

## Bakteriophagen und Abwassermanagement

# Die unentdeckte Vielfalt der *Comamonadaceae*-Phagen in Kläranlagen

JIMENA BARRERO-CANOSA, MYRIEL COOPER

FACHGEBIET UMWELTMIKROBIOLOGIE, INSTITUT FÜR TECHNISCHEN UMWELTSCHUTZ, TU BERLIN

**Phages are important members of wastewater treatment plant communities. Surprisingly, little is known about phages and their impact on microbially-mediated processes in these facilities. We explore phages infecting the *Comamonadaceae*, a bacterial family consistently found in wastewater treatment plants. Our findings reveal limited genetic similarity between newly isolated phages and known ones, emphasizing underestimated diversity and understanding of their impact on wastewater treatment.**

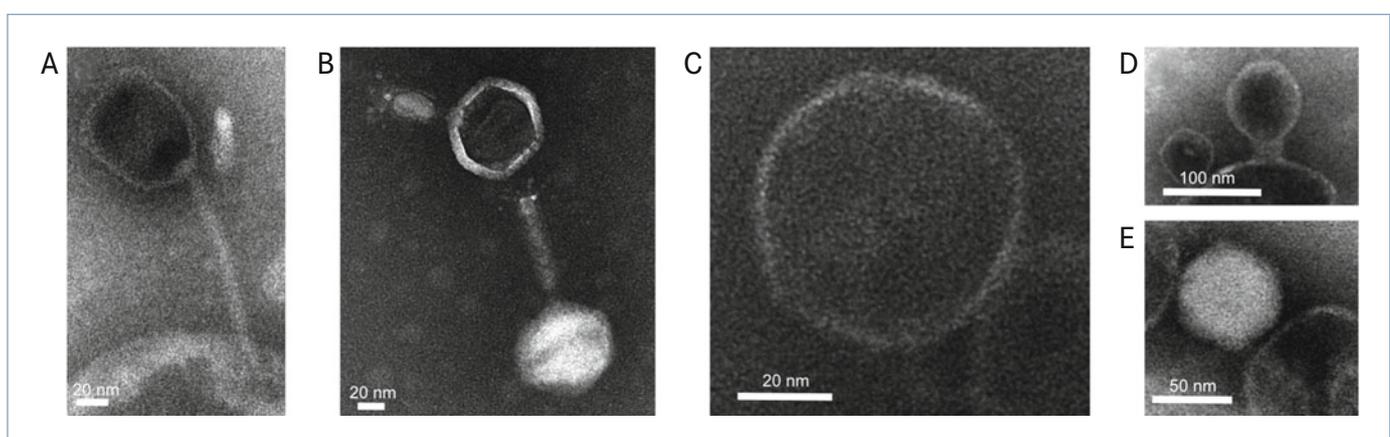
DOI: 10.1007/s12268-024-2093-1  
© Die Autorinnen 2024

■ Phagen – Viren, die Bakterien infizieren, – bestehen aus Nukleinsäure, die von einer proteinösen Hülle namens Kapsid umgeben ist, und besitzen meistens einen Schwanz. Seit ihrer Entdeckung wurde ihr biotechnologisches Anwendungspotenzial als Mittel zur Behandlung bakterieller Infektionen vorgeschlagen [1]. Ab den späten 1990er-Jahren wurde entdeckt, dass Phagen die biologischen Einheiten mit der weltweit höchsten Anzahl sind, mit einer globalen Schätzung von  $10^{31}$  Partikeln [1]. Zudem wurde klar, dass sie auch eine entscheidende Rolle in der mikrobiellen Ökologie spielen, da sie zum

Zelltod von Bakterien durch Zellyse führen können und dadurch gelöste organische Substanzen freisetzen [2].

Die klassischen Vermehrungszyklen von Phagen sind der lytische und der lysogene Zyklus. Im lytischen Zyklus übernimmt der Phage die zellulären Prozesse des Wirts, um neue virale Partikel zu produzieren und die Wirtszelle anschließend zu lysieren. Lysogene Phagen integrieren dagegen ihr Genom als Prophage in das bakterielle Genom oder verbleiben ähnlich wie Plasmide im Zytoplasma. Darüber hinaus können Phagen pseudolysogenen und chronischen Zyklen

unterliegen und filamentöse Phagen extrudieren ihre virale Nachkommenschaft, ohne eine Lyse zu verursachen. Phagen können aber auch den Stoffwechsel des Wirts neu programmieren und neue Phänotypen in einem Prozess einführen, der als lysogene Konversion bekannt ist, oder neue physiologische Eigenschaften vermitteln, wie auxiliäre metabolische Gene (AMGs) durch ihre Integration als Prophagen [3]. Phagen beeinflussen daher direkt oder indirekt alle natürlichen und technischen Prozesse, die von Mikroorganismen vermittelt werden. In Ozeanen, einem Habitat, auf das sich die meisten Studien bisher konzentriert haben, werden z. B. täglich etwa 20 % der Bakterien von Phagen lysiert. Sie tragen somit erheblich zum Fluss von Kohlenstoff und Nährstoffen im marinen Nahrungsnetz bei, einem Vorgang, der als *viral shunt* bekannt ist [2]. In anderen Umgebungen – wie Boden, Süßwasser und dem Darmmikrobiom von Menschen und Tieren sowie in technischen Systemen wie Biogasreaktoren oder Kläranlagen – wurde ebenfalls begonnen, die Diversität der Phagen zu untersuchen [4]. Insbesondere die Metagenomik hat dazu beigetragen, die Vielfalt von Phagen in verschiedenen Umgebungen zu erkennen [5]. Aufgrund der außergewöhnlichen Vielfalt und genomischen Neuheit von Phagen können die meisten



▲ **Abb. 1:** TEM-Aufnahmen der isolierten *Comamonadaceae*-Phagen. Alle Phagen weisen eine Kopf-Schwanz-Morphologie auf und wurden daher in die Klasse *Caudoviricetes* eingeordnet. Die Schwänze weisen unterschiedliche Merkmale auf: **A**, flexibler langer Schwanz. **B**, kontraktilem langer Schwanz. **C–E**, kurze nicht kontraktile Schwänze.

Sequenzen aus Virom-Datensätzen jedoch keinen bekannten oder nur entfernt verwandten Virusarten zugeordnet werden. Daher ist nach wie vor für die Mehrheit der Phagen nicht verstanden, wie sie mit ihren Wirten interagieren und mikrobiell-katalysierte Prozesse beeinflussen.

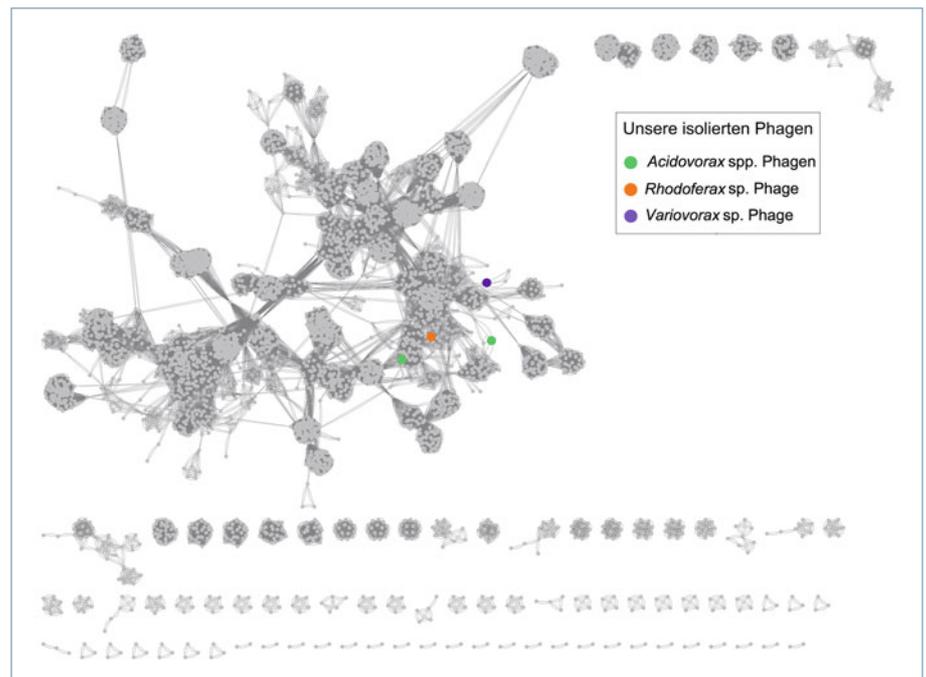
### Viren und Phagen in Kläranlagen

Eines der wichtigsten Systeme, in denen biologische Prozesse weltweit in großem Maßstab genutzt werden, sind biologische Stufen der Abwasserklärung. Obwohl bereits eine Vielzahl von Phagen aus Kläranlagen isoliert wurden, zeigen metagenomische Virom-Studien auch in Kläranlagen, dass sich nur 0,4 bis 1,6 % der erhaltenen viralen Sequenzen mit bekannten viralen Familien decken [6]. Für Kläranlagen wurden  $10^7$  bis  $10^{10}$  virusartige Partikel pro ml beschrieben [5] und es wird geschätzt, dass es sich bei ca. 72 % der dsDNA-Viren im Belebtschlamm von Kläranlagen um Phagen handelt [7]. Aufgrund der erheblichen genetischen Unterschiede zwischen gut erforschten Phagen und Phagen aus Kläranlagen ist es jedoch nicht möglich, Phagen-Wirt-Interaktionen auf Grundlage der traditionell umfassend erforschten Phagen zu extrapolieren. Es ist daher umso wichtiger, die Diversität von Phagen in Kläranlagen und ihren Einfluss auf wichtige mikrobielle Gruppen in der Abwasserreinigung zu verstehen.

### Phagen der *Comamonadaceae*

Die bakterielle Familie der *Comamonadaceae* ist eine in aquatischen Systemen ubiquitär verbreitete Familie der Abteilung der Proteobakterien. Vertreter dieser Familie sind in wichtige Prozesse des Metallkreislaufs, der Denitrifikation oder der Transformation von oft toxischen und/oder persistierenden Verbindungen involviert [8, 9] und gehören zum Kernmikrobiom von Kläranlagen [8, 10]. Trotz der wichtigen Rolle der *Comamonadaceae* in biotechnologisch relevanten Prozessen der Abwasserreinigung ist verglichen zu anderen bakteriellen Gruppen wenig über ihre Phagen bekannt.

Im Rahmen dieser Studie isolierten wir Phagen der *Comamonadaceae* u. a. aus Wasserproben des Klärwerks Ruhleben in Berlin. Die aus der Kläranlage isolierten Phagen infizieren Stämme der Gattungen *Acidovorax*, *Rhodoferax* und *Variovorax*. Die Analyse der Phagenmorphologie mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigte eine große Vielfalt bezüglich der Struktur und



▲ **Abb. 2:** Die vConTACT2-Netzwerkanalyse zeigt die genetische Vielfalt der in dieser Studie isolierten Phagen im Vergleich zu bekannten Phagen aus der ProkaryoticViralRefSeqV211-Datenbank. Die Analyse basiert auf den von Phagen codierten Proteinsequenzen. Die grauen Knoten stehen für die Phagen der Datenbank. Grüne Knoten: *Acidovorax* spp. infizierende Phagen. Oranger Knoten: *Rhodoferax* sp. infizierender Phage. Lila: *Variovorax* sp. infizierender Phage.

Größe. Die Kapselgröße der Phagen variiert zwischen 40,5 nm und 79 nm und zeigte sowohl flexible als auch kontraktile und kurze Schwänze (**Abb. 1**). Wir führten eine Genom- und Netzwerk-basierte Klassifikationsmethode mittels vContact2.0 [11] und einem aus 4.534 Phagen-Genomen bestehenden Referenzdatensatz (ViralrefseqV211) sowie den neu isolierten Phagen-Genomen durch. Diese ergab, dass die von uns isolierten Phagen nicht miteinander verwandt sind und nicht nur morphologisch, sondern auch genetisch eine hohe Vielfalt aufweisen (**Abb. 2**). Phagen, die *Acidovorax* spp. infizieren, bilden dabei ein Cluster mit anderen Phagen-Genomen aus der Datenbank. Die *Rhodoferax* sp. und *Variovorax* sp. infizierenden Phagen bilden kein Cluster mit Referenz-Phagen-Genomen. Dies deutet auf ihre entfernte Verwandtschaft zu bisher beschriebenen Phagen hin und legt nahe, dass es sich in beiden Fällen um neue Phagen-Gattungen handelt. Interessanterweise konnten wir für andere von uns getesteten Vertreter der *Comamonadaceae*, z. B. *Pelomonas*, *Ideonella*, *Aquabacterium* oder *Rubrivivax*, bisher keine Phagen isolieren, auch wenn wir unvollständige Prophagen z. B. in einem Vertreter der Gattung *Rubrivivax* identifizieren konnten [8].

### Methoden zur Analyse von Wirt-Phagen-Interaktionen

Neben der Charakterisierung des Infektionszyklus, ihres Wirtsspektrums und der Stabilität der Phagen gegenüber Umweltfaktoren, ist ein weiterer Schritt, Veränderungen des Wirts auf zellulärer Ebene zu analysieren. Anhand eines aus Kläranlagenablauf isolierten *E. coli*-Phagen entwickelten wir Protokolle, um bisher unbekannte Phagenproteine zu annotieren und verglichen das infizierte Wirtspoteom mit nicht infizierten Kontrollen [12]. Die Analyse zeigte, dass Proteine, die in die Stressantwort des Wirts involviert sind, in infizierten *E. coli*-Zellen weniger abundant sind als in den Kontrollkulturen. Dies könnte eine Strategie des Phagen sein, bakterielle Abwehrprozesse zu unterdrücken. Infizierte Bakterien könnten somit weniger stressresistent gegenüber Umweltbedingungen sein und Phagen indirekt mikrobiell vermittelte Prozesse negativ beeinflussen. Die von uns isolierten *Comamonadaceae*-Phagen infizieren *Comamonadaceae*-Stämme, die in abwasserrelevante Prozesse involviert sind, wie Denitrifikation und Aromatentransformation. Diese Analysen sollen daher in Zukunft erlauben, den Einfluss der Phagen auf Mitglieder der *Comamonadaceae* und die von ihnen in der Abwas-

sereinigung vermittelten Prozesse besser zu verstehen.

## Danksagung

Max-Buchner-Forschungsstiftung: Projekt 3812. Wir danken Regina Gnirss und den Berliner Wasserbetrieben für die Möglichkeit der Probennahme in der Kläranlage Ruhleben. ■

## Literatur

- [1] Salmond GPC, Fineran PC (2015) A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* 13: 777–786
- [2] Breitbart M, Bonnain C, Malki K et al. (2018) Phage puppet masters of the marine microbial realm. *Nat Microbiol* 3: 754–766
- [3] Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST et al. (2017) Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J* 11: 1511–1520
- [4] Runa V, Wenk J, Bengtsson S et al. (2021) Bacteriophages in biological wastewater treatment systems: occurrence, characterization, and function. *Front Microbiol* 12: 2708
- [5] Tang X, Fan C, Zeng G et al. (2022) Phage-host interactions: the neglected part of biological wastewater treatment. *Water Res* 119183
- [6] Chen Y, Wang Y, Paez-Espino D et al. (2021) Prokaryotic viruses impact functional microorganisms in nutrient

removal and carbon cycle in wastewater treatment plants. *Nat Commun* 12: 5398

- [7] Li X, Cheng Z, Dang C et al. (2021) Metagenomic and viromic data mining reveals viral threats in biologically treated domestic wastewater. *Environ Sci Ecotechnol* 7: 100105
- [8] Lu H, Chandran K, Stensel D (2014) Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Res* 64: 237–254
- [9] Martínez-Ruiz EB, Cooper M, Barrero-Canosa J et al. (2021) Genome analysis of *Pseudomonas* sp. OF001 and *Rubrivivax* sp. A210 suggests multicopper oxidases catalyze manganese oxidation required for cytolindospersin transformation. *BMC Genomics* 22: 1–19
- [10] Modin O, Fuad N, Abadikhah M et al. (2022) A relationship between phages and organic carbon in wastewater treatment plant effluents. *Water Res X* 16: 100146
- [11] Bin Jang H, Bolduc B, Zablocki O et al. (2019) Taxonomic assignment of uncultivated prokaryotic virus genomes is enabled by gene-sharing networks. *Nat Biotechnol* 37: 632–639
- [12] Barrero-Canosa J, Wang L, Oyugi A et al. (2023) Characterization of phage vB\_EcoS-EE09 infecting *E. coli* DSM613 isolated from wastewater treatment plant effluent and comparative proteomics of the infected and non-infected host. *Microorganisms* 11: 2688

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der

genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Jimena Barrero-Canosa (links) und Myriel Cooper

## Korrespondenzadresse:

Dr. rer. nat. Jimena Barrero-Canosa  
 Fachgebiet Umweltmikrobiologie  
 Institut für Technischen Umweltschutz  
 Technische Universität Berlin  
 Ernst-Reuter-Platz 1  
 D-10587 Berlin  
[jimena.barrerocanosa@tu-berlin.de](mailto:jimena.barrerocanosa@tu-berlin.de)