

**Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung
der Viren von Bakterien und Archaeen als Spender- und Empfängerorganismen
und von vermehrten Phagenpartikeln in Präparationen von Phagen
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Die Viren der Prokaryoten sind die Bakteriophagen der Bakterien (kurz: Phagen) und die Archaeenviren der Archaeen. Sie kommen ubiquitär vor und sind mit einer geschätzten Anzahl von 10^{31} Partikeln die größte und diverseste Gruppe von „Organismen“ [1–4]. Sie spielen wichtige Rollen für das Gleichgewicht von prokaryotischen Populationen und Gemeinschaften in der Umwelt, bei der Entstehung und Erhaltung mikrobieller Diversität sowie der Aufrechterhaltung biogeochemischer Kreisläufe.

1 Phagen

1.1 Struktur der Phagen

Bakteriophagen bestehen aus einer Proteinhülle und einer Nukleinsäure, die als doppel (ds)- oder einzelsträngige (ss)-DNA oder RNA vorliegen kann. Ihre Konformation kann linear oder zirkulär sein. Die Genomgrößen bisher kultivierter Phagen variieren von ca. 5 kb (z. B. Phage PhiX174, 5386 Basen ssDNA) bis zu 500 kbp (z. B. Phage G von *Bacillus megaterium*, 497 kbp dsDNA), wobei durch Metagenomanalysen auch Genomgrößen von bis zu 700 kbp dsDNA ermittelt wurden [5]. Die kleinen Phagen besitzen filamentöse oder polyedrische Phagenhüllen. Die Morphologie der größeren Phagen ist komplexer [6]. Der weitaus größte Teil dieser Phagen gehört zur Klasse der *Caudoviricetes* innerhalb des Reichs der *Duplodnaviria*. Bei ihnen handelt es sich um geschwänzte Phagen, deren Hülle aus einem ikosaedrischen Kopf und einem Schwanz (mit Adsorptionssystem) unterschiedlicher Morphologie und Komplexität besteht.

1.2 Vermehrungsweise von Phagen der Klasse *Caudoviricetes*

In diesem Abschnitt wird vorrangig die Vermehrung von Phagen der Klasse *Caudoviricetes* beschrieben, da sie zahlenmäßig dominieren und ihre Vermehrungsweise für die Risikobewertung der Phagen relevant ist. Die Vermehrung eines Phagen verläuft in mehreren Schritten von der Infektion bis zur Freisetzung der Phagennachkommen [7]. Zunächst bindet der

Phage an einen spezifischen Rezeptor der Wirtszelle (Adsorption) und die Nukleinsäure gelangt z. B. durch Injektion oder Hineinziehen in die Zelle. Anschließend erfolgt die Expression von Phagengenomen und die Replikation des Phagengenoms, meist über multimere Intermediate (Concatemere). Parallel dazu werden die Hüllproteine gebildet, aus denen die Köpfe und Schwänze zusammengesetzt werden. Bei der Verpackung der Nukleinsäure in die Köpfe werden die Concatemere zu Monomeren prozessiert. Dies geschieht nach dem *headful*-Mechanismus (s. Abschnitt 1.3.1) oder durch sequenzspezifisches Schneiden der Concatemere. Letzteres führt zu einheitlichen Genomen mit entweder cohäsiven Einzelstrangenden (z. B. Phage λ) oder doppelsträngigen Redundanzen an den Enden (z. B. Phage T7). Die neu gebildeten Phagenpartikel werden meist durch Lyse der Wirtszelle mit Hilfe Phagen-spezifischer Proteine freigesetzt. Die mittlere Anzahl der Phagennachkommen je infizierter Zelle (Wurfgröße oder *burst size*) und die Zeitspanne von der Adsorption bis zur Lyse (Latenzzeit) sind charakteristisch für jeden Phagen.

Phagen, die sich ausschließlich durch Bildung infektiöser Nachkommen vermehren (lytischer Zyklus), heißen virulente Phagen. Ein so genannter temperenter Phage kann alternativ zum lytischen Zyklus in seltenen Fällen einen anderen Vermehrungszyklus durchlaufen. Dabei wird in der infizierten Zelle die DNA des Phagen an einer spezifischen Stelle (*attachment site*) in das Wirtsgenom integriert oder sie verbleibt als Plasmid in der Wirtszelle. In beiden Fällen wird die DNA bei der Vermehrung der Wirtszelle passiv mitrepliziert und dann als Prophage bezeichnet. Ein Prophagen-tragender Wirt wird „lysogen“ genannt, da der Prophage unter bestimmten Stressbedingungen für die Wirtszelle (z. B. DNA-Schäden durch UV-Strahlen) induziert werden und wieder in den lytischen Zyklus übergehen kann.

1.3 Gentransfer durch Transduktion

Phagen tragen in ihrem natürlichen Habitat erheblich zum horizontalen Gentransfer durch Transduktion bei. Bei der Transduktion werden Abschnitte des Genoms des Wirtsbakteriums in Phagenpartikel verpackt und bei Infektion in den nächsten Wirt transportiert. Man unterscheidet hierbei zwischen zwei Mechanismen der Transduktion [8].

1.3.1 Generelle Transduktion

Bei der generellen Transduktion wird in einige Phagenköpfe ausschließlich DNA des Wirtsbakteriums von der Länge des Phagengenoms verpackt. Die generelle Transduktion ist beschränkt auf Phagen, die mit Hilfe einer prozessiven Terminase vom *pac*-Typ ihre Concatemer-Replikationsintermediate an einer spezifischen *pac site* erkennen, binden und schneiden und dann nach dem *headful*-Mechanismus in die Köpfe verpacken [9, 10]. Wenn der Kopf mit DNA gefüllt ist, wobei die Länge der verpackten DNA die Länge des Phagengenoms um einige Prozent übersteigen kann, schneidet die Terminase vom *pac*-Typ erneut die DNA, ohne auf eine Erkennungssequenz angewiesen zu sein [10]. Nachdem die DNA verpackt wurde, wird der Schwanz an den Phagenkopf angefügt, was zur Bildung eines reifen Phagenpartikels führt. Nach der Befüllung des Kopfes bleibt die Terminase des *pac*-Typs an dem Concatemer gebunden und verpackt das nächste Genom [10]. Das Ergebnis sind Phagen mit Genomen, die redundant und zyklisch permutiert sind, d. h. deren Genome an unterschiedlichen Positionen der genetischen Karte beginnen. Die Terminasen können auch *pac*-ähnliche Sequenzen

im bakteriellen Chromosom erkennen und somit zufällige, chromosomale Abschnitte *upstream* solcher Pseudo-*pac sites* verpacken. Deshalb ist davon auszugehen, dass nur Phagen mit Terminasen des *pac*-Typs zur generellen Transduktion in der Lage sind. Mittels bioinformatischer *tools* lässt sich anhand von Sequenzierungsdaten des Phagen feststellen, ob die Verpackung des Phagengenoms mutmaßlich nach dem *pac*-Typ erfolgt und der Phage damit zur generellen Transduktion fähig ist. [11]. Auch Plasmide lassen sich durch Transduktion übertragen.

Ein Lysat generell transduzierender Phagen enthält nur eine geringe Menge an transduzierenden Partikeln mit Teilen des Genoms des vorherigen Wirtsbakteriums, z. B. 0,3 % bis 0,5 % für den Phagen P1 [12] und 0,7 % für den Phagen P22 [13]. Die transduzierenden Partikel können wie infektiöse Phagen an die Wirtszelle adsorbieren und die DNA injizieren. Diese kann anschließend durch homologe Rekombination ins Wirtsgenom integriert werden oder wieder ein Plasmid bilden. Die Frequenz, mit der bakterielle Marker transduziert werden, liegt z. B. für den Phagen P1 zwischen 10^{-4} bis 10^{-5} pro infektiösem Phagenpartikel [12]. Die Fähigkeit zur generellen Transduktion ist nur bei wenigen Phagen untersucht, sie scheint aber weit verbreitet zu sein. So waren 99 % der Phagen, die aus lysogenen *Salmonella*-Isolaten induziert wurden, generell transduzierend [14, 15] und 69 bzw. 24 % aus *Escherichia coli*-Isolaten [14, 15].

Erst kürzlich wurde eine Unterart der generellen Transduktion, die laterale Transduktion, für einige temperente *Staphylococcus*-Phagen beschrieben [16]. Diese Phagen replizieren ihre DNA bereits im integrierten Prophagenzustand, wodurch multiple integrierte Phagengenome entstehen [17]. Einige Prophagen werden ausgeschnitten und verpackt. Bei anderen noch integrierten Prophagen bindet die prozessive Terminase vom *pac*-Typ die phagenspezifischen *pac sites* und beginnt mit der Verpackung noch ausgehend von der integrierten Form [17]. Phagenköpfe werden dann nach dem *headful*-Mechanismus vom *pac*-Typ wie zuvor beschrieben zunächst mit der Phagen-DNA und, mit fortschreitender Replikationsgabel und bedingt durch die prozessive Terminase, mit chromosomaler Wirts-DNA gefüllt. Die laterale Transduktion ist ca. 1000-fach effektiver (Transduktanten pro infektiösem Phagenpartikel) als die generelle Transduktion [16, 17].

1.3.2 Spezielle Transduktion

Der zweite Mechanismus der Transduktion, die spezielle Transduktion, ist auf temperente Phagen beschränkt. Bei Induktion des Prophagen kann in einigen Fällen die Exzision des Prophagen aus dem Genom inkorrekt verlaufen und so Bereiche des Wirtsgenoms, benachbart zur Insertionsstelle des Phagen (*attachment site*), mit ausgeschnitten und verpackt werden. Am besten untersucht ist die spezielle Transduktion des Phagen λ [18]. Dessen *attachment site* liegt zwischen dem *gal*- und dem *bio*-Operon von *E. coli*. Entsprechend können nur Gene dieser Operons durch die spezielle Transduktion mit dem λ -Phagengenom übertragen werden [19].

1.4 Lysogene Konversion

Manche Phagen Genome temperenter Phagen enthalten neben den Genen für die Reproduktion der Phagen zusätzliche, auch Morone [20, 21] oder *auxiliary metabolic genes* (AMG, [22]) genannte Gene. Diese werden in lysogenen Wirtsbakterien exprimiert und führen zu veränderter Fitness oder anderen Phänotypen (lysogene Konversion). Die bekanntesten Morone sind die Toxingene einiger temperenter Phagen, die dazu führen können, dass ein apathogenes Bakterium zum pathogenen wird. Beispiele für Prophagen-kodierte Toxine sind das Botulinumtoxin, Diphtherietoxin, Cholera toxin und die Shiga-Toxine [21]. Ein anderes Beispiel sind Gene für die Photosynthese, kodiert auf den Genomen von Cyanophagen [23]. Lysogene Konversion kann auch zu erhöhter Biofilmbildung, erhöhten Kolonisierungsfrequenzen oder zur Erweiterung des Wirtsbereiches lysogener Bakterien führen [24–26].

1.5 Wirtsbereich und Stabilität von Phagen

Der überwiegende Anteil der Phagen hat einen so genannten „engen Wirtsbereich“, der nur einige Stämme einer Art umfasst. Es gibt aber auch Phagen mit einem „breiten Wirtsbereich“, der Art- oder Gattungs-übergreifend sein kann [27]. So wurden z. B. für den Phagen P1 für die Wirtsbereichsbestimmung 23 Stämme unterschiedlicher Arten getestet [12]. An 21 Stämme konnte P1 adsorbieren und die DNA injizieren. In 14 Arten wurden infektiöse Phagennachkommen gebildet. Diese 14 verschiedenen Arten stammten aus neun verschiedenen Gattungen der Ordnung *Enterobacterales* und zwei aus der Gruppe der Pseudomonaden. Der Phage Mu bildet Plaques auf verschiedenen Stämmen aus Arten der Ordnung *Enterobacterales*, z. B. *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella Typhi*, *Enterobacter cloacae* und auf einigen *Erwinia*-Arten [28].

Die Stabilität von Phagen in der Umwelt hängt vom jeweiligen Phagen selbst und den Umweltbedingungen ab. Stark negativ wirkt sich Sonnenlicht insbesondere durch seinen UV-Lichtanteil auf das Überleben von Phagen aus [29, 30]. Phagen können außerhalb ihres Wirtes oft lange überdauern, z. B. Wochen oder Monate in Böden, Gewässern oder zellfreien Nährmedien [31, 32] oder Jahre in sprühgetrockneten Formulierungen [33]. Von einigen Phagen ist ihre Resistenz gegen Hitze oder Trockenheit bekannt [34, 35]. So überstehen Phagen der Milchsäurebakterien oft eine Hitzebehandlung von 15 Minuten bei 90° C. Durch Behandlung bei 90° C für 45 min wurden jedoch alle getesteten thermotoleranten Phagen inaktiviert [36].

1.6 Anwendung von Phagen

Phagen wurden ursprünglich vorwiegend zur Konstruktion von Bakterien mit Hilfe der Transduktion eingesetzt. Heute werden Phagen in vielen Bereichen der Bio- und Lebensmitteltechnologie, der Human- und Tiermedizin (Pathogenbekämpfung) sowie der Landwirtschaft angewendet [37–40]. Dazu werden sie zunehmend gentechnisch verändert [41–45]. Ziel dabei ist, die Phageneigenschaften für den jeweiligen Einsatz zu verbessern, z. B. durch Erweiterung des Wirtsbereiches, Stabilisierung der Partikel, Wechsel von temperenter zu virulenter Vermehrung, Verhinderung der Lyse der Wirtszelle oder erhöhte Biofilmauflösung. Phagen

dienen auch als Spenderorganismen für eine Vielzahl von Genen, u. a. zur Enzymproduktion, z. B. T4 DNA-Ligase und T7 DNA-Polymerase für die Molekularbiologie, Depolymerasen für die Kapsel- oder Biofilmauflösung [46] oder Endolysin in der Lebensmittelindustrie (u. a. gegen Listerien [47]). Häufig werden Phagengenome als Vektoren zum Transfer von Fremdgenen genutzt und dazu durch gentechnische Veränderungen optimiert, z. B. auf der Grundlage der Phagen λ und M13 [48].

1.7 Sicherheitsrelevante Eigenschaften von Phagen

Phagen selbst stellen kein Risiko für Mensch, Tier oder Pflanze dar. Sie können jedoch aufgrund verschiedener Faktoren das pathogene Potenzial ihrer Wirtsbakterien erhöhen [49].

1.7.1 Lysogene Konversion

Temperente Phagen können in ihrem Genom sicherheitsrelevante eigene Gene (Morone, AMG) tragen, die bei Lysogenisierung infizierter Zellen auf diese übertragen und dort exprimiert werden können (lysogene Konversion). Hier ist neben bekannten pathogenen Genen (z. B. Toxingene) auch zu berücksichtigen, dass die Funktion von ca. 70 % aller Phagengene unbekannt ist [50]. Werden Phagen als Spender- oder Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten eingesetzt, ist die Risikobewertung anhand der Nukleotidsequenz des Phagengenoms vorzunehmen. Durch bioinformatische Analysen (z. B. BLAST-Analysen, Annotationen, Analysen mit der *Virulence Factor database*) kann mit hinreichender Sicherheit ausgeschlossen werden, dass sich unter den Phagengenen mit unbekannter Funktion Gene befinden, die die Virulenz von Wirtsbakterien erhöhen.

Die Nukleotidsequenz zeigt auch an, ob es sich bei dem Phagen um einen temperenten Phagen handelt (anhand von bestimmten Genen für Integration/Exzision der Phagen-DNA und Regulationsgenen, z. B. für Repression der lytischen Vermehrung).

1.7.2 Transduktion

Der Anteil der transduzierenden Phagen an der Gesamtheit der Phagen ist hoch, aber die Fähigkeit eines Phagen zur Transduktion wird selten bestimmt. Präparationen von generell transduzierenden Phagen enthalten einen kleinen Anteil infektiöser Partikel mit Genomabschnitten des letzten Vermehrungswirtes (bis zu ca. 6 % des bakteriellen Genoms bei Jumbophagen). Diese Abschnitte werden in den neuen Wirt übertragen und können rekombinativ integriert werden (Transduktion). Ein solcher DNA-Abschnitt kann pathogene Gene oder Gengruppen oder Pathogenitätsinseln etc. umfassen. Für die Risikobewertung der Phagenpräparation sowie ggf. der Transduktanten ist maßgeblich, welche Eigenschaften der letzte Wirt hat (z. B. virulenz erhöhende Gene im eigenen Genom), und ob der Phage zur generellen Transduktion in der Lage ist (nachgewiesen durch experimentelle Daten oder vorhergesagt anhand der Genomsequenz des Phagen, s. Abschnitt 1.3.1).

1.7.3 Wirtsbereich von Phagen

Phagen können entweder einen Wirt (ein Stamm oder eine Spezies) oder verschiedene Spezies oder Gattungen infizieren (enger bzw. breiter Wirtsbereich). Bei den meisten Phagen ist der Wirtsbereich jedoch nicht bekannt. Bei Arbeiten, die zur Lysogenisierung (s. Abschnitt 1.4) oder Transduktion (s. Abschnitt 1.3.1) der infizierten Zellen führen, ist zu beachten, dass möglicherweise auch andere als die geplanten Zielorganismen infiziert werden.

2 Viren von Archaeen

Verglichen mit dem Erforschungs- und Nutzungsstand der Phagen sind die Kenntnisse über Archaeenviren deutlich geringer. Zurzeit werden vom *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) 61 Familien von Archaeenviren anerkannt. Das Genom der Archaeenviren besteht zumeist aus doppelsträngiger DNA (dsDNA), mit Ausnahme von zwei Virusfamilien, deren Vertreter Genome aus einzelsträngiger DNA (ssDNA) besitzen. Die Genome können linear oder zirkulär vorliegen und eine Genomgröße von 5 bis 150 kbp aufweisen [51].

Der Anteil der Gene mit unbekannter Funktion im Genom von Archaeenviren beträgt durchschnittlich 75 % [52].

Die bislang entdeckten Archaeenviren lassen sich zwei unterschiedlichen Typen zuordnen. Der ältere Typ der Archaeenviren entstand bereits im Urahn der heutigen Bakterien und Archaeen. Dieser Typ lässt sich den *Caudoviricetes* zuordnen und hat häufig eine Phagen-ähnliche Morphologie mit einem Kopf und einem Schwanz. Später im Laufe der Evolution entstanden die Archaeen-spezifischen Viren mit im Vergleich zu den Bakteriophagen ungewöhnlicher Morphologie (z. B. tropfen-, spindel- oder flaschenförmig oder mit zwei Schwänzen).

Für Archaeenviren sind sowohl lytische Replikationszyklen als auch chronische Infektionen bekannt [53]. Die Mechanismen der Replikation sind für einige Archaeenviren aufgeklärt, für den Großteil der Archaeenviren jedoch noch nicht [52].

Ob es Gentransfermechanismen wie die spezielle oder generelle Transduktion auch bei Archaeenviren gibt, ist noch unklar. Die Übertragung von fremdem Genmaterial in Virushüllen wurde bisher nur für *Alphafusellovirus beppuense* (Sulfolobus spindle-shaped virus 1, SSV1) und *Alphafusellovirus reykanense* (Sulfolobus spindle-shaped virus, SSV2) gezeigt, die jeweils genetisches Material eines sog. Satellitenvirus (pSSVx oder pSSVi) auf ihre Wirtsbakterien (*Sulfolobus solfataricus* oder *Sulfolobus islandicus*) übertragen [54].

Archaeen, die Wirtsorganismen der Archaeenviren, werden in der Liste der Spender- und Empfängerorganismen nach § 5 GenTSV gegenwärtig der Risikogruppe 1 zugeordnet, mit der einzigen Ausnahme [Methanobrevibacter oralis](#), das der Risikogruppe 2 zugeordnet wird.

3 Empfehlung

Phagen werden als Spender- und Empfängerorganismen gem. § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV der **Risikogruppe 1** zugeordnet, wenn für sie nicht beschrieben ist, dass sie die human- oder tierpathogenen Eigenschaften eines Bakteriums verstärken, und in ihrem Genom keine Gene mit Homologie zu Genen für Virulenz-erhöhende Faktoren für menschliche oder tierische Krankheitserreger vorliegen.

Phagen werden als Spender- und Empfängerorganismen gem. § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV der **Risikogruppe 2** zugeordnet, wenn für sie beschrieben ist, dass sie die human- oder tierpathogenen Eigenschaften eines Bakteriums verstärken, oder in ihrem Genom Gene mit Homologie zu Genen für Virulenzfaktoren bzw. Virulenz-erhöhende Faktoren für menschliche oder tierische Krankheitserreger vorliegen.

Vermehrte Phagenpartikel in Präparationen von Phagen werden gem. § 5 Absatz 1 GenTSV der **Risikogruppe 1** zugeordnet, wenn es sich um Phagen handelt, die als Spender- und Empfängerorganismen der **Risikogruppe 1** zugeordnet sind, und

- sie nicht generell transduzierend sind, oder
- sie durch Vermehrung in apathogenen Bakterien erzeugt wurden.

Vermehrte Phagenpartikel in Präparationen von Phagen werden gem. § 5 Absatz 1 in Verbindung mit Anlage 1 Nr. 1 c) und Nr. 2.1 b) GenTSV der **Risikogruppe 2** zugeordnet, wenn es sich um Phagen handelt, die als Spender- und Empfängerorganismen der **Risikogruppe 2** zugeordnet sind, oder in ihr Genom Gene für Virulenz-erhöhende Faktoren oder mit einem sonstigen Gefährdungspotenzial inseriert wurden, oder

- wenn sie zur generellen Transduktion in der Lage sind, so dass nicht ausgeschlossen ist, dass es sich bei den generierten Phagen um ein Gemisch aus Phagen und generell transduzierenden Partikeln handelt, und
- sie in pathogenen Bakterien vermehrt wurden, so dass nicht ausgeschlossen ist, dass ggf. vorliegende generell transduzierende Partikel Gene für Virulenz-erhöhende Faktoren übertragen.

Archaeenviren (einschließlich Mischungen von Archaeenviren in Präparationen) werden als Spender- und Empfängerorganismen gem. § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

4 Begründung

Die Einstufung von Phagen als Spender- und Empfängerorganismen erfolgt abhängig davon, ob ihr Genom Gene enthält, die das pathogene Potenzial von infizierten bzw. transduzierten Bakterien erhöhen könnten (z. B. Toxin- oder andere virulenz erhöhende Gene). Die Einstufung von Phagenpräparationen erfolgt abhängig von der Einstufung der verwendeten Phagen.

Falls die verwendeten Phagen zur generellen Transduktion in der Lage sind (s. Abschnitt 1.3.1), ist ebenfalls einzubeziehen, welcher Risikogruppe die Bakterien zugeordnet sind, mit denen die Präparationen hergestellt wurden. Auch Präparationen von Phagen der Risikogruppe 1, die zur generellen Transduktion in der Lage sind, können Phagen mit Toxin- bzw. virulenz erhöhenden Genen enthalten, wenn zur Vermehrung pathogene Bakterien verwendet

werden. Bei einer akzidentellen Inokulation könnten diese Phagen die körpereigenen Bakterien der Beschäftigten transduzieren und dadurch deren Gefährdungspotenzial erhöhen.

Archaeenviren und ihre Präparationen werden der Risikogruppe 1 zugeordnet. Grund hierfür ist, dass Archaeen bis auf eine Ausnahme der Risikogruppe 1 zugeordnet sind und keine Toxingene oder andere Virulenzfaktorgene für Archaeenviren bekannt sind. Aus diesem Grund ist auch nicht davon auszugehen, dass Archaeenviren Gene übertragen, die das pathogene Potenzial von infizierten Archaeen erhöhen.

Hinweis:

Bei Phagen, die von Stammsammlungen wie der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen werden, wird üblicherweise angegeben, mit welchen Wirtsbakterien die Phagenpräparationen hergestellt wurden. Werden Präparationen von Phagen, deren Genom nach dem *headful*-Mechanismus vom pac-Typ in Phagenpartikel verpackt wird (s. Abschnitt 1.3.1), von Kooperationspartnern bezogen, ist für die Einstufung der Phagen aus den o. g. Gründen entscheidend, mit welchen Bakterien die Phagen vermehrt wurden. Diese Information ist daher grundsätzlich anzufordern. Wenn sie nicht vorliegt und beschrieben ist, dass Bakterien der Risikogruppe 2 zum Wirtsbereich der Phagen gehören, sind die o. g. Phagenpräparationen der Risikogruppe 2 zuzuordnen.

5 Literatur

1. **Hendrix RW, Smith MC, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF** (1999). Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5):2192–7.
2. **Ashelford KE, Day MJ, Fry JC** (2003). Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol* **69**(1):285–9.
3. **Brüssow H, Kutter E** (2005). Phage ecology. In Kutter E, Sulakvelidze A (Hrsg.), *Bacteriophages: Biology and Application*, S. 129–64. CRC Press, Boca Raton, Florida.
4. **Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann M-L, Brüssow H** (2004). Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol* **186**(12):3677–86.
5. **Buchan A, Wiedman S, Lambirth K, Bellanger-Perry M, Figueroa JL, Wright ET, Suresh PS, Zhang Q, Thomas JA, Serwer P, White RA** (2025). Unlocking the genomic repertoire of a cultivated megaphage. *Npj Viruses* **3**(1):71.
6. **Ackermann H-W** (2009). Phage classification and characterization. In Clokie MR, Kropinski AM (Hrsg.), *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*, vol. 501, S. 127–40. Humana Press.
7. **Calendar R, R. Inman** (2005). Phage biology. In Waldor MK, Friedman DI, Adhya SL (Hrsg.), *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*, S. 18–36. ASM Press, Washington DC.
8. **Chiang YN, Penadés JR, Chen J** (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathog* **15**(8):e1007878.
9. **Casjens SR, Gilcrease EB** (2009). Determining DNA packaging strategy by analysis of the termini of the chromosomes in tailed-bacteriophage virions. *Methods Mol Biol* **502**:91–111.
10. **Chiang YN, Penadés JR, Chen J** (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathog* **15**(8):e1007878.

11. **Garneau JR, Depardieu F, Fortier L-C, Bikard D, Monot M** (2017). PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. *Sci Rep* **7**(1):8292.
12. **Yarmolinsky MB, Sternberg N** (1988). Bacteriophage P1. In Calendar R (Hrsg.), The bacteriophages, S. 291–438. Plenum Publishing Corporation, New York, N. Y..
13. **Schmieger H, Backhaus H** (1973). The origin of DNA in transducing particles in P22-mutants with increased transduction-frequencies (HT-mutants). *Mol Gen Genet* **120**(2):181–90.
14. **Schicklmaier P, Moser E, Wieland T, Rabsch W, Schmieger H** (1998). A comparative study on the frequency of prophages among natural isolates of *Salmonella* and *Escherichia coli* with emphasis on generalized transducers. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**(1):49–54.
15. **Shousha A, Awaianont N, Sofka D, Smulders FJM, Paulsen P, Szostak MP, Humphrey T, Hilbert F** (2015). Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. *Appl Environ Microbiol* **81**(14):4600–6.
16. **Chen J, Quiles-Puchalt N, Chiang YN, Bacigalupe R, Fillol-Salom A, Chee MSJ, Fitzgerald JR, Penadés JR** (2018). Genome hypermobility by lateral transduction. *Science* **362**(6411):207–12.
17. **Humphrey S, Fillol-Salom A, Quiles-Puchalt N, Ibarra-Chávez R, Haag AF, Chen J, Penadés JR** (2021). Bacterial chromosomal mobility via lateral transduction exceeds that of classical mobile genetic elements. *Nat Commun* **12**(1):6509.
18. **Shpakovski GV, Berlin YA** (1984). Site-specificity of abnormal excision: the mechanism of formation of a specialized transducing bacteriophage lambda plac5. *Nucleic Acids Res* **12**(17):6779–95.
19. **Weisberg RA** (1996). Specialized transduction. In Neidhardt FC, Lin EC, Curtiss R, III, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (Hrsg.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, S. 2442–8. ASM Press, Washington, DC..
20. **Abedon ST** (2022). Bacteriophages as Drivers of Evolution. An Evolutionary Ecological Perspective. In Abedon ST (Hrsg.), Bacteriophages as Drivers of Evolution. An Evolutionary Ecological Perspective, S. 153–64. Springer, Cham.
21. **Brüssow H, Canchaya C, Hardt W-D** (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(3):560-602.
22. **Breitbart M, Thompson L, Suttle C, Sullivan M** (2007). Exploring the Vast Diversity of Marine Viruses. *Oceanography (Wash D C)* **20**(2):135–9.
23. **Puxty RJ, Millard AD, Evans DJ, Scanlan DJ** (2015). Shedding new light on viral photosynthesis. *Photosynth Res* **126**(1):71–97.
24. **Gummalla VS, Zhang Y, Liao Y-T, Wu VCH** (2023). The Role of Temperate Phages in Bacterial Pathogenicity. *Microorganisms* **11**(3):541.
25. **Krylov VN** (2003). Rol' gorizonta'nogo perenosa genov bakteriofagami v vozniknovenii patogen-nykh bakterii. (Role of horizontal gene transfer by bacteriophages in the origin of pathogenic bacteria). *Genetika* **39**(5):595–620.
26. **Wagner PL, Waldor MK** (2002). Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun* **70**(8):3985–93.
27. **Jensen EC, Schrader HS, Rieland B, Thompson TL, Lee KW, Nickerson KW, Kokjohn TA** (1998). Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **64**(2):575–80.

28. **Harshey RM** (1988). Phage Mu. *In* Calendar R (Hrsg.), The bacteriophages, S. 193–234. Plenum Publishing Corporation, New York, N. Y..
29. **Wommack KE, Hill RT, Muller TA, Colwell RR** (1996). Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. *Appl Environ Microbiol* **62**(4):1336–41.
30. **Duarte J, Pereira C, Calado R, Almeida A** (2025). Phage Stability Research: A Systematic Review Bridging Methodological Gaps and Paving the Way for Industrial and Clinical Applications. *Phage (New Rochelle)* **6**(3):189–200.
31. **Paepe M de, Taddei F** (2006). Viruses' Life History: Towards a Mechanistic Basis of a Trade-Off between Survival and Reproduction among Phages. *PLoS Biol* **4**(7):e193.
32. **Pantastico-Caldas M, Duncan KE, Istock CA, Bell JA** (1992). Population Dynamics of Bacteriophage and *Bacillus Subtilis* in Soil. *Ecology* **73**(5):1888–902.
33. **Li M, Ke W-R, Chang RYK, Chan H-K** (2025). Long-term Storage Stability of Inhalable Phage Powder Formulations: A Four-Year Study. *AAPS J* **27**(5):128.
34. **Marsh P, Wellington E** (1994). Phage-host interactions in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **15**(1):99–107.
35. **Silva YJ, Costa L, Pereira C, Cunha Â, Calado R, Gomes NCM, Almeida A** (2014). Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Microb Biotechnol* **7**(5):401–13.
36. **Capra ML, Neve H, Sorati PC, Atamer Z, Hinrichs J, Heller KJ, Quiberoni A** (2013). Extreme thermal resistance of phages isolated from dairy samples: Updating traditional phage detection methodologies. *Int Dairy J* **30**(2):59–63.
37. **Vandamme EJ, Mortelmans K** (2019). A century of bacteriophage research and applications: impacts on biotechnology, health, ecology and the economy!. *J Chem Technol Biotechnol* **94**(2):323–42.
38. **Marks T, Sharp R** (2000). Bacteriophages and biotechnology: a review. *J Chem Technol Biotechnol* **75**(1):6–17.
39. **Jaglan AB, Anand T, Verma R, Vashisth M, Virmani N, Bera BC, Vaid RK, Tripathi BN** (2022). Tracking the phage trends: A comprehensive review of applications in therapy and food production. *Front Microbiol* **13**:993990.
40. **García-Cruz JC, Huelgas-Méndez D, Jiménez-Zúñiga JS, Rebollar-Juárez X, Hernández-Garnica M, Fernández-Presas AM, Husain FM, Alenazy R, Alqasmi M, Albalawi T, Alam P, García-Contreras R** (2023). Myriad applications of bacteriophages beyond phage therapy. *PeerJ* **11**:e15272.
41. **Pires DP, Cleto S, Sillankorva S, Azeredo J, Lu TK** (2016). Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**(3):523–43.
42. **Pizarro-Bauerle J, Ando H** (2020). Engineered Bacteriophages for Practical Applications. *Biol Pharm Bull* **43**(2):240–9.
43. **Gibb B, Hyman P, Schneider CL** (2021). The Many Applications of Engineered Bacteriophages- An Overview. *Pharmaceuticals (Basel)* **14**(7):364.
44. **Jo SJ, Kwon J, Kim SG, Lee S-J** (2023). The Biotechnological Application of Bacteriophages: What to Do and Where to Go in the Middle of the Post-Antibiotic Era. *Microorganisms* **11**(9):2311.
45. **Mahler M, Costa AR, van Beljouw SPB, Fineran PC, Brouns SJJ** (2023). Approaches for bacteriophage genome engineering. *Trends Biotechnol* **41**(5):669–85.

46. **Islam MM, Mahbub NU, Shin WS, Oh MH** (2024). Phage-encoded depolymerases as a strategy for combating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front Cell Infect Microbiol* **14**:1462620.
47. **Lee C, Kim H, Ryu S** (2023). Bacteriophage and endolysin engineering for biocontrol of food pathogens/pathogens in the food: recent advances and future trends. *Crit Rev Food Sci Nutr* **63**(27):8919–38.
48. **Monaci P, Urbanelli L, Fontana L** (2001). Phage as gene delivery vectors. *Curr Opin Mol Ther* **3**(2):159–69.
49. **Verheust C, Pauwels K, Mahillon J, Helinski DR, Herman P** (2010). Contained use of Bacteriophages: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. *Appl Biosaf* **15**(1):32–44.
50. **Hatfull GF** (2025). All the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **122**(43):e2523344122.
51. **ICTV** (2026). Virus Properties. <https://ictv.global/virus-properties>. Geprüft am 07.04.2026.
52. **Krupovic M, Cvirkaite-Krupovic V, Iranzo J, Prangishvili D, Koonin EV** (2018). Viruses of archaea: Structural, functional, environmental and evolutionary genomics. *Virus Res* **244**:181–93.
53. **Munson-McGee JH, Peng S, Dewerff S, Stepanauskas R, Whitaker RJ, Weitz JS, Young MJ** (2018). A virus or more in (nearly) every cell: ubiquitous networks of virus-host interactions in extreme environments. *ISME J* **12**(7):1706–14.
54. **Wang Y, Duan Z, Zhu H, Guo X, Wang Z, Zhou J, She Q, Huang L** (2007). A novel *Sulfolobus* non-conjugative extrachromosomal genetic element capable of integration into the host genome and spreading in the presence of a fusellovirus. *Virology* **363**(1):124–33.