

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Aus dem Institut für Meereskunde an der Universität Kiel

Untersuchungen zur Verbreitung von Phagen der Gattung *Agrobacterium* in der Ostsee

VON RENATE AHRENS

Zusammenfassung: Phagen für *Agrobacterium stellulatum* A 18 und A 22 sind im Wasser der Kieler Bucht regelmäßig anzutreffen. Die höchsten Werte lagen hier bei 3700 bzw. 8100 pfu/ml. Die Zahl der Phagen für A 18 ist unabhängig von Abwassereinflüssen. Die Phagenzahl sinkt mit fallenden Salzgehalten des Brackwassers, wenn ‰ unterschritten werden. In der Kieler Förde zeigte die Entwicklung von Agrobakterien und Phagen kurzzeitige gleichsinnige Schwankungen. Hier wurden die absolut höchsten Phagenzahlen mit 25500 bzw. 36500 pfu/ml festgestellt.

Phagen für *A. stellulatum* und *A. ferrugineum* befallen selektiv wenige Stämme der Art; zwischen den Arten erfolgt keine Reaktion. — Die Wurfgröße (burst-size) betrug für einen Phagen von *A. stellulatum* 35 Phagen/Zelle, für einen Phagen von *A. ferrugineum* 120 Phagen/Zelle. 10^5 pfu/ml des ersten Phagen starben in Brackwasser innerhalb 4 Wochen völlig ab. Beim zweiten Phagen starben $2 \cdot 10^6$ pfu/ml in 2 Wochen ab.

Distribution of phages active against the genus *Agrobacterium* in the Baltic (Summary): Phages active against *Agrobacterium stellulatum* strains A 18 and A 22 are regularly found in water from the Kiel Bay. The highest values for this area were 3700 and 8100 pfu/ml, respectively. The number of phages against strain A 18 is independent of waste-water of domestic origine. Below ‰, the phage counts drop with decreasing salinities of brackish water. In the Kiel Fjord the development of Agrobacteria and phages show short-term fluctuations corresponding to each other. The highest phage counts in all made up 25500 and 36500 pfu/ml, respectively.

Phages for *A. stellulatum* and *A. ferrugineum* react with comparatively few strains of the species. There are no cross-reactions between species. The burst-size of phage 369 active against *A. stellulatum* A 18 made up 35 phage particles per cell, that of phage 360 for *A. ferrugineum* A 7 was 120 phages per cell. 10^5 pfu/ml of the former died off in brackish water within 4 weeks, $2 \cdot 10^6$ pfu/ml of the latter died off within a fortnight.

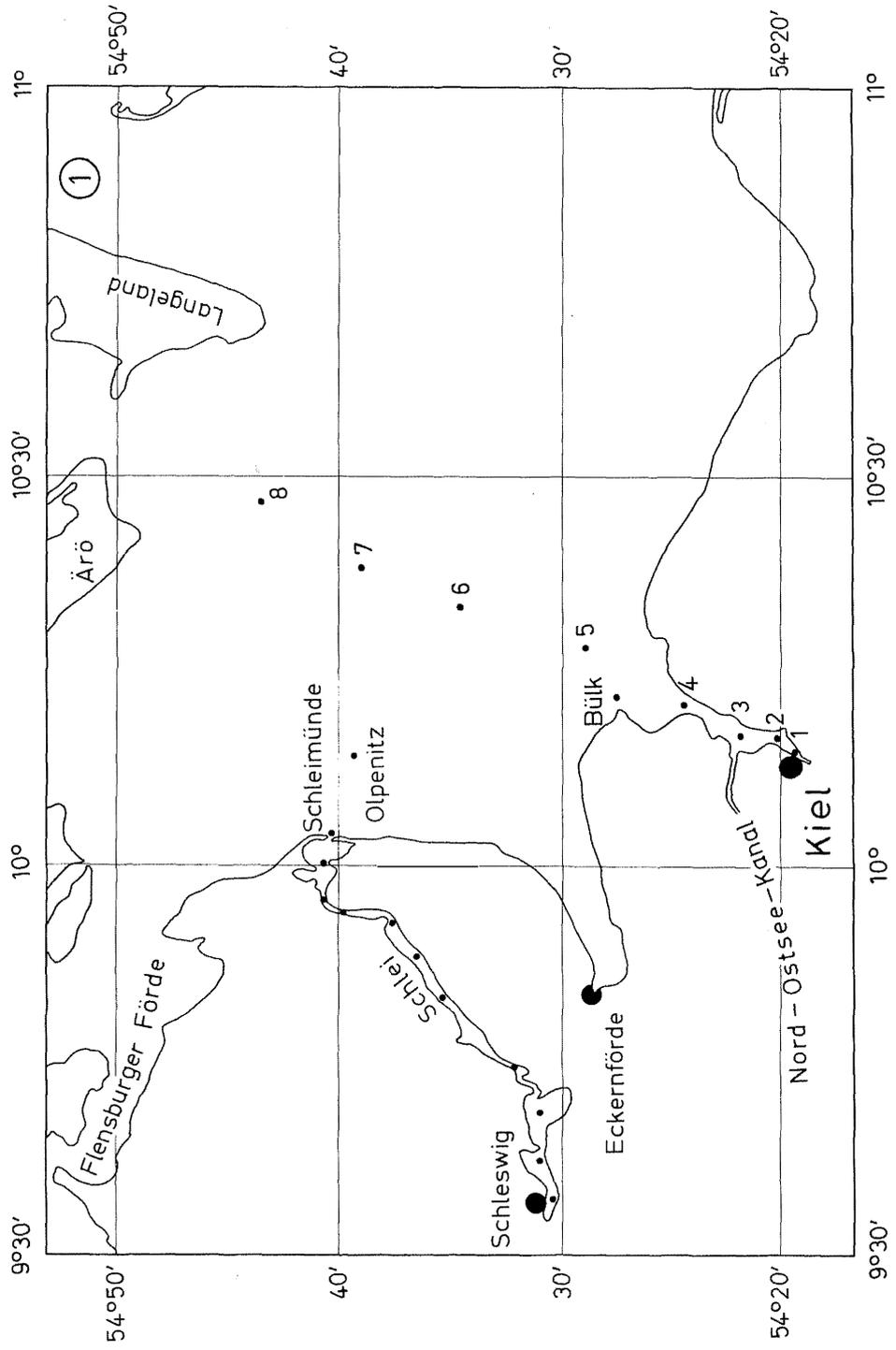
Einleitung

Obwohl das Vorkommen von Bacteriophagen im marinen Bereich bekannt ist, weiß man wenig über ihre Verbreitung. In Küstennähe findet man hauptsächlich Phagen, die Darmbakterien der Familie *Enterobacteriaceae* befallen. Sie stammen aus Abwasser und fehlen in der offenen See. Vereinzelt wurden Phagen mariner Bakterien aus küstennahem Seewasser isoliert (ZOBELL, 1946; CARLUCCI et al., 1960). KRISS und RUKINA (1947) wiesen solche Phagen erstmalig außerhalb des Litorals nach. Bei 5 Stationen des Schwarzen Meeres mit Gesamttiefen zwischen 1730 und 2240 m wurden Wasser- und Sedimentproben entnommen. Für eine Reihe Meeresbakterien von den gleichen Stationen ließen sich Phagen gewinnen. SPENCER (1955, 1960) fand in der Nordsee 7 Bacteriophagen, die auf Bakterien aus diesem Gebiet parasitieren.

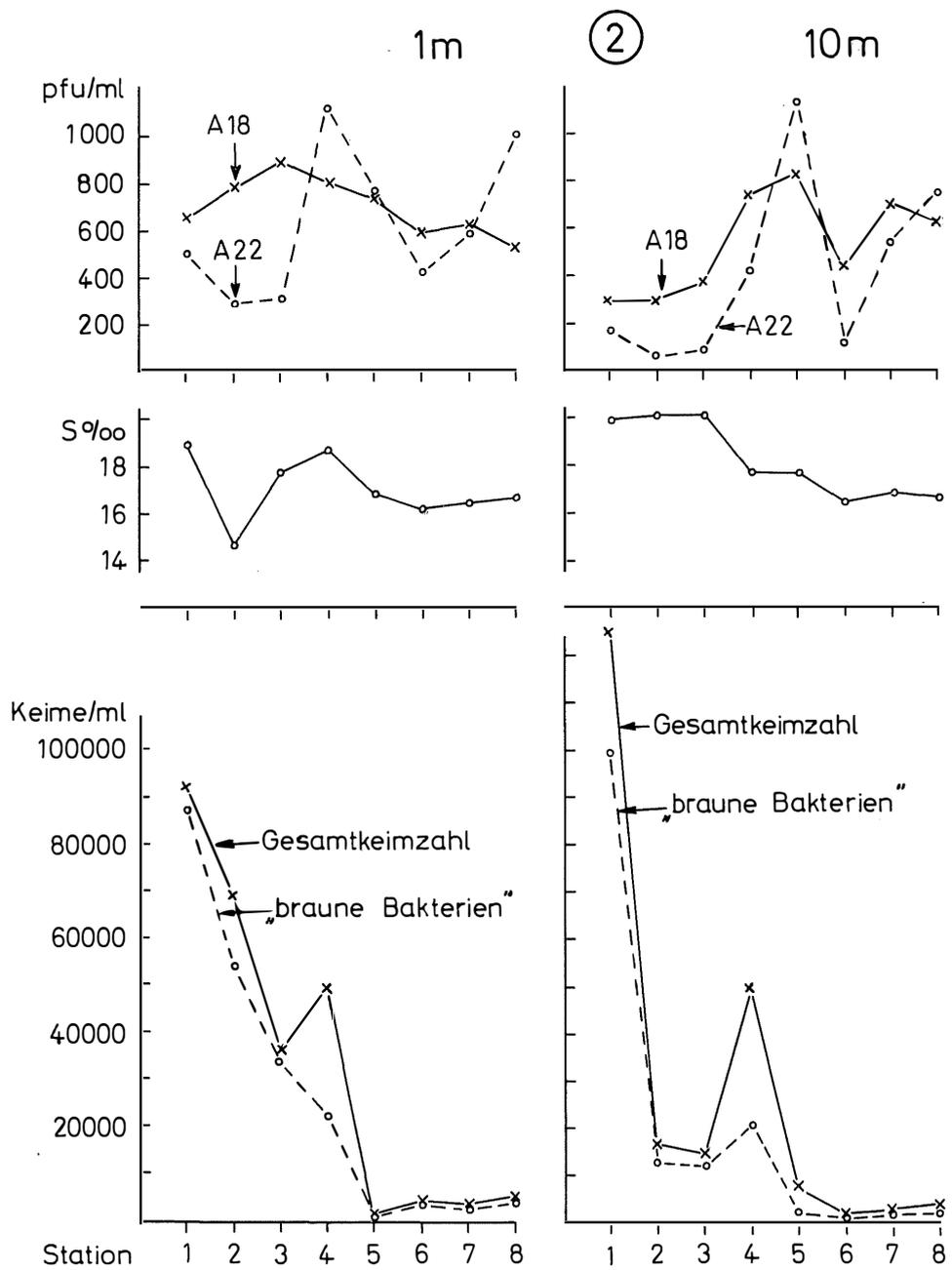
Die Zahlen mariner Phagen sind ebenso wie die ihrer Wirtsbakterien durchweg gering und können selten direkt ermittelt werden. Meist sind diese Phagen erst nach

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 1)

Abb. 1: Die Kieler Bucht mit ihren Förden. Eingezeichnet sind 8 Stationen von der Kieler Förde zur Kieler Bucht (vgl. Abb. 2), 12 Stationen von Olpenitz bis Schleswig (vgl. Abb. 3) und die Kieler Abwassereinleitung bei Bülk (vgl. Abb. 4).



Tafel 1 (zu R. Ahrens)



Tafel 2 (zu R. Ahrens)

Anreicherung in Seewasser nachweisbar. Quantitative Untersuchungen liegen daher kaum vor. Für die Nordsee wurde der bisher höchste Wert mit 10 Phagen/ml bestimmt (SPENCER, 1960).

Anders liegen die Verhältnisse in der Ostsee. Hier dominieren im Bereich der Kieler Bucht die heterotrophen Brackwasserorganismen *Agrobacterium stellulatum* und *A. ferrugineum*, deren Zahl meist einige Tausend im Milliliter beträgt ((AHRENS, 1968, 1969). Erwartungsgemäß lag auch die Zahl ihrer Phagen so hoch, daß eine direkte Zählung möglich war. Durch Behandlung der Wasserproben mit Chloroform (FREDERICQ, 1950) statt der sonst gebräuchlichen Filtration konnten bequem Serien von 10—30 Proben aufgearbeitet werden.

Es wurden Beziehungen zwischen der Verteilung von *A. stellulatum* und *A. ferrugineum* und ihren Phagen gesucht. Die quantitativen Bestimmungen wurden durch Untersuchungen von Phagenreinkulturen ergänzt.

METHODEN

Bestimmung der Phagenzahl: Je 10 ml der steril entnommenen Wasserprobe (Schöpfer nach ZOBELL) wurden in sterile Reagenzgläser pipettiert und mit 0,3 ml CHCl_3 vermischt. Je 1 ml der wäßrigen Phase wurde mit 0,2—0,5 ml des betreffenden Wirtsbakteriums nach der Zweischichtagar-Methode ausgeplattet (ADAMS, 1959). Die Unterschicht bestand aus Pepton-Hefeextrakt-Agar nach ZOBELL (2216 E) mit einem Agargehalt von 1,5% und einem Salzgehalt von 24‰ , pH 7,6. Für die Oberschicht wurden je 2,5 ml des gleichen Agars mit 1,1% Agar, S 10‰ , pH 7,0, verwendet. (Wurde der salzreichere Agar für beide Phasen verwendet, so war die Phagenausbeute geringer. Bestanden beide Schichten aus dem salzärmeren Agar, so gedieh der Bakterienrasen schlecht.) Nach 3tägiger Bebrütung bei 20° C waren alle Plaques im Bakterienrasen deutlich ausgebildet.

Die chloroformbehandelten Proben konnten ohne nennenswerten Rückgang der Phagenzahl bis zu 1 Tag aufbewahrt werden. In der Regel wurden sie nach 30 Minuten auf dem Schiff oder am selben Tag im Labor aufgearbeitet.

Die Chloroformbehandlung erwies sich der Filtration als überlegen, da sie wesentlich handlicher ist, die Zahl der Ansätze nicht auf die Zahl der Filtriergeräte beschränkt und höhere Ausbeuten liefert. Bei ein und derselben Wasserprobe ergab die Behandlung mit Chloroform 780 pfu/ml, die Filtration durch Sartorius-Membranfilter in Abhängigkeit von der Porenweite 140 pfu/ml (0,6 μ), 94 pfu/ml (0,45 μ) bzw. 37 pfu/ml (0,2 μ). Entgegen den Angaben von SPENCER (1963) beeinträchtigte die Chloroformbehandlung das Bakterienwachstum nicht, wenn nach Absitzen der Chloroformphase 1 ml des Überstandes ausgeplattet wurde.

Da jede Phagenbestimmung auch bei guter Ausbeute nicht alle Phagen erfaßt, werden die Zahlen als plaque-forming units pro Milliliter (pfu/ml) angegeben, nicht als Phagen/ml.

Bakterienstämme: Als Wirtsbakterien für die Phagengewinnung dienten folgende Stämme:

A. stellulatum (einschließlich nicht sternbildender Mutanten) A 1, A 4, A 5, A 6, A 17, A 18, A 21, A 22, A 23, A 26, A 29, A 36, A 38, A 69 (s. AHRENS, 1968)

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 2)

Abb. 2: Schnitt von der Kieler Förde zur Kieler Bucht am 17. 9. 70. Gesamtkeimzahlen und „braune Bakterien“ wurden auf Pepton-Hefeextrakt-Agar von S 16‰ ermittelt.

- A. ferrugineum* A 3, A 7, A 10, A 13, A 43 (s. AHRENS, 1968)
A. spec. (Zwischenform der beiden ersten Arten) A 14 (s. AHRENS, 1968)
A. spec. ähnlich *A. stellulatum* und *A. ferrugineum* C 3, C 4, C 8, C 9, A 34 (s. AHRENS, 1970)
A. luteum A 61 (s. AHRENS, 1968)
A. sanguineum A 92 (s. AHRENS, 1968)
A. tumefaciens NCMB 8150 (National Collection of Marine Bacteria, Aberdeen, Schottland)
A. radiobacter NCMB 8149 (National Collection of Marine Bacteria, Aberdeen, Schottland)
A. stellulatum 2 Ma|E (s. SIEBERT und SCHWARTZ, 1956)

Die Arten *A. stellulatum* und *A. ferrugineum* (die „braunen Bakterien“) waren Gegenstand früherer taxonomischer und ökologischer Untersuchungen (AHRENS, 1968, 1969). Eine ihnen ähnliche *Agrobacterium*-Gruppe von etwas abweichender Morphologie ist in der Elbemündung verbreitet (C 3, C 4, C 8, C 9) und tritt in der Ostsee ganz gelegentlich auf (A 34) (s. AHRENS, 1970). Die Arten *A. luteum* und *A. sanguineum* aus der Ostsee sind selten (AHRENS, 1968). *A. tumefaciens* NCMB 8150, *A. radiobacter* NCMB 8149 und *A. stellulatum* 2Ma|E wurden zum Vergleich herangezogen.

Obwohl die einzelnen Stämme von *A. stellulatum* bzw. *A. ferrugineum* bei der taxonomischen Prüfung einheitlich reagierten, ergaben sie sehr unterschiedliche Phagenzahlen. *A. stellulatum* A 1, A 4, A 26, A 29, besonders aber A 18 und A 22, ergaben regelmäßig hohe Phagenzahlen. Phagen für A 6, A 23 und A 36 ließen sich direkt nachweisen, solche für A 5 und A 38 nach Anreicherung. Bei *A. ferrugineum* A 7 und A 10 war die Phagenausbeute ohne Anreicherung gering, ebenso bei Stamm C 4. Keine Phagen ergaben *A. ferrugineum* A 3, A 13, A 43, ferner die Stämme A 14, C 3, C 8, C 9, A 34, A 92, *A. tumefaciens* NCMB 8150, *A. radiobacter* NCMB 8149 und *A. stellulatum* 2Ma|E. Für regelmäßige Phagenzahlbestimmungen wurden *A. stellulatum* A 18 und A 22 als Wirtsstämme ausgewählt.

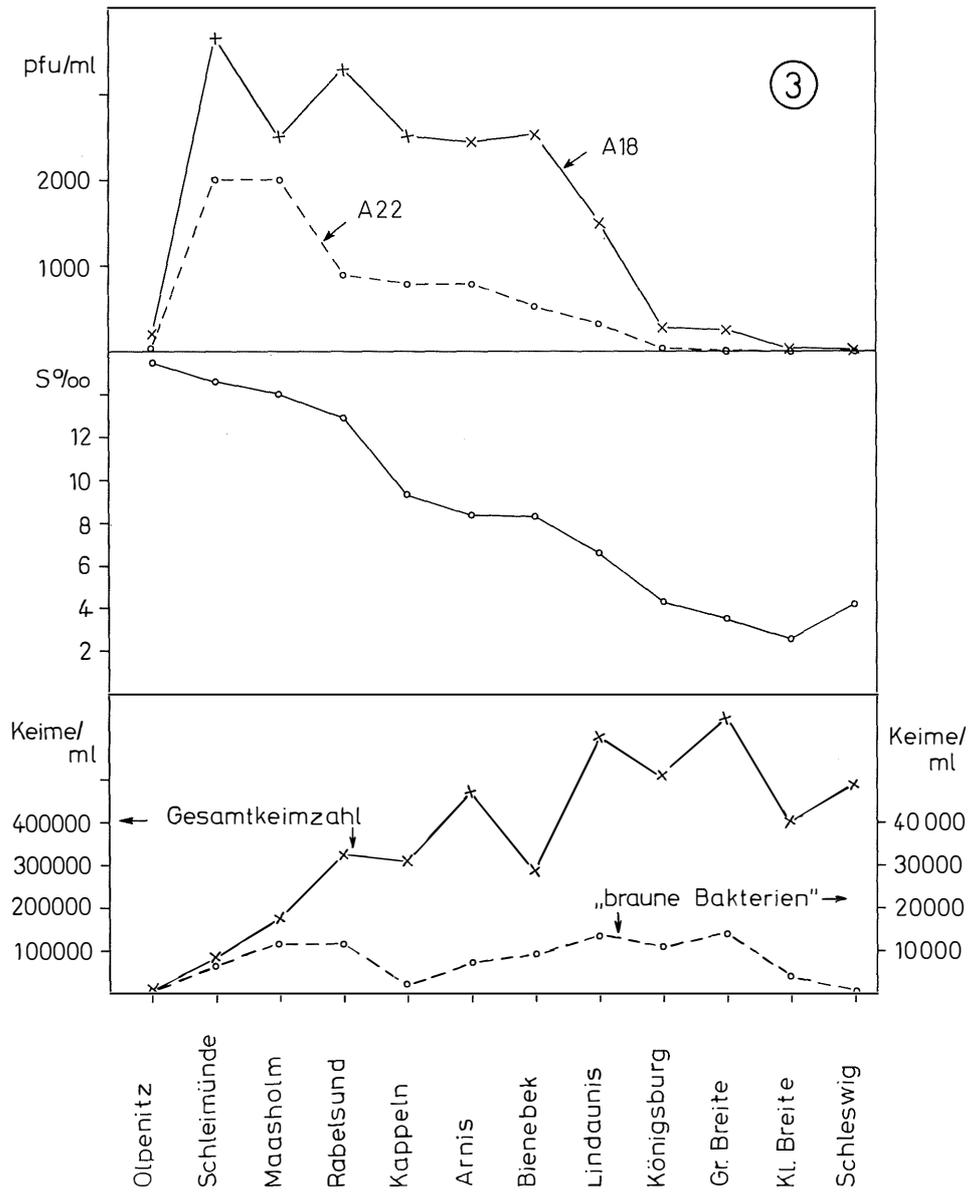
Die Wirtsbakterien wurden in Pepton-Hefeextrakt-Nährlösung (entsprechend 2216 E, ohne Agar) bei 20° C angezchtet, bis die Kulturen eine hinreichende Trübung aufwiesen (2—5 Tage).

Für die Untersuchung der Wirtsspezifitäten wurden neben den genannten Stämmen folgende Isolierungen verwendet:

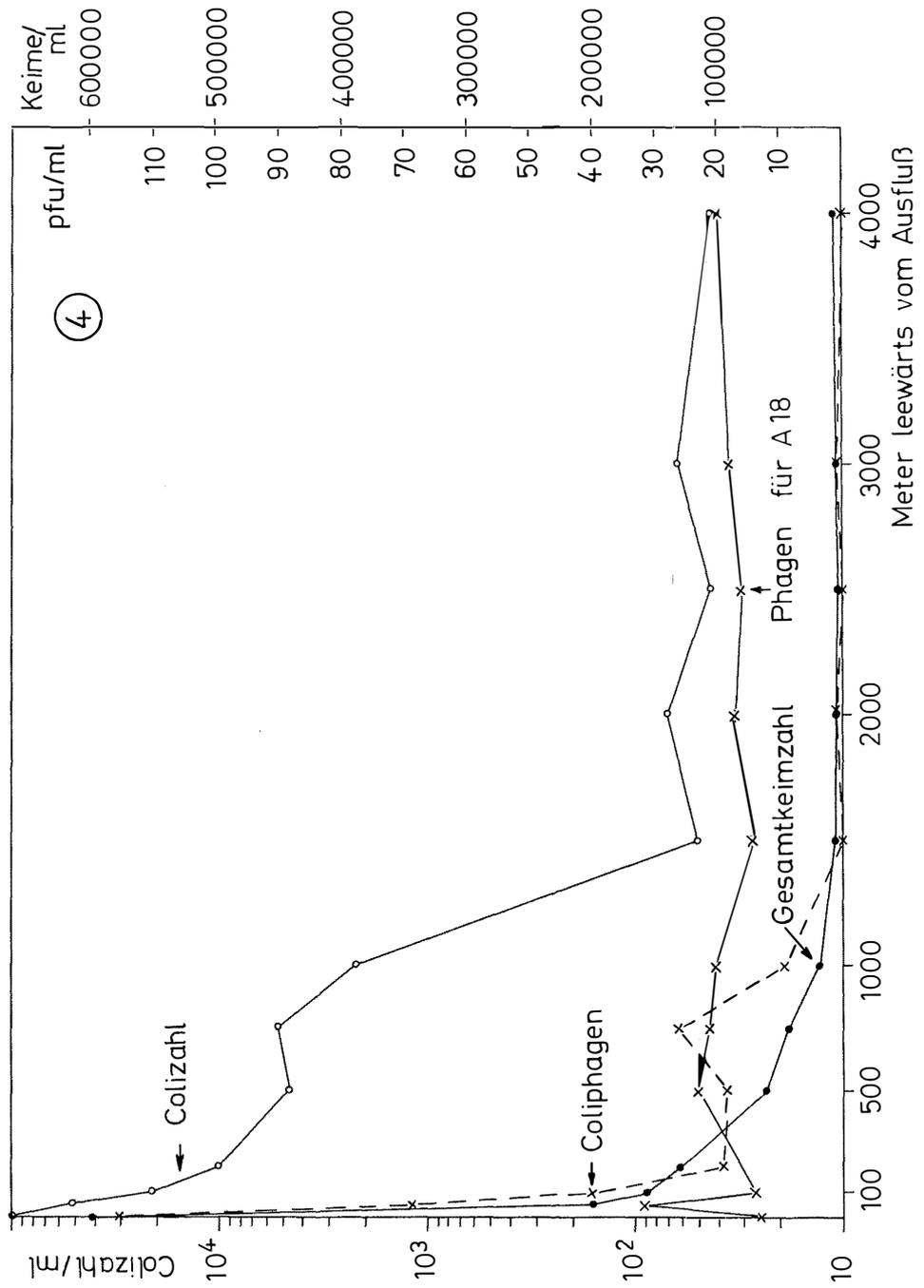
- A. stellulatum* A 24, A 32 (s. AHRENS, 1968)
A. luteum B 14 (s. AHRENS et al., 1968)
A. agile A 82 (s. AHRENS, 1968)
A. aggregatum B 1 (s. AHRENS, 1968)
A. gelatinovororum B 6 (s. AHRENS, 1968)
A. kielense B 9 (s. AHRENS, 1968)
A. spec. B 13 (s. AHRENS, 1968)
A. spec. C 5, C 6, C 10 (s. AHRENS, 1970)
A. radiobacter R 590, R 1001, R 1012, S 192 (ROSLYCKY et al., 1962)
Caulobacter spec. A 42 aus Ostseewasser
E. coli B, Hfr H, K 12 (Genetisches Institut der Univ. Köln)

Phagenanreicherung: Je 250—1000 ml einer Wasserprobe wurden mit 10—50 ml einer jungen Kultur des Wirtsbakteriums versetzt (Pepton-Hefeextrakt-Nährlösung,

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 3)
 Abb. 3: Agrophagen in der Schlei am 3. 6. 70. Schnitt von Olpenitz bis Schleswig.



Tafel 3 (zu R. Ahrens)



Tafel 4 (zu R. Ahrens)

20° C). Die Ansätze standen 2—3 Tage bei 20° C und wurden nach Membranfiltration auf Phagen geprüft.

Phagenisolierung: Von einem Einzel-Plaques wurde Material in eine junge Kultur des Wirtsbakteriums verimpft. Nach einigen Tagen Bebrütung bei 20° C wurden die Bakterien durch Membranfiltration oder Chloroformbehandlung abgetrennt. Verdünnungen des Lysats wurden in der üblichen Weise ausgeplattet. Nach zweimaliger Wiederholung der Manipulation wurde von einem Einzel-Plaques eine „Reinkultur“ angelegt, die nach Abtrennung der Wirtsbakterien im Kühlschrank oder bei 20° C aufbewahrt wurde.

Wirtsspezifitäten: Es wurden Zweischichtagarplatten hergestellt, deren Ober- schicht 0,2—0,5 ml der zu prüfenden Bakterienkultur enthielt. 5—10 Phagenreinkulturen wurden mit sterilen Glasstäben nebeneinander auf der Oberfläche aufgetupft. Eine positive Reaktion zeigte sich durch eine mehr oder weniger klare Lysiszone an. Schwache Reaktionen können nach dieser Methode übersehen werden. — Bei jeder Prüferie wurden alle Lysate zur Kontrolle auf das zugehörige Wirtsbakterium aufgetupft.

Herstellung eines konzentrierten Lysats: Der Phage wurde auf 40 Zwei- schichtagarplatten so ausgeplattet, daß konfluierende Lysis entstand. Sobald eine Kontrollplatte ohne Phagen guten Bakterienwuchs aufwies, wurden die Platten mit je 4 ml folgenden Puffers (pH 7,0) eluiert:

7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 4 g NaCl, 3 g KH_2PO_4 , 1 l A. dest.

Vor Gebrauch 2 ml 10%ige MgSO_4 -Lsg./l zugeben.

Das Eluat wurde durch niedertourige Zentrifugation von Agar- und Bakterienresten befreit. Es besaß einen Titer von 10^8 — 10^9 pfu/ml. Durch 90minütige Zentrifugation bei 35000 g wurden die Phagen sedimentiert (Dr. Moll, Hygiene-Institut Kiel, gestattete die Benutzung der Spinco-Zentrifuge), danach zu 10^{10} — 10^{11} pfu/ml in Phosphatpuffer suspendiert. Das erhaltene Lysat wurde steril filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Adsorption: Als Vorversuch für die Einstufenwachstumskurve war die Adsorptions- zeit zu ermitteln. Für das System 360/A 7 wurde folgendes Medium (Mg-Medium) ver- wendet:

5 g Pepton, 1 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 0,002 m MgSO_4 , 1 l Leitungswasser, pH 7,0.

Der Phagentiter nahm bei Lagerung in diesem Medium rasch ab. Daher wurden zur Adsorption die Bakterien in Mg-Medium suspendiert und die Phagen in einem kleinen Volumen Phosphatpuffer zugegeben. $5 \cdot 10^7$ Phagen 360/ml wurden von $5 \cdot 10^8$ Zellen A 7/ml bei 20° C in 10' zu 98,4% adsorbiert und in 15' zu 99,1% adsorbiert.

Die Adsorption des Phagen 369 an A 18 erfolgte langsam und unvollständig. Wegen der starken Schleimbildung waren auch junge Kulturen von A 18 sehr viskos. Folgende Methode ermöglichte eine ausreichende Adsorption: Logarithmisch wachsende Zellen wurden abzentrifugiert, resuspendiert und mäßig gerührt, bis wieder logarithmisches Wachstum einsetzte. Nach erneuter Zentrifugation und einstündigem Schütteln wurden $8,5 \cdot 10^8$ Phagen/ml von $3 \cdot 10^9$ Zellen/ml bei 20° C in 30' zu 69% adsorbiert. Das Adsorptionsmedium enthielt statt Mg 0,1 mg/ml L-Tryptophan.

Einstufenwachstumskurve: Die Vermehrung der Phagen 360 und 369 wurde nach den Richtlinien von ADAMS (1959) für einfache Infektion studiert. Nach Adsorption

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 4)

Abb. 4: Schnitt durch die Bülker Abwasserfahne vom Ausfluß zur Eckernförder Bucht am 5. 2. 70. Zahl der Agrophagen im Vergleich zur abnehmenden Gesamtkeimzahl, Colizahl und Coliphagenzahl (Coliphagen für E. coli K 12, ebenso: E. coli B, E. coli Hfr H).

von 15' bzw. 30' bei 20° C wurde in Mg-Nährlösung verdünnt. In halbstündigem Abstand wurden mit Mg-Agar (Mg-Nährlösung + 1% Agar) Zweischichtagarplatten angesetzt.

Bakterienzahlen wurden auf Pepton-Hefeextrakt-Agar nach ZOBELL (2216 E) von 24⁰/₀₀ Salzgehalt bestimmt und nach zweiwöchiger Bebrütung bei 20° C ausgezählt.

Prof. Rheinheimer, Institut für Meereskunde, stellte Daten von Gesamtkeimzahl, Temperatur und Salzgehalt zur Verfügung. Fräulein Sadjedi ermittelte die Colizahlen bei Bülk am 5. 2. 70 auf Endo-Nährkarton.

Ergebnisse

Verbreitung der Agrophagen in der Kieler Bucht und angrenzenden Gewässern

Ein Schnitt von der Kieler Förde zur Mitte der Kieler Bucht (Abb. 1) mit 8 Stationen und insgesamt 18 Wasserproben wurde siebenmal im Jahr 1970 abgefahren. In fast allen Proben wurden Phagen für *A. stellulatum* A 18 und A 22 nachgewiesen. Beide Stämme erreichten im Oktober die höchste Phagenzahl. Sie lag für A 18 bei 3700 pfu/ml, für A 22 bei 8100 pfu/ml. Eine Abhängigkeit der Phagenverteilung von der Küstennähe oder eine Tiefenschichtung ließ sich nicht erkennen. Ebenso war keine Beziehung zur Gesamtkeimzahl, zur Zahl „brauner Agrobakterien“ (*A. stellulatum* + *A. ferrugineum*) oder zum Salzgehalt festzustellen. Das Verhältnis der beiden Phagenwerte zueinander unterlag starken Schwankungen, wobei jeder der Werte ein Vielfaches des anderen ausmachen konnte. Abb. 2 stellt die Verhältnisse am 17. September 1970 dar.

Die Schlei, eine enge Förde der Kieler Bucht, weist von außen nach innen eine zunehmende Eutrophierung und abnehmende Salzgehalte auf. Die Phagenzahlen steigen von der Station Olpenitz (Kieler Bucht) bis Schleimünde (Abb. 1, 3) etwa auf das Zehnfache und fallen weiter innen von 10⁰/₀₀ Salzgehalt an beständig ab. *A. stellulatum* und *A. ferrugineum* weisen ebenfalls bei Olpenitz und in der Innenschlei sehr niedrige Werte auf, während die Gesamtkeimzahl von außen nach innen zunimmt (Abb. 3).

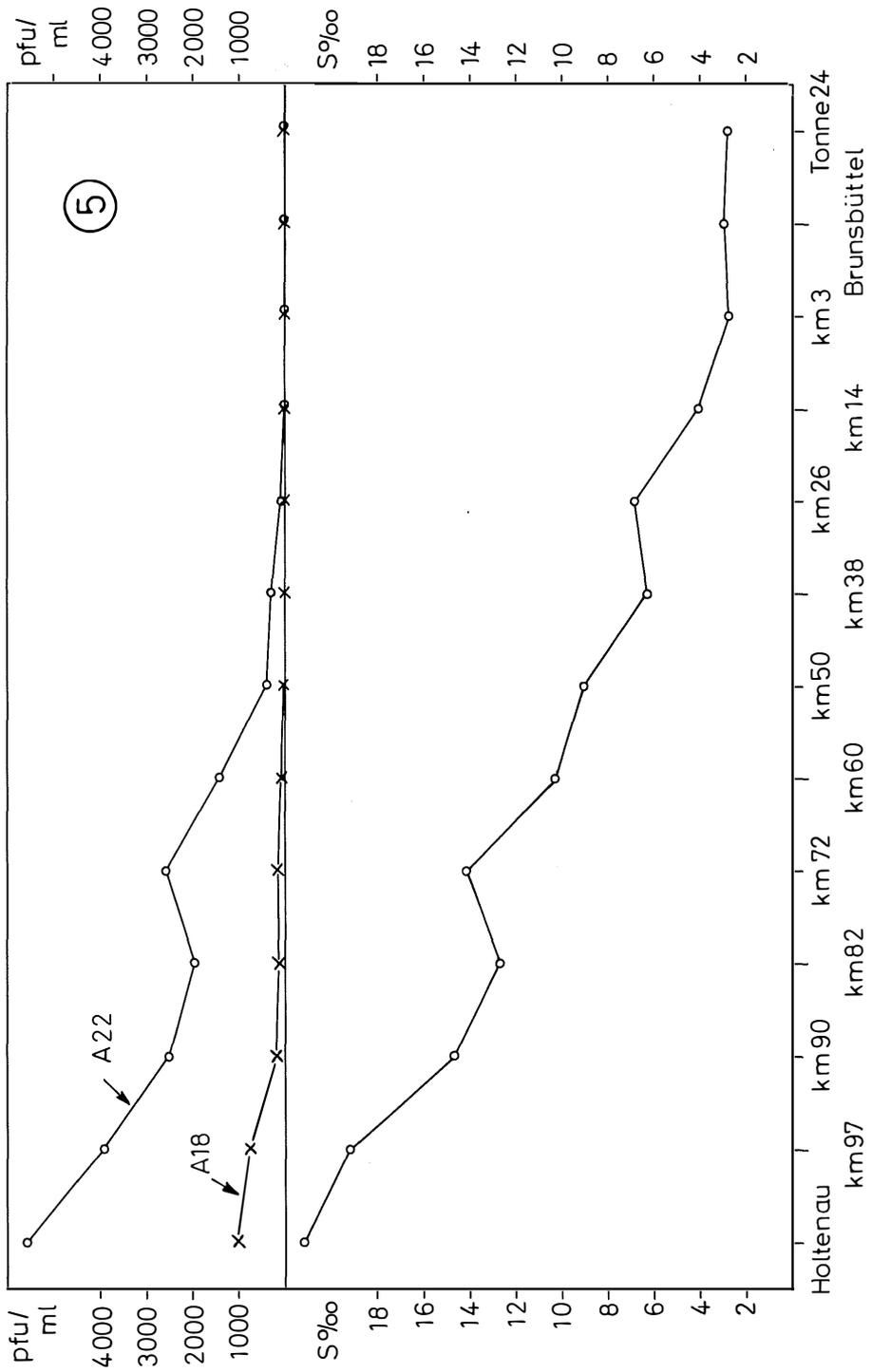
Die Zahl der Agrophagen für A 18 ist unabhängig von fäkalen Abwässern, wie ein Schnitt vom Kieler Ausfluß leewärts zeigt. Während die Coliphagen in den ersten 1500 m fast völlig verschwinden und damit deutlich aus dem Abwasser stammen, bleibt die Agrophagenzahl bis 4 km Entfernung nahezu konstant. Die Gesamtkeimzahl sinkt in 1500 m auf ein Zehntel ab, und die Colizahl geht um mehr als 3 Zehnerpotenzen zurück (Abb. 4).

Im Bereich des Nord-Ostsee-Kanals ist die Verbreitung der Agrophagen deutlich salzabhängig. Der Salzgehalt fällt von 21,2⁰/₀₀ an der Holtenauer Schleuse (Ostsee) auf 2,83⁰/₀₀ am Eingang in die Nordsee ab. Die Phagenzahl für A 22 geht währenddessen von 5600 pfu/ml auf 1 pfu/ml zurück (Abb. 5). Eine Probenserie von der Rückfahrt ergab ein entsprechendes Bild.

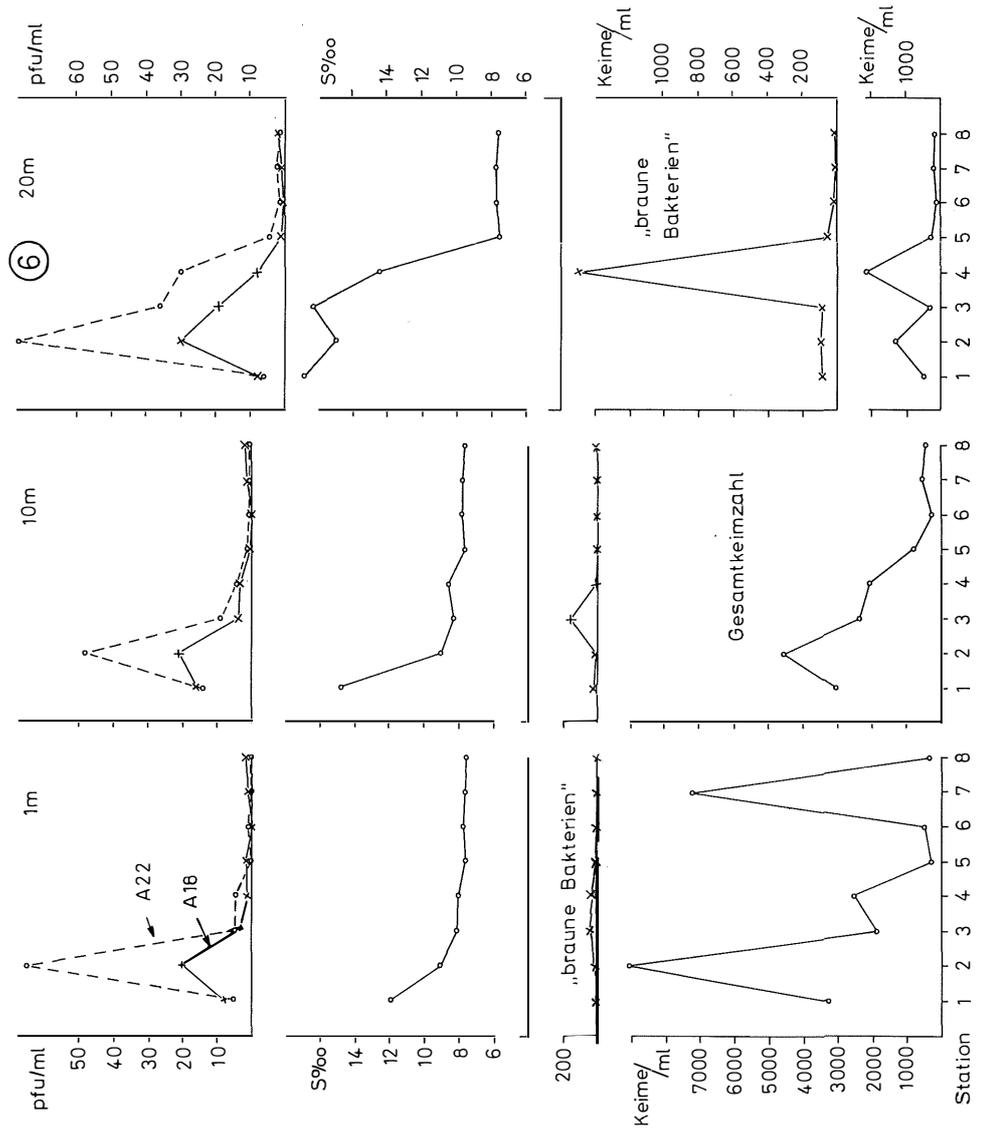
Die Salzabhängigkeit der Agrophagen ist auch bei den abnehmenden Salzgehalten östlich der Kieler Bucht festzustellen. Abb. 6 zeigt einen Schnitt von der Kieler Bucht nach Bornholm mit 8 Stationen. In den Tiefen 1 m, 10 m und 20 m geht die Zahl der Agrophagen unter 8⁰/₀₀ auf 0–4 pfu/ml zurück. 8⁰/₀₀ Salzgehalt waren auch als untere Grenze für die Verbreitung von *A. stellulatum* und *A. ferrugineum* in der freien

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 5)

Abb. 5: Salzabhängigkeit der Agrophagen im Nord-Ostsee-Kanal. Schnitt von der Ostsee (Holtenau) zur Nordsee (Tonne 24) am 29. 10. 69.



Tafel 5 (zu R. Ahrens)



Tafel 6 (zu R. Ahrens)

Ostsee festgestellt worden (AHRENS, 1969). Im Juli 1970 weisen nur die 20 m-Proben eine nennenswerte Zahl „brauner Agrobakterien“ auf, so daß ihr Rückgang an diesem Schnitt nicht zu verfolgen ist.

Noch deutlicher wird die Salzabhängigkeit der Agrophagen bei den extrem niedrigen Salzgehalten zwischen Kieler Bucht und Bornholm im August 1970 (Abb. 7). Während die Stationen 1—5 relativ geringe Phagenzahlen aufweisen und kein klares Bild ergeben, nimmt bei den Stationen 6—9 die Phagenzahl in 40 m Tiefe beträchtlich zu. Der Wasserkörper am Grund hat mit S 12‰—14‰ seine Herkunft in der Kieler Bucht. Dagegen enthalten die 40 m-Proben der Stationen 10 und 11 mit ca. 8‰ Salzgehalt maximal 1 pfu/ml, so daß die hohen Werte der Stationen 6—9 kaum tiefenbedingt sind.

Agrophagen für *A 18* und *A 22* können sich in Sand und Schlamm anreichern, wobei die Werte 10—30mal höher als im betreffenden Wasserkörper liegen können.

Für die Station Reventlou in der Kieler Förde wurde die jahreszeitliche Häufigkeit der Agrophagen und Bakterien untersucht. Im Jahr 1970 ergaben sich für die Monate Januar bis Juni relativ geringe Werte mit maximal 500 pfu/ml und 1900 „braunen Agrobakterien“/ml. Die Werte der zweiten Jahreshälfte liegen durchweg höher und schwanken beträchtlich. Innerhalb von 2 Wochen können sich die Phagenzahlen um 10000 bis 30000 verändern. Die Schwankungen der Bakterienzahlen verlaufen gleichsinnig dazu, während die Salzgehaltsänderungen eine gegenläufige Tendenz aufweisen (Abb. 8). Es wird deutlich, daß die Populationen von Bakterien und Phagen weniger von der Jahreszeit bestimmt werden als von kurzfristig wechselnden Umweltfaktoren, wie etwa Wasserbewegung und Salzgehalt. Innerhalb der Bakterienflora und entsprechend bei den Phagen dominiert bald der eine Stamm, bald der andere (s. Abb. 8, Phagen für *A 18*, *A 22*). Bei der Station Reventlou traten die überhaupt höchsten Phagenzahlen auf mit 25500 pfu/ml für *A 18* am 31. 8. 70 und 36500 pfu/ml für *A 22* am 24. 9. 70. Zählt man noch die Phagen des anderen Teststammes hinzu, so ergeben sich am 31. 8. 39400 pfu/ml und am 24. 9. 39900 pfu/ml für *A 18* und *A 22*. (Die Phagen beider Wirtsstämme sind nicht identisch, s. u. Wirtsspektren.) Es dürfte sich um die größten Phagendichten handeln, die in einem Gewässer festgestellt wurden.

Wirtsspektren der Agrophagen

Bei der taxonomischen Untersuchung von *A. stellulatum* und *A. ferrugineum* hatten die Angehörigen einer Art gute Übereinstimmung gezeigt, während zwischen den Arten Abweichungen auftraten (AHRENS, 1968). Es war nun zu prüfen, ob die einzelnen Stämme einer Art gemeinsame Phagen besitzen und ob Kreuzreaktionen mit anderen Arten bestehen.

23 Phagen für *A. stellulatum*, 7 Phagen für *A. ferrugineum* und ein Phage für *Agrobacterium* Stamm *C 4* wurden isoliert, ferner 4 Phagen für verschiedene Stämme von *E. coli*. ROSLYCKY stellte 4 Phagen für *A. radiobacter* zur Verfügung. Die zugehörigen Wirtsstämme sind aus Tab. 1 zu entnehmen. Die Phagen wurden mit 49 Stämmen von *Agrobacterium*, 3 Stämmen von *E. coli* und einem *Caulobacter*-Stamm zur Reaktion gebracht (s. Tab. 1, 2).

Phagen von *A. stellulatum* und *A. ferrugineum* befielen nur Stämme der eigenen Art. Die Wirkung war selektiv. Bei *A. stellulatum* reagierten die Phagen von Stamm *A 6* und *A 38* nur mit dem ursprünglichen Wirtsstamm, die von *A 1*, *A 4*, *A 5*, *A 18*, *A 22*

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 6)

Abb. 6: Agrophagen in Abhängigkeit vom Salzgehalt. Schnitt von der Kieler Bucht (1) nach Bornholm (8) für die Tiefen 1 m, 10 m und 20 m im Juli 1970.

maximal mit 4 weiteren Angehörigen der Art. Die Phagen von *A. ferrugineum* A 7 lysierten keinen anderen Stamm, der von *A. ferrugineum* A 10 befiel auch A 3 und A 13.

Tabelle 1
Reaktion verschiedener Phagen mit Stämmen von *Agrobacterium stellulatum* und *A. ferrugineum*

Phage	ursprünglicher Wirtstamm	Bakterienstämme																					
		<i>Agrobacterium stellulatum</i>														<i>A. ferrugineum</i>							
		A 1	A 18	A 29	A 26	A 32	A 36	A 4	A 22	A 5	A 69	A 23	A 6	A 17	A 21	A 24	A 38	A 7	A 3	A 10	A 13	A 43	A 14
379	A 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
380	A 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
381	A 1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
382	A 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
383	A 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
384	A 4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
385	A 4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
386	A 4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
366	A 5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
367	A 5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
375	A 5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
376	A 5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
377	A 5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
378	A 5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
395	A 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
396	A 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
368	A 18	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
369	A 18	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
371	A 18	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
372	A 18	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
374	A 18	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
388	A 22	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
324	A 38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
360	A 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
361	A 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
362	A 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
363	A 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
364	A 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
365	A 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
387	A 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
397	G 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PR 590	R 590	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PR 1001	R 1001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PR 1002	R 1002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS 192	S 192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
398	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
399	<i>E. coli</i> B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400	<i>E. coli</i> HjrH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
304	<i>E. coli</i> K 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 2
 Reaktion der Phagenstämme mit verschiedenen *Agrobacterium*-Arten, *Caulobacter* und *Escherichia coli*

Phagen	Bakterienstämme	<i>Agrobacterium spec. A 34, C 3, C 5, C 6, C 8, C 9, C 10</i>	<i>Agrobacterium spec. C 4</i>	<i>A. lateum A 61, B 14</i>	<i>A. sanguineum A 87, A 89, A 91, A 92</i>	<i>A. agile A 82</i>	<i>A. aggregatum B 1</i>	<i>A. gelatinosorum B 6</i>	<i>A. kieltense B 9</i>	<i>A. spec. B 13</i>	<i>A. stellulatum 2 Ma/E</i>	<i>A. tumefaciens NCMB 8150</i>	<i>A. radiobacter NCMB 8149</i>	<i>A. radiobacter R 590, R 1001, R 1012, S 192</i>	<i>Caulobacter A 42</i>	<i>E. coli B</i>	<i>E. coli Hfr H, K 12</i>
379, 380, 381, 382, 383		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
385, 386		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
366, 367, 377		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
395, 396		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
368, 369, 371		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
388		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
324		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
360, 361, 362, 363, 364, 365		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
387		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
397		—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PR 590		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PR 1001, PR 1012, PS 192		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—
398, 399, 400		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
304		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+

Phage 397 reagierte nur mit seinem Wirtstamm *Agrobacterium C 4*. Die Phagen von *A. radiobacter* und *E. coli* reagierten ebenfalls nur innerhalb der eigenen Art.

Es ergibt sich, daß die Gruppe der „braunen Agrobakterien“ *A. stellulatum* und *A. ferrugineum* hinsichtlich der Phagenspezifitäten heterogen ist. Daher lassen Phagenzahlen einzelner Stämme keine Beziehung zur Bakterienzahl erkennen. Phagen von *A. stellulatum* und *A. ferrugineum* reagieren, soweit geprüft, nicht mit anderen *Agrobacterium*-Arten, *E. coli* oder *Caulobacter*.

Form der Plaques

Einige Phagenisolierungen bilden auf einer Platte Plaques von sehr unterschiedlicher Größe aus, was auf eine langsame Adsorption schließen läßt (ADAMS, 1959). Hierzu zählen die Phagen von *A. stellulatum A 1* (außer Phage 381), *A 4*, *A 18*, *A 38* und *Agrobacterium* Stamm *C 4*. Die Plaques besitzen einen Durchmesser von 0,5—6 mm, wobei kleine Plaques überwiegend klar und scharf begrenzt sind, größere meist trüb und

unscharf. Die Plaques der Phagen von *A. stellulatum* *A 5*, *A 6* und *A 22* sind überwiegend unscharf und maximal 6 mm groß. Phagen von *A. ferrugineum* *A 7* und *A 10* sowie Phage 381 von *A. stellulatum* *A 1* bilden zunächst kleine scharf begrenzte Plaques aus. Diese sind später von mehreren konzentrischen Trübungszonen umgeben oder im ganzen klar und erreichen nach 3 Wochen Durchmesser bis zu 25 mm (*A 7* und *A 10* sind unbeweglich). Plaques solcher Ausmaße sind sonst für *Bdellovibrio* charakteristisch. Eine Verwechslung ist aber ausgeschlossen, da alle geprüften Phagen chloroform-resistent sind.

Einstufenwachstumskurve

Für einen Phagen von *A. stellulatum* *A 18* und einen Phagen von *A. ferrugineum* *A 7* wurde die Einstufenwachstumskurve aufgenommen (Abb. 9). Bei 369/*A 18* betrug die Latenzzeit ca. $3\frac{1}{2}$ Stunden, die Wurfgröße 35 Phagen/Zelle. Für 360/*A 7* ergaben sich ca. 2 Stunden Latenzzeit und eine Wurfgröße von 120 Phagen/Zelle.

Überleben in Brackwasser

Um die Lebensdauer von Phagen in Brackwasser zu prüfen, wurde 1 ml konzentrierte Phagensuspension in 1 l unbehandeltes Brackwasser gebracht und bei 20° C gerührt. Bis zum völligen Absterben der Phagen wurden regelmäßig Phagenzahlen bestimmt. Phage 369 für *A. stellulatum* *A 18* wurde in Brackwasser von S 16,3‰ suspendiert, das bei der Entnahme 3400 pfu/ml für *A 18* und 36500 pfu/ml für *A 22* enthielt. Von anfänglich 10^5 zugesetzten Phagen/ml war nach 4 Wochen keiner mehr im Milliliter nachzuweisen. — Phage 360 für *A. ferrugineum* *A 7* ging in Brackwasser von S 15,66‰ innerhalb 14 Tagen von $2 \cdot 10^6$ auf weniger als 1 pfu/ml zurück. Die Wasserprobe enthielt ursprünglich weniger als 1 pfu/ml für *A 7*, 17150 pfu/ml für *A 18* und 5350 pfu/ml für *A 22*.

Diskussion

Die Verbreitung der Agrophagen erstreckt sich auf den von ihren Wirtsbakterien besiedelten Raum. Phagen für *A. stellulatum* *A 18* und *A 22* zeigen die gleiche Salzgehaltsabhängigkeit wie die „braunen Bakterien“ *A. stellulatum* und *A. ferrugineum*. (AHRENS, 1969). Sie sind in der freien Ostsee unterhalb S 8‰ kaum noch anzutreffen. In der eutrophen Schlei finden sie sich wie ihre Wirtsbakterien bei noch geringeren Salzgehalten, jedoch nehmen sie unterhalb S 10‰ deutlich ab. Die Phagenverteilung läßt erkennen, daß die Population der „braunen Agrobakterien“ in allen Bereichen der Kieler Bucht Stämme vom Typ *A 18* und *A 22* enthält.

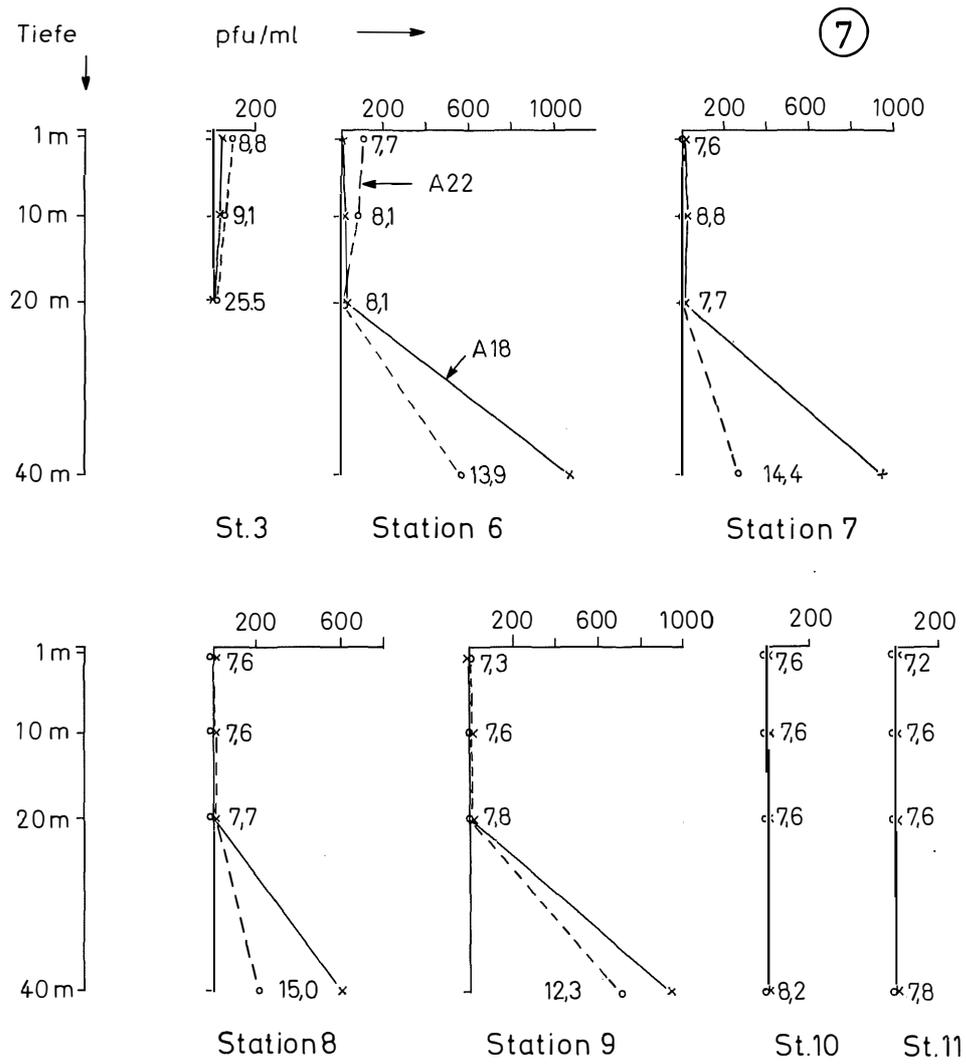
Die Relation von Bakterien- und Phagenzahlen hängt vermutlich von der Wachstumsintensität der Bakterien ab. Der gleichsinnige Verlauf von Bakterien- und Phagenzunahme in der Kieler Förde (Abb. 8) deutet darauf hin, daß sich kurze Synthesephasen mit ebenso kurzen Absterbephasen abwechseln. Phagen werden zu Zeiten intensiven Bakterienwachstums gebildet. Stagnierende Entwicklung schützt die Bakterien

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 7)

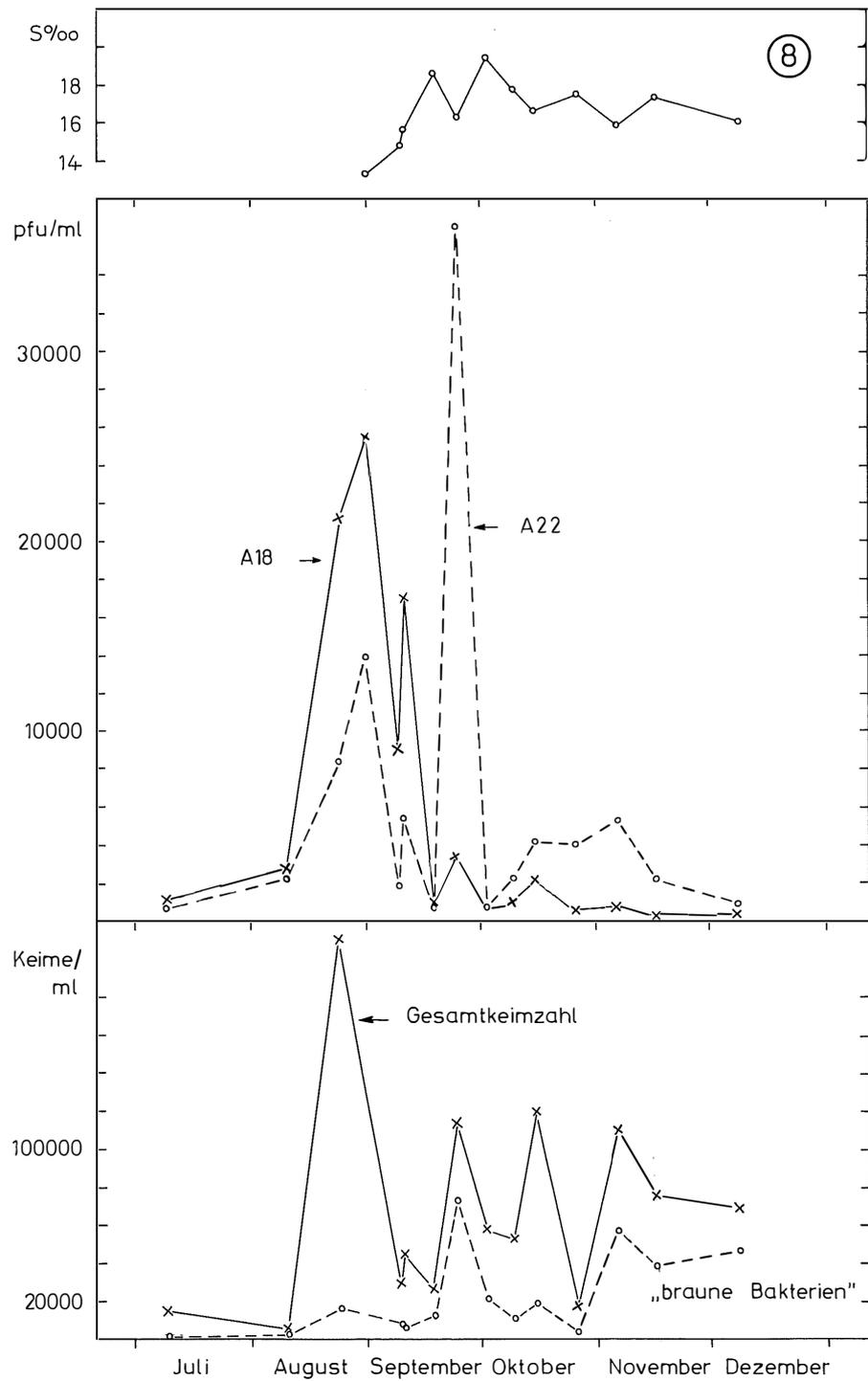
Abb. 7: Tiefenverteilung der Agrophagen östlich der Kieler Bucht im August 1970. Die Zahlen neben den Phagenkurven geben die Salzgehalte (‰) der betreffenden Tiefe an.

Stationen:

3 Mecklenburger Bucht	9 10 sm westlich Bornholm
6 nördlich Hiddensee 54° 55,3' N, 13° 9,2' E	10 10 sm östlich Bornholm
7 nördlich Kap Arcona 55° N, 13° 26' E	11 30 sm östlich Bornholm
8 zwischen Rügen und Bornholm 55° N, 14° E	



Tafel 7 (zu R. Ahrens)



Tafel 8 (zu R. Ahrens)

vor Befall. Die rasche Abnahme der Phagenzahl entspricht dem Absterben in Brackwasser. Es ist unklar, ob der Rückgang der Bakterienzahlen nur durch hydrographische Faktoren bedingt wird oder ob hohe Phagenzahlen zur raschen Abnahme der Bakterien beitragen. Leider läßt sich innerhalb der „braunen Agrobakterien“ kein Typ getrennt von den anderen erfassen.

Die Heterogenität der Agrophagen weist darauf hin, daß die Population der Agrobakterien aus Stämmen mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften besteht. So ist es zu erklären, daß trotz hoher Phagenzahlen die Agrobakterien nie völlig dezimiert werden. Würden alle Zellen gleichzeitig befallen, so könnte eine etwa 35—120mal größere Phagenpopulation resultieren. Sämtliche Wirtszellen würden absterben. Tatsächlich liegt die Phagenzahl meist erheblich unter der Bakterienzahl. Es stellt sich ein Wechselspiel zwischen den Agrobakterien und ihren Phagen ein, wobei folgende Faktoren den Bestand der Bakterien begünstigen: Die seltenen Bakterientypen treffen selten mit spezifischen Phagen zusammen. Bei häufigen Typen kann die Adsorptionsrate gering sein. Die Zeiten intensiven Bakterienwachstums sind meist zu kurz, als daß der Phagentiter die Bakterienzahl erreicht. Freie Phagen sterben in 2—4 Wochen ab. Einzelne Stämme der *Agrobacterium*-Population lösen sich wahrscheinlich ab und erschweren die Ausbildung zu großer Phagendichten.

Literaturverzeichnis

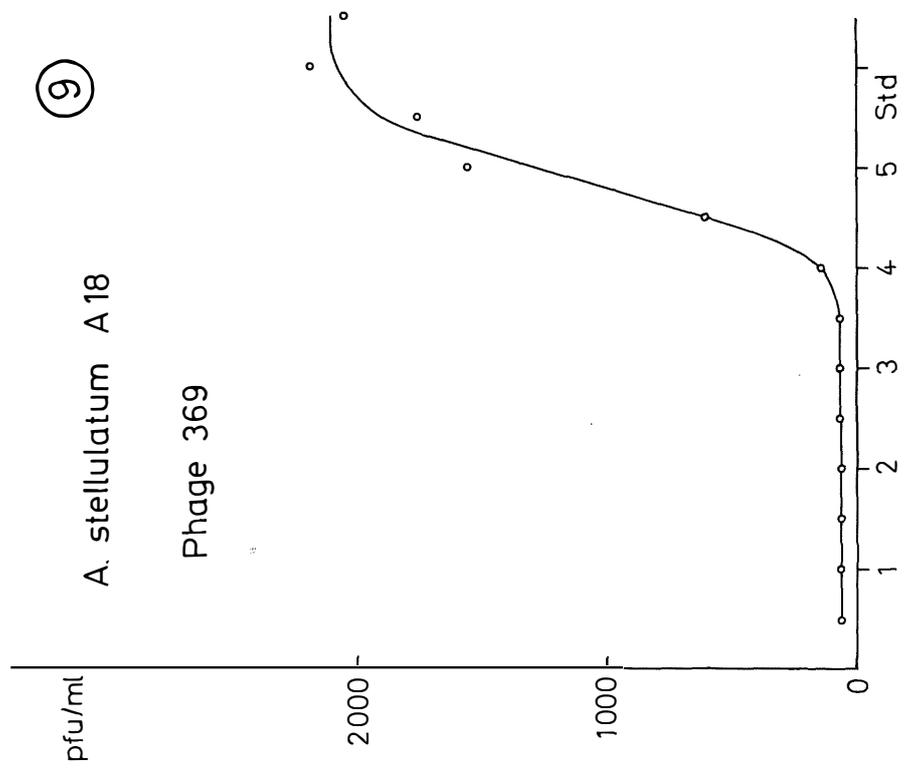
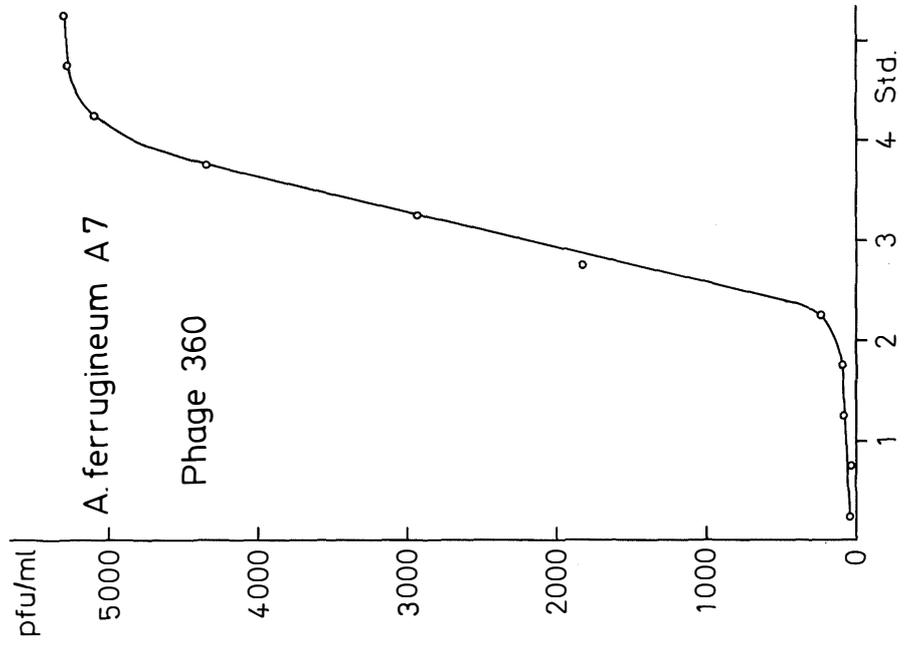
- ADAMS, M. H. (1959): Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York, USA.
- AHRENS, R. (1968): Taxonomische Untersuchungen an sternbildenden *Agrobacterium*-Arten aus der westlichen Ostsee. Kieler Meeresforsch. **24**, 147—173.
- AHRENS, R. (1969): Ökologische Untersuchungen an sternbildenden *Agrobacterium*-Arten aus der Ostsee. Kieler Meeresforsch. **25**, 190—204.
- AHRENS, R. (1970): Weitere sternbildende Bakterien aus Brackwasser. Kieler Meeresforsch. **26**, 74—78.
- AHRENS, R., G. MOLL und G. RHEINHEIMER (1968): Die Rolle der Fimbrien bei der eigenartigen Sternbildung von *Agrobacterium luteum*. Arch. Mikrobiol. **63**, 321—330.
- CARLUCCI, A. F. und D. PRAMER (1960): An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in sea water, IV. Bacteriophages. Appl. Microbiol. **8**, 254—256.
- FREDERICQ, P. (1950): Technique simple et rapide de culture et de conservation des entérobactériophages. C. R. Soc. Biol., Paris, **144**, 295—297.
- KRISS, A. E. und E. A. RUKINA (1947): Bacteriophagen im Meer (in Russisch). Doklady Akademii Nauk SSSR **57**, 833—836.
- ROSLYCKY, E. B., O. N. ALLEN und E. MCCOY (1962): Phages for *Agrobacterium radiobacter* with reference to host range. Can. J. Microbiol. **8**, 71—78.

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 8)

Abb. 8: Oberflächenproben der Station Reventlou (Kieler Förde). Salzgehalte, Phagenzahlen und Bakterienzahlen in der 2. Jahreshälfte 1970.

- SIEBERT, G. und W. SCHWARTZ (1956): Untersuchungen über das Vorkommen von Mikroorganismen in entstehenden Sedimenten. Arch. Hydrobiol. **52**, 321—366.
- SPENCER, R. (1955): A marine bacteriophage. Nature **175**, 160—161.
- SPENCER, R. (1960): Indigenous marine bacteriophages. J. Bact. **79**, 614.
- SPENCER, R. (1963): Bacterial viruses in the sea. In: C. H. OPPENHEIMER (ed.), Symposium on marine microbiology. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois. S. 350—365.
- ZOBELL, C. E. (1946): Marine Microbiology. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass. 240 Seiten.

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 9)
Abb. 9: Einstufenwachstumskurve in Mg-Medium, 20 °C.



Tafel 9 (zu R. Ahrens)