhaber herzlich danken.

Des weiteren möchte ich Frau Prof. Dr. M. Krüger sowie Herrn Dr. A. Edao und allen Mitarbeitern des Instituts für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig für ihre Unterstützung danken.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn A. Richter für seine wertvollen und hilfreichen Ratschläge bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern und Kollegen des Institutes für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.