

Umweltforschungsplan des  
Bundesministeriums für Umwelt,  
Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit

Forschungskennzahl 371271209

## **Hygienische Risiken bei der landwirtschaftlichen Verwertung von Klärschlamm durch die Aufnahme von Infektionserregern in Kulturpflanzen**

von

Eva Fornefeld, Kornelia Smalla  
Julius Kühn-Institut , Braunschweig

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Dezember 2016

## Kurzbeschreibung

Viele Details der Ökologie von bakteriellen Humanpathogenen (HP) in der pflanzlichen Umwelt sind noch nicht ausreichend verstanden. Für das Überleben von HP wie *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* O157:H7 unter diesen harschen Bedingungen spielen verschiedene äußere Faktoren eine Rolle. Mikrokosmos- und Gewächshausversuche wurden durchgeführt, um den Einfluss einzelner dieser Faktoren auf das Überleben von HP und die mögliche Besiedlung von Pflanzen unter definierten Bedingungen zu untersuchen. Es konnte ein Langzeitüberleben von LT2 und *E. coli* O157:H7 im Boden in geringer Zelldichte gezeigt werden, wobei LT2 im Vergleich zu *E. coli* O157:H7 besser überlebt. Als Ergebnis der im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Experimente kann festgehalten werden, dass eine Internalisierung von HP unter den getesteten Umweltbedingungen und bei den verwendeten relativ geringen Zellzahlen von *S. enterica* Serovar Typhimurium LT2 oder *E. coli* O157:H7 unter den untersuchten Bedingungen unwahrscheinlich bzw. selten ist. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte im Gewächshaus keine Internalisierung von LT2 oder *E. coli* O157:H7 in der Phyllosphäre von Kopfsalatpflanzen, die in kontaminierten Böden angezogen worden waren, beobachtet werden. Weder die Behandlung des Bodens mit Klärschlamm noch die Inokulation mit phytopathogenen Nematoden führte zu detektierbarer Besiedlung der Phyllosphäre der Salatpflanzen mit LT2 oder *E. coli* O157:H7. Die Gegenwart der getesteten HP selbst in hohen Zelldichten, wie sie in der Umwelt wahrscheinlich höchstens als punktuelle Kontaminationen auftreten, führt also nicht zwangsweise zu einer Kontamination der Phyllosphäre von Kopfsalat durch Internalisierung über die Wurzeln der Pflanzen, die in kontaminiertem Boden wachsen.

## Abstract

Many details of the ecology of bacterial human pathogens (HP) in the environment of plants are unknown so far. Soil as well as the rhizosphere and phyllosphere of plants are heterogeneous habitats, where conditions can change quickly and the survival of HP like *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 under these harsh conditions is influenced by many factors. Microcosm and greenhouse experiments were conducted to analyze the influence of these factors on the survival of human pathogens and the possible colonization of plants under defined experimental conditions. A long term survival of LT2 and *E. coli* O157:H7 in soil at low numbers was demonstrated and LT2 survived better compared to *E. coli* O157:H7. From the experiments conducted within the frame of this project, it can be concluded, that internalization of human pathogens into the edible parts of lettuce plants under the tested environmental conditions is rather unlikely or rare. Under the experimental conditions tested, no internalization of LT2 or *E. coli* O157:H7 was detected in the phyllosphere of lettuce plants that were grown in contaminated soil. Neither the treatment of soil with sewage sludge, nor the inoculation of phytopathogenic nematodes led to detectable colonization of the phyllosphere of lettuce plants with LT2 or *E. coli* O157:H7. Presence of the tested HP even at high cell densities which are likely to be found in the environment only as point contaminations does therefore not necessarily lead to contamination of the phyllosphere of lettuce plants through internalization via the roots of plants grown in contaminated soil.



## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	9
Tabellenverzeichnis .....	12
Abkürzungsverzeichnis .....	13
1 Einleitung .....	22
2 Literaturstudie zum Vorkommen und Überleben von humanpathogenen Enterobakterien in verschiedenen Umwelthabitaten .....	24
3 Material und Methoden .....	26
3.1 Auswahl und Herkunft der Bakterienstämme sowie Herstellung Rifampicin-resistenter Mutanten.....	26
3.2 Kopfsalat als Modellpflanze .....	26
3.3 DS-Boden für Mikrokosmos- und Gewächshausexperimente.....	27
3.4 Ablauf der Probenahmen (Mikrokosmos- und Gewächshausversuche) .....	27
3.5 Selektive Kultivierung und Anreicherung zum kultivierungsabhängigen Nachweis von Humanpathogenen .....	28
3.6 Extraktion der Gesamt-DNA aus Umweltproben .....	28
3.7 Quantitative Real-time PCR .....	29
3.7.1 Quantifizierung von Humanpathogenen .....	29
3.7.2 Quantifizierung von mobilen genetischen Elementen und Resistenzgenen .....	29
3.8 Nachweis von Humanpathogenen mittels PCR und anschließender Southern Blot-Hybridisierung.....	31
3.9 Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften mittels DGGE-Fingerprints von 16S rRNA Genfragmenten.....	31
3.10 Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften mittels Illumina MiSeq Sequenzierung .....	31
3.11 Anfärbung und Quantifizierung phytopathogener Nematoden in Salatwurzeln .....	31
3.12 Präadaption der Humanpathogene .....	32
3.13 <i>In vitro</i> Biofilmassay .....	32
3.14 Exogene Isolierung von Plasmiden (Biparental Mating).....	33
3.15 Agardiffusionstest zur Bestimmung von Resistenzen gegen Antibiotika, Desinfektionsmittel und Quecksilber (Antibiogramm).....	33
3.16 Hochdurchsatz qPCRs zur Quantifizierung von mobilen genetischen Elementen und Resistenzgenen (SmartChip).....	33
4 Ergebnisse und Diskussion.....	34
4.1 Genehmigung zum Arbeiten mit Humanpathogenen .....	34
4.2 Einrichtung eines S2-Labors mit direktem Gewächshauszugang .....	34
4.3 Experimente zum Überleben von LT2 in DS-Boden.....	34

4.3.1	Mikrokosmos-Langzeitversuch zur Analyse des Überlebens von LT2 in DS-Boden und des Einflusses von Klärschlamm und Präadaptation in Salatmedium auf das Überleben .....	34
4.3.2	Ergänzendes <i>in vitro</i> Experiment zur Untersuchung der Wirkung von Klärschlamm auf LT2.....	36
4.4	Experimente zur Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen durch LT2 .....	37
4.4.1	Vorversuch zur Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen durch LT2 in Klärschlamm-behandeltem Boden .....	37
4.4.2	Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm auf die Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen durch LT2 .....	38
4.5	Untersuchung der Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen durch LT2 bei Inokulation von Phytopathogenen .....	39
4.5.1	Einfluss der Inokulation des phytopathogenen Pilzes <i>Rhizoctonia solani</i> AGI-1B auf die Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen mit LT2 .....	40
4.5.2	Einfluss der Inokulation phytopathogener Nematoden auf die Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen mit LT2 .....	40
4.5.2.1	Vorversuch zur Identifizierung geeigneter Nematodengattungen zur Infektion von Kopfsalatpflanzen .....	40
4.5.2.2	Einfluss der Inokulation der phytopathogenen Nematoden <i>Meloidogyne hapla</i> und <i>Pratylenchus crenatus</i> auf die Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen mit LT2 .....	41
4.6	Einfluss von Klärschlamm auf Abundanzen mobiler genetischer Elemente und Resistenzgene im Boden.....	46
4.6.1	Vergleich der Resistome und Mobilome von Klärschlammproben einer Kläranlage zu verschiedenen Zeitpunkten.....	47
4.6.2	Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm auf die Häufigkeit von mobilen genetischen Elementen und Resistenzgenen im Boden.....	48
4.6.2.1	Quantifizierung von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen mittels qPCR Biofilmassay .....	48
4.6.2.2	High-throughput quantitative PCR (SmartChip) zur Quantifizierung von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen .....	50
4.6.3	Exogene Isolierung von Plasmiden aus Klärschlamm mittels „biparental mating“ und Charakterisierung der potentiellen Transkonjuganten .....	52
4.7	Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm auf die mikrobiellen Gemeinschaften im Boden .....	53
4.7.1	Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften in mit Klärschlamm behandeltem Boden im Vergleich zu unbehandeltem Boden mittels DGGE .....	53
4.7.2	Illumina MiSeq Sequenzierung zur Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm auf die Zusammensetzung des Bodenmikrobioms.....	55
4.7.3	Kultivierung von Isolaten aus Klärschlamm und Charakterisierung der Isolate .....	60
4.8	Experimente zum Überleben von <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in DS-Boden.....	61

4.8.1	Überleben von <i>E. coli</i> O157:H7 in DS-Boden und Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm und Präadaption in Salatmedium .....	61
4.8.2	Einfluss der Inokulation von <i>Meloidogyne hapla</i> auf die Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen mit <i>E. coli</i> O157:H7 unter Gewächshausbedingungen .....	62
4.9	Experimente zum Überleben von LT2 im Vergleich zu weiteren <i>Salmonella</i> -Stämmen: <i>S. Senftenberg</i> und 14028 .....	63
4.9.1	Überleben von LT2 in DS-Boden im Vergleich zu 14028 und <i>S. Senftenberg</i> und Untersuchung des Einflusses drei verschiedener Arten der Präadaption .....	64
4.9.2	<i>In vitro</i> Biofilmmassay zur vergleichenden Analyse der Fähigkeit zur Biofilmbildung bei verschiedenen Stämmen und zur Untersuchung des Einflusses von Präadaption auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung E .....	65
4.9.3	Gewächshausexperiment zur Analyse der Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen mit LT2, 14028 und <i>S. enterica</i> Serovar <i>Senftenberg</i> bei Koinokulation von <i>M. hapla</i> .....	67
5	Schlussfolgerung/Fazit .....	68
6	Quellenverzeichnis .....	70

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Modellstamm LT2 auf <i>Salmonella</i> -Chromo-Agar. ....	26
Abbildung 2	Anzucht der Modellpflanze Kopfsalat <i>Lactuca sativa</i> cv Tizian im Gewächshaus. ....	27
Abbildung 3	Schematischer Ablauf der Probenahmen bei Mikrokosmosversuchen. ....	27
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Probenahme bei Gewächshausversuchen. ....	28
Abbildung 5	Medien mit Salatextrakt zur Anzucht und Präadaption von HP. ....	32
Abbildung 6	<i>In vitro</i> Biofilmassay. ....	33
Abbildung 7	S2-Labor mit direktem Zugang zum S2-Gewächshaus zur Aufbereitung und Untersuchung von Proben aus Gewächshausversuchen mit HP. ....	34
Abbildung 8	Mikrokosmosversuch zum Überleben von LT2 in Böden mit und ohne Klärschlamm unter Gewächshausbedingungen. ....	35
Abbildung 9	Quantifizierung von LT2 im Boden. ....	35
Abbildung 10	Nachweis von LT2 98 Tage nach Inokulation in den Boden in Gesamt-DNA mittels PCR und anschließender Southern Blot-Hybridisierung. ....	36
Abbildung 11	Analyse des hemmenden Effekts von Klärschlamm auf LT2. ....	36
Abbildung 12	Vorversuch zur Kolonisierung von Salatpflanzen <i>Lactuca sativa</i> cv Tizian durch LT2. ....	37
Abbildung 13	Mikrokosmos-Gewächshausexperiment. ....	38
Abbildung 14	Quantifizierung von LT2 im Boden. ....	38
Abbildung 15	Kein Nachweis von LT2 in Gesamt-DNA aus Phyllosphärenproben mittels PCR und anschließender Southern Blot-Hybridisierung. ....	39
Abbildung 16	Anzahl der Nematoden pro Pflanze bei <i>Heterodera schachtii</i> , <i>Meloidogyne hapla</i> und <i>Pratylenchus crenatus</i> nach Infektion von 5 und 6 Wochen alten Kopfsalatpflanzen <i>Lactuca sativa</i> cv. Tizian. ....	40
Abbildung 17	Gallenbildung an Salatwurzeln von <i>Lactuca sativa</i> cv. Tizian durch Infektion mit dem phytopathogenen Nematoden <i>Meloidogyne hapla</i> . ....	41
Abbildung 18	Infektion von Wurzeln von <i>Lactuca sativa</i> cv. Tizian durch den phytopathogenen Nematoden <i>Pratylenchus crenatus</i> . ....	42
Abbildung 19	Infektion von Wurzeln von <i>Lactuca sativa</i> cv. Tizian durch den phytopathogenen Nematoden <i>Meloidogyne hapla</i> . ....	43
Abbildung 20	Anzahl der Nematoden in den Salatwurzeln von <i>Lactuca sativa</i> cv. Tizian 21 und 49 Tage nach der Infektion mit den phytopathogenen Nematoden <i>Meloidogyne hapla</i> und <i>Pratylenchus crenatus</i> . ....	44
Abbildung 21	Blatt- und Wurzelfrischgewichte der Salatpflanzen nach 21 und 49 Tagen. ....	45
Abbildung 22	Anzahl kultivierbarer LT2 im Boden (A) und in der Rhizosphäre (B) von Salatpflanzen, die mit den phytopathogenen Nematoden	

	<i>Meloidogyne hapla</i> oder <i>Pratylenchus crenatus</i> infiziert wurden, bzw. von nicht inokulierten Kontrollpflanzen. ....	46
Abbildung 23	Absolute Abundanzen der Zielgene von 16S rRNA-Genfragmenten, Klasse-1-Integrone, IncP-1 Plasmiden und Resistenzgenen in Klärschlammproben einer städtischen Kläranlage zu vier Zeitpunkten zwischen Februar 2014 und Mai 2015.....	47
Abbildung 24	Relative Abundanzen der Zielgene für Klasse 1-Integrone, IncP-1 Plasmide und Resistenzgene in vier Klärschlammproben eines städtischen Klärwerks, die zwischen Februar 2014 und Mai 2015 genommen wurden. ....	48
Abbildung 25	Absolute Häufigkeiten von Integrone, Plasmiden und Resistenzgenen in Boden, der mit Klärschlamm behandelt wurde, im Vergleich zu Kontrollboden jeweils 0, 14 und 119 Tage nach der Behandlung des Bodens mit Klärschlamm. ....	49
Abbildung 26	Relative Abundanzen von Integrone, Plasmiden und Resistenzgenen in Boden, der mit Klärschlamm behandelt wurde, im Vergleich zu Kontrollboden jeweils 0, 14 und 119 Tage nach der Behandlung des Bodens mit Klärschlamm. ....	50
Abbildung 27	Relative Abundanzen in Boden mit Klärschlamm und unbehandeltem Boden nach 0 und 49 Tagen. ....	51
Abbildung 28	Analyse der bakteriellen Gemeinschaften in Boden mit und ohne Klärschlamm mittels DGGE. ....	54
Abbildung 29	Darstellung der bakteriellen Gemeinschaften in Boden mit und ohne Klärschlamm im NMDS-Plot.....	54
Abbildung 30	Heatmap auf Genus-Ebene zur Veranschaulichung des Effekts der Klärschlammbehandlung auf die bakterielle Gemeinschaft im Boden 0, 14 und 119 Tage nach der Klärschlammbehandlung. ....	56
Abbildung 31	Überblick über die Verteilung der Häufigkeiten der definierten Response Groups in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi. ....	57
Abbildung 32	Relative Häufigkeiten der Taxa der Response Groups 1 in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi. ....	57
Abbildung 33	Relative Häufigkeiten der Taxa der Response Group 2 in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi. ....	58
Abbildung 34	Relative Häufigkeiten der Taxa der Response Group 3 in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi. ....	58
Abbildung 35	Relative Häufigkeiten der Taxa der Response Group 4 in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi. ....	59



Abbildung 36	Relative Häufigkeiten der Taxa der Response Group 5 in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi. ....	59
Abbildung 37	KBE-Zahl von <i>E. coli</i> O157:H7 im Boden. Quantifizierung von <i>E. coli</i> O157:H7 im Boden.....	62
Abbildung 38	Quantifizierung der kultivierbaren <i>E. coli</i> O157:H7 im Boden .....	63
Abbildung 39	Überleben von <i>Salmonella</i> -Stämmen im Boden nach Präadaption durch Salatmedium (lettuce medium, LM) im Vergleich zu nicht-präadaptierten <i>Salmonellen</i> aus LB.....	64
Abbildung 40	Quantifizierung von <i>Salmonella</i> im Boden anhand des Typhimurium-spezifischen Gens STM4497. ....	65
Abbildung 41	Ergebnis des Biofilmassay mit verschiedenen <i>Salmonella</i> -Stämmen und <i>E. coli</i> O157:H7. ....	66
Abbildung 42	Quantitative Auswertung des Biofilmassay.....	66

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Primer und TaqMan-Sonden zur Quantifizierung von mobilen genetischen Elementen und Resistenzgenen in Umweltproben mittels qPCR.....	30
Tabelle 2	Überblick über isolierte Transkonjuganten im Rezipienten <i>Pseudomonas putida</i> KT2442 aus Klärschlamm nach Selektion aus Tetracyclin (30 mg L <sup>-1</sup> ) oder Streptomycin (50 mg L <sup>-1</sup> ) sowie isolierte Plasmide aus den Transkonjuganten. ....	52
Tabelle 3	Überblick über die Ergebnisse der Resistenztests gegen Antibiotika sowie als Desinfektionsmittel verwendete Chemikalien mit den aus Klärschlamm isolierten Transkonjuganten. ....	52
Tabelle 4	Detektion von Integrons, Plasmiden und Resistenzgenen in Transkonjuganten aus Klärschlamm mittels Real-time PCR.....	53
Tabelle 5	Charakterisierung ausgewählter Isolate aus Klärschlamm.....	60

## Abkürzungsverzeichnis

<b>CTAB</b>	Cetyltrimethylammoniumbromid
<b>DGGE</b>	denaturierende Gradientengelelektrophorese
<b>dpi</b>	Tage nach Inokulation (days post inoculation)
<b>EMB</b>	Eosin-Methylen-Blau
<b>FRG</b>	Functional Response Group
<b>HP</b>	Humanpathogene
<b>KBE</b>	koloniebildende Einheiten
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LM</b>	Salatmedium (lettuce medium)
<b>LT2</b>	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium LT2
<b>NGS</b>	Next-Generation Sequencing
<b>qPCR</b>	quantitative Real-time PCR
<b>TBX</b>	Trypton-Galle X-glucuronide
<b>14028</b>	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium 14028

## Zusammenfassung

Viele Details der Ökologie von *Salmonella* in der pflanzlichen Umwelt sind noch nicht ausreichend verstanden. Boden sowie die Rhizosphäre und Phyllosphäre von Pflanzen sind sehr heterogene Habitate, in denen sich die herrschenden Umweltbedingungen schnell verändern können. Für das Überleben von bakteriellen Humanpathogenen (HP) wie *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* O157:H7 unter diesen harschen Bedingungen spielen verschiedene äußere Faktoren eine Rolle. Anhand einer Literaturrecherche wurde vor Beginn der experimentellen Arbeiten dieses Projektes der aktuelle Stand der Forschung auf dem Gebiet der Besiedelung von Pflanzen mit HP analysiert. Die Möglichkeiten des Befalls von Pflanzen mit HP sind sehr vielfältig, und aus den Veröffentlichungen geht hervor, dass HP prinzipiell in der Lage sind, sich nicht nur an Pflanzenoberflächen anzuheften, sondern auch das Pflanzeninnere zu besiedeln (Internalisierung). Verschiedene biotische und abiotische Faktoren beeinflussen das Schicksal von HP in der Umwelt, die in den wenigen bisher vorliegenden Publikationen nicht konkret ausgewiesen und bewertet werden. Die genauere Erforschung und das bessere Verständnis dieser Einflussfaktoren sind daher essentiell zur Einschätzung des potentiellen Risikos einer Besiedlung von Kulturpflanzen mit HP. Zu den bekannten Einflussfaktoren gehören Temperatur, pH-Wert und Feuchtigkeit (Santamaría und Toranzos, 2003; Jacobsen und Bech, 2012). Neben diesen Umweltfaktoren spielen auch die Pflanzenspezies-, Sorten- und Bodentyp-abhängige Zusammensetzung und Diversität mikrobieller Gemeinschaften eine Rolle (Dingman, 2000; Berg und Smalla, 2009; Kroupitski et al., 2009; Barak et al., 2011; Quilliam et al., 2012; Schikora et al., 2012b; Leff und Fierer, 2013). Es können auch diverse Faktoren, die das Überleben von HP bestimmen, gleichzeitig wirken; diese Faktoren können sich auch gegenseitig beeinflussen und so kann es ggf. zu einem erhöhten Risiko kommen.

Um das Überleben von HP in der Umwelt besser zu verstehen, wurden anhand der Literaturrecherche die Faktoren identifiziert, die potentiell HP beeinflussen. Mikrokosmos- und Gewächshausversuche (S2-Bedingungen) wurden durchgeführt, um den Einfluss einzelner dieser Faktoren auf das Überleben von HP und die mögliche Besiedlung von Pflanzen unter definierten Bedingungen zu untersuchen. Als Modellpflanze wurde der Kopfsalat *Lactuca sativa* Sorte Tizian gewählt, bei dem untersuchten Boden handelt es sich um diluvialen Sandboden, und untersucht wurden die HP *S. enterica* Serovar Typhimurium LT2 (im Folgenden kurz: LT2), *S. Typhimurium* 14028s (kurz: 14028), *S. enterica* Serovar Senftenberg und *E. coli* O157:H7 als Modellstämme.

Um das Schicksal der inokulierten Modellstämme in den verschiedenen Habitaten Boden, Rhizosphäre und Phyllosphäre zu verfolgen und zu quantifizieren werden spezifische kultivierungsabhängige und -unabhängige Methoden benötigt. Daher wurden Rifampicin-resistente Mutanten der Modellstämme erzeugt, die selektiv auf Rifampicin-haltigen Medien kultiviert werden können. Für die kultivierungsabhängige Detektion bzw. Quantifizierung werden Verdünnungsreihen der Proben erstellt und entsprechende selektive Medien für die Kultivierung verwendet. Bei einer geringen Anzahl kultivierbarer Bakterien in der Probe wird vor der Kultivierung auf selektiven Medien ein Anreicherungsschritt durchgeführt. Dabei werden die Proben 1:10 verdünnt, in gepuffertem Peptonwasser über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend auf den Selektivmedien die Anwesenheit der inokulierten HP überprüft. Für die kultivierungsunabhängige Detektion und Quantifizierung der inokulierten Modellstämme wird zunächst mit einer harschen Lyse die Gesamt-DNA aus den Proben extrahiert und in dieser Gesamt-DNA mithilfe spezifischer Primersysteme entsprechende Zielgenfragmente amplifiziert. Dazu wurden publizierte Methoden getestet und wenn nötig angepasst und etabliert. Für die Detektion bzw. Quantifizierung von LT2 in Gesamt-DNA, die aus Bodenproben, Rhizosphäre oder Phyllosphäre isoliert wurde, wurde eine neue TaqMan qPCR entwickelt, die spezifisch für *S. enterica* Serovar Typhimurium ist. Die entwickelten Primer und die TaqMan-Sonde binden im Zielgen STM4497, das spezifisch für den Serovar Typhimurium ist (Kim et al., 2006). Für diese qPCR wurde außerdem der entsprechende Teil des Gens STM4497 kloniert und als Positivkontrolle bzw. als Standard für die Quantifizierung verwendet.

Leider können Experimente, die Faktoren analysieren, die das Überleben des Bakteriums in der Umwelt beeinflussen, selbst wenn sie in ähnlichen experimentellen Anordnungen durchgeführt werden, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Eine mögliche Erklärung ist, dass für diese Experimente die Bakterien unterschiedlich angezogen wurden. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein potentieller Einflussfaktor das Schicksal von HP im Boden, die Präadaption der HP vor dem Eintrag in den Boden ist. Zur Simulation der Präadaption im Labor wurde ein neues Salatmedium (lettuce medium; LM) entwickelt. LT2 wurde in Boden inokuliert, nachdem die Bakterien in nährstoffreichem Luria Bertani (LB) -Medium oder in LM angezogen wurden. Das Überleben von LT2, 14028s und S. Senftenberg wurde mit kultivierungsabhängigen Methoden über 56 Tage verfolgt. Für den Stamm LT2 wurde ein deutlich besseres Überleben nach Präadaption in LM beobachtet als für Bakterien, die in LB angezogen wurden. Dieses Ergebnis wurde für LT2 durch Quantifizierung des Typhimurium-spezifischen Gens STM4497 mittels qPCR in der Gesamt-DNA, die aus den Bodenproben isoliert wurde, bestätigt. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, dass das Medium, das für die Anzucht von Bakterien für Inokulationsexperimente benutzt wird, sehr wichtig für den Ausgang des Experimentes sein kann und daher in zukünftigen Experimenten als möglicher wichtiger Einflussfaktor, der das Schicksal von HP in der Umwelt beeinflusst, berücksichtigt werden sollte.

In Mikrokosmos- und Gewächshausversuchen wurden die Auswirkungen einer Behandlung des Bodens mit Klärschlamm untersucht. Klärschlamm wird als nährstoffreicher Dünger verwendet, der u.a. den Gehalt organischen Materials im Boden verbessert. Die experimentell im Rahmen dieses Projektes untersuchte Hypothese war, dass die Behandlung des Bodens mit Klärschlamm durch die Verfügbarkeit zusätzlicher Nährstoffe das Überleben von HP fördert und dass dadurch die Besiedlung von Pflanzen mit HP begünstigt wird. In Gewächshausexperimenten wurde untersucht, ob die Behandlung des Bodens mit Klärschlamm die Besiedlung von Salatpflanzen mit HP fördert. Der Boden wurde mit LT2 oder *E. coli* O157:H7 in einer Konzentration von 10<sup>6</sup> koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Gramm Boden inokuliert und das Überleben im Boden und in der Rhizosphäre von Salatpflanzen verfolgt sowie die Phyllosphäre der Pflanzen nach 21 und 49 Tagen bezüglich der Präsenz von HP untersucht. Die Anzahl kultivierbarer Salmonellen sank in Boden mit Klärschlamm schneller im Vergleich zum Kontrollboden; in der Rhizosphäre wurde kein Unterschied festgestellt. In der Phyllosphäre der Salatpflanzen wurde LT2 nicht detektiert. Parallel zu kultivierungsabhängigen Methoden wurden kultivierungsunabhängige Methoden verwendet, um Salmonellen im Boden zu quantifizieren. Interessanterweise gab es in diesem Fall zwischen dem behandeltem und dem Kontrollboden keine Unterschiede in der Zielgenkopienzahl. Bei der Quantifizierung mittels qPCR werden auch Zellen im sogenannten VBNC-Zustand erfasst, d.h. Zellen, die lebensfähig sind, aber auf routinemäßig verwendeten Labormedien keine Kolonien bilden (Oliver, 2010). Daher liefern die Beobachtungen einen Hinweis darauf, dass durch Behandlung des Bodens mit Klärschlamm HP im Vergleich zum Kontrollboden vermehrt in den VBNC-Zustand übergehen. Die Ergebnisse weisen also darauf hin, dass entgegen der Hypothese die zusätzlich verfügbaren Nährstoffe durch Behandlung des Bodens mit Klärschlamm das Überleben von HP nicht fördern. Der verstärkte Übergang in den VBNC-Zustand könnte durch Stressfaktoren in Form von Chemikalien, Schadstoffen oder anderen Bestandteilen des Klärschlammes ausgelöst worden sein.

Eine weitere mögliche Erklärung für das verminderte Überleben der HP im Boden nach Klärschlammbehandlung ist der Einfluss mikrobieller Gemeinschaften im Boden, die durch den Klärschlamm verändert werden können. Die Quantifizierung der 16S rRNA-Genkopienzahl in den Bodenproben mit Klärschlamm zeigte gegenüber dem Kontrollboden deutlich erhöhte Kopienzahlen. Daher wurden die bakteriellen Gemeinschaften im Boden mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) und Illumina MiSeq Sequenzierung von 16S rRNA-Genfragmenten untersucht. Der Vergleich der molekularen Fingerabdrücke, basierend auf 16S rRNA-Genfragmenten, die aus der Gesamt-DNA des Bodens amplifiziert wurden, im DGGE zeigte, dass bakterielle Gemeinschaften von Proben des Bodens, der mit Klärschlamm behandelt wurde, sehr unterschiedlich zu denen des Kontrollbodens waren. Fingerabdrücke des Kontrollbodens zeigten eine große Anzahl schwächerer Banden, die darauf hinweisen, dass

es viele vergleichbar abundante Populationen gibt, während Fingerabdrücke des mit Klärschlamm behandelten Bodens eine geringere Anzahl Banden zeigten und einige intensive Banden, was darauf hinweist, dass Populationen mit erhöhter Abundanz vorliegen. Auch die Analyse der bakteriellen Gemeinschaften im Boden mittels Illumina MiSeq Sequenzierung von 16S rRNA Genfragmenten ließ eine langfristige Veränderung der bakteriellen Gemeinschaften aufgrund der Klärschlammbehandlung erkennen. Im Klärschlamm vorhandene Mikroorganismen können besser angepasst bzw. selektiert sein und so ggf. in der Konkurrenz um Lebensraum bzw. um Nährstoffe aus dem Klärschlamm den inokulierten HP überlegen sein. Auch der Eintrag von Antagonisten mit dem Klärschlamm in den Boden ist möglich, wodurch das Überleben der HP vermindert werden kann.

Klärschlamm enthält nicht nur Nährstoffe, sondern auch eine Vielzahl an Schadstoffen wie Schwermetalle, Chemikalien und Antibiotika. Aufgrund des vorliegenden Selektionsdrucks, der verfügbaren Nährstoffe und hoher Zelldichten werden Kläranlagen auch als ‚Hotspots‘ für horizontalen Gentransfer betrachtet, der die Verbreitung von Resistenzgenen vereinfacht (Rizzo et al., 2013). Klärschlamm enthält folglich auch Bakterien, die resistent gegen Schwermetalle oder Antibiotika sind und die entsprechenden Resistenzgene tragen, die auf mobilen genetischen Elementen oder Integrons lokalisiert sein können. Wenn der Klärschlamm als Dünger verwendet wird, gelangen auch die enthaltenen Mikroorganismen und Resistenzgene in die Umwelt, wodurch die Verbreitung von Resistenzen gefördert wird. Auch die Entwicklung resistenter HP ist so möglich, wodurch Behandlungsmöglichkeiten von Infektionen durch Antibiotika eingeschränkt werden. Der Einfluss der Behandlung mit Klärschlamm auf die Häufigkeiten mobiler genetischer Elemente und Resistenzgene im Boden wurde in einem Langzeitexperiment über 119 Tage verfolgt. Dabei wurden qPCR und Hochdurchsatz-qPCR Arrays genutzt, um vorhandene Typen zu identifizieren sowie relative Abundanzen von Antibiotika-Resistenzgenen zu ermitteln. Die Ergebnisse zeigten einen Langzeiteffekt der Klärschlammbehandlung auf Mobilom und Resistom des Bodens.

Daher sollte die Rolle mobiler genetischer Elemente analysiert werden, die sich heute immer deutlicher als Schlüsselemente für die Ausprägung wesentlicher biologischer Eigenschaften von Bakterien erweisen (s. Review Shintani et al. 2015, *Frontiers in Microbiology*). Plasmide, die auf Gammaproteobacteria übertragbar sind, wurden aus Klärschlamm mittels exogener Plasmidisolierung in biparentalen Matings isoliert. 96,3% der isolierten Plasmide gehören zur Inkompatibilitätsgruppe IncP-1 und 95,5% zur  $\epsilon$  Untergruppe.

Zu den im Rahmen des Projektes getesteten Versuchsvarianten gehörte außerdem die Koinokulation von HP mit *Rhizoctonia solani* als Beispiel für einen phytopathogenen Pilz sowie *Meloidogyne hapla* und *Pratylenchus crenatus* als Modelle pflanzenparasitärer Nematoden. Die hierbei untersuchte Hypothese war, dass Phytopathogene Eintrittsstellen für HP in die Pflanzen schaffen können und somit deren Internalisierung ermöglichen bzw. die Häufigkeit der Internalisierung steigern können. Darüber hinaus könnten Phytopathogene auch als Vektoren dienen, in dem sie z.B. an der Oberfläche der Phytopathogene anhaftende HP zur Pflanze transportieren.

In Gewächshausexperimenten wurde untersucht, ob das Vorhandensein von Phytopathogenen im Boden die Internalisierung von HP in die essbaren Teile von Salatpflanzen fördert oder ermöglicht. Dazu wurden die HP in einer Konzentration im Bereich von  $10^6$  KBE/g in den Boden inokuliert und die Salatpflanzen nach 21 und 49 Tagen auf das Vorhandensein von HP in den Blättern untersucht. Zudem wurde das Überleben der HP im Boden und in der Rhizosphäre der Salatpflanzen getestet. Es wurde gezeigt, dass die Nematodengattungen erfolgreich Kopfsalatpflanzen der Sorte Tizian infizieren und sich dort vermehren können. Dies war zuvor für diese Sorte und die verwendeten Nematoden noch nicht bekannt. Die Nematodeninfektion hatte keine Auswirkungen auf das Blattfrischgewicht der Salatpflanzen, und auch für die Anzahl kultivierbarer HP im Boden und in der Rhizosphäre wurde kein Unterschied zwischen Kontrollen und mit Nematoden infizierten Proben gefunden. Da die Nematoden in die Wurzeln eindringen, sich in den Wurzeln bewegen und sich von pflanzlichem Gewebe ernähren,

entstehen Verwundungen, die potentielle Eintrittsstellen für HP bieten. Nach Koinokulation phytopathogener Nematoden mit LT2 oder *E. coli* O157:H7 in den Boden wurden HP in der Rhizosphäre gefunden, es konnte jedoch zu keinem Probenahmezeitpunkt eine Internalisierung der HP in den Blättern der Salatpflanzen festgestellt werden. Ein Grund für diese Beobachtung könnte sein, dass durch die Infektion der Salatpflanzen mit Phytopathogenen Abwehrreaktionen ausgelöst wurden (Manosalva et al., 2015), die auch dem Eindringen von LT2 entgegenwirken.

Da die Fähigkeit zur Biofilmbildung zu einem verbesserten Überleben von HP auf Pflanzen beitragen kann (Yaron und Römling, 2014), wurde die Hypothese, dass verbessertes Überleben im Boden nach Präadaptation durch Salatmedium auf eine verbesserte Fähigkeit zur Biofilmbildung zurückzuführen ist, überprüft. *In vitro* Biofilmassays mit verschiedenen *Salmonella*-Stämmen und *E. coli* O157:H7 zeigten einen stammspezifischen Effekt des Salatmediums auf die Biofilmbildung. Während in Salatmedium die Biofilmbildung von *S. Senftenberg* signifikant erhöht war, zeigte LT2 bessere Biofilmbildung in LB. Dies weist darauf hin, dass das verbesserte Überleben von LT2 nach Präadaptation in LM im Boden nicht auf eine verbesserte Biofilmbildung zurückzuführen ist, sondern wahrscheinlich durch andere Faktoren bedingt ist. Zudem machen diese Ergebnisse deutlich, dass sowohl die Fähigkeit zur Biofilmbildung als auch der Einfluss der Präadaptation auf das Überleben im Boden stammspezifisch ist.

Als Ergebnis der im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Experimente kann festgehalten werden, dass eine Internalisierung von HP unter den getesteten Umweltbedingungen und bei den verwendeten relativ geringen Zellzahlen von LT2 oder *E. coli* O157:H7 unter den untersuchten Bedingungen unwahrscheinlich bzw. selten ist. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte im Gewächshaus keine Internalisierung von LT2 oder *E. coli* O157:H7 in der Phyllosphäre von Kopfsalatpflanzen, die in kontaminierten Böden angezogen worden waren, beobachtet werden. Weder die Behandlung des Bodens mit Klärschlamm noch die Inokulation mit phytopathogenen Nematoden führte zu detektierbarer Besiedlung der Phyllosphäre der Salatpflanzen mit LT2 oder *E. coli* O157:H7. Die Gegenwart der getesteten bakteriellen HP selbst in hohen Zelldichten, wie sie in der Umwelt wahrscheinlich höchstens als punktuelle Kontaminationen auftreten, führt also nicht zwangsweise zu einer Kontamination der Phyllosphäre von Kopfsalat durch Internalisierung über die Wurzeln der Pflanzen, die in kontaminiertem Boden wachsen. Die Experimente zum Überleben der HP im Boden und zur Biofilmbildung sowie zum Einfluss von Präadaptation zeigten zudem, dass verschiedene Stämme sich z.T. deutlich bezüglich ihrer Persistenz unterscheiden können. Es gibt also Hinweise auf stammspezifisches Verhalten. Es konnte ein Langzeitüberleben von LT2 und *E. coli* O157:H7 im Boden in geringer Zelldichte gezeigt werden, wobei LT2 im Vergleich zu *E. coli* O157:H7 besser überlebt. Als wesentliches Ergebnis kann zudem festgehalten werden, dass die Diversität und Abundanz von Mikroorganismen im Boden einen großen Einfluss auf das Schicksal der inokulierten bakteriellen HP hat. Nach Zugabe von Klärschlamm wurde eine erhöhte Anzahl der 16S rRNA-Genkopien pro Gramm Boden im Vergleich zum Kontrollboden gefunden. Außerdem wurde eine deutliche Veränderung der bakteriellen Gemeinschaften im Boden im Hinblick auf die relativen Abundanzen der Populationen festgestellt. Hohe Diversität trägt dazu bei, die Etablierung von neu eindringenden Populationen zu verhindern (Mallon et al., 2015). Eine Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft des Bodens könnte daher ein höheres Risiko der Etablierung von HP bedeuten. Die Möglichkeit der Kontamination von Pflanzen könnte dadurch erhöht sein, konnte jedoch unter den getesteten Bedingungen nicht festgestellt werden. Ein mögliches Risiko der Klärschlammbehandlung liegt daher eher in der Übertragung von Resistenzen beispielweise durch horizontalen Gentransfer.



## Summary

Many details of the ecology of *Salmonella* in the environment of plants are unknown so far. Soil as well as the rhizosphere and phyllosphere of plants are heterogeneous habitats, where conditions can change quickly and the survival of bacterial human pathogens like *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 under these harsh conditions is influenced by many factors. The available literature on colonization of plants by bacterial human pathogens was reviewed before the start of the experimental work. There are many possible ways of colonization of plants with human pathogens and publications show that bacterial human pathogens are able not only to attach to plant surfaces but also to colonize the internal tissues of plants (internalization). Many biotic and abiotic factors influence the fate of human pathogens in the environment and they could not be clearly identified and evaluated in the studies published so far. Further investigation and better understanding of these factors are therefore essential to evaluate a potential risk of colonization of crop plants with human pathogenic bacteria. Among the factors which are known to influence human pathogens are temperature, pH and water availability (Santamaría and Toranzos, 2003; Jacobsen and Bech, 2012). Besides environmental factors, the fate of human pathogens is affected by the plant species-, cultivar- and soil type-dependent composition and diversity of microbial communities (Dingman, 2000; Berg and Smalla, 2009; Kroupitski et al., 2009; Barak et al., 2011; Quilliam et al., 2012; Schikora et al., 2012b; Leff and Fierer, 2013). It is also possible that several factors influence the fate of human pathogens simultaneously, and that these factors can influence each other which could lead to increased risk of contamination of plants.

In order to better understand the survival of bacterial human pathogens in the environment, factors which could potentially influence human pathogens were identified according to the literature and their influence was analyzed in microcosm and greenhouse experiments within the scope of this project. Microcosm and greenhouse experiments (S2 conditions) were conducted to analyze the influence of these factors on the survival of human pathogens and the possible colonization of plants under defined experimental conditions. *Lactuca sativa* cv. Tizian was used as a model plant, the soil analyzed was diluvial sand and the bacterial human pathogens analyzed were *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 (hereinafter called LT2), *S. Typhimurium* 14028s (called 14028), *S. enterica* serovar Senftenberg and *E. coli* O157:H7 as model strains.

In order to monitor the fate and enable quantification of the inoculated bacteria in the habitats soil, rhizosphere and phyllosphere, specific cultivation-dependent and -independent methods are required. Therefore, rifampicin resistant mutants of the model strains were prepared, which can be selectively cultivated on rifampicin-containing media. For cultivation-dependent detection and quantification, dilution series of samples were prepared and cultivated on appropriate selective media. For samples with low numbers of cultivable bacteria, an enrichment step was included before plating. For enrichment, samples were 1:10 diluted in buffered peptone water, incubated over night at 37°C and subsequently incubated on selective medium to check for the presence of the inoculated human pathogens. For cultivation-independent detection and quantification, total community DNA was extracted from samples including a harsh lysis step. Target gene fragments were amplified from total community DNA using specific primer systems. Published methods for detection and quantification of human pathogens in environmental samples or DNA extracted from those samples were tested and where necessary adjusted and established. For detection and quantification of LT2 in total community DNA extracted from soil, rhizosphere or phyllosphere samples, a new TaqMan qPCR assay was developed, which is specific for *S. Typhimurium*. The developed primers and the TaqMan probe bind to the target gene STM4497 which is specific for the serovar Typhimurium (Kim et al., 2006). For this qPCR, the corresponding part of the gene was cloned and used as positive control or as a standard for quantification, respectively.



Unfortunately, experiments analyzing factors that influence the survival in the environment can lead to different outcomes even when conducted in similar experimental setups. A possible explanation for this could be that bacteria used for these experiments were grown under different conditions. Therefore, we hypothesized, that one of the factors which potentially affects the fate of human pathogens in soil is the preadaptation before introduction into the respective environment. In order to analyze how preadaptation affects the survival of *Salmonella* in the environment and their colonization of plants, a novel lettuce medium was developed to simulate preadaptation in the laboratory. *Salmonella* was inoculated into soil, after bacteria were grown in nutrient-rich Luria Bertani (LB) broth or in lettuce medium (LM). The survival of LT2, *S. Typhimurium* 14028s and *S. enterica* serovar Senftenberg was monitored over 56 days using cultivation-dependent methods. Significantly better survival was observed for LT2 after preadaptation in lettuce medium compared to the bacteria that were grown in LB while there were no differences observed for the other two *Salmonella* strains analyzed. This result was confirmed for LT2 by quantification of the Typhimurium-specific gene STM4497 by qPCR in total community DNA isolated from soil samples. The result of this experiment demonstrated that the medium used for growth of the inoculum can be important for the outcome of the experiment. It should therefore be considered in future experiments as a potentially important factor influencing the fate of human pathogens in the environment.

The effects of treatment of soil with sewage sludge were analyzed in microcosm and greenhouse experiments. Sewage sludge is used as a nutrient-rich fertilizer which can improve the nutrient and organic matter content of soil. The hypothesis tested within the scope of this project was that the treatment of soil with sewage sludge would foster the survival of human pathogens due to the additional nutrients available and that this would favor colonization of plants with human pathogens. In greenhouse experiments it was analyzed whether treatment of soil with sewage sludge would lead to colonization of plants with human pathogens. The soil was inoculated with LT2 or *E. coli* O157:H7 in a final concentration of 10<sup>6</sup> colony forming units per gram of soil. Survival in soil as well as in the rhizosphere of lettuce plants was monitored and presence of the inoculated bacteria in the phyllosphere of lettuce plants was examined after 21 and 49 days. Numbers of cultivable LT2 decreased faster in soil treated with sewage sludge compared to untreated soil while no difference was observed in the rhizosphere. No LT2 were detected in any of the samples in the phyllosphere. In parallel with cultivation-dependent methods, cultivation-independent methods were used to quantify LT2 in soil. Interestingly, no differences in target gene copy numbers were found between samples of soil treated with sewage sludge and control soil samples. Quantification of bacteria using qPCR includes also cells in the vbnc state which are viable but noncultivable and do not form colonies on routinely used laboratory media (Oliver, 2010). Thus, observations indicate that the treatment of soil with sewage sludge increased numbers of cells that enter the vbnc state compared to control soil. The results indicated therefore, that opposite to the hypothesis, the treatment of soil with sewage sludge did not foster the survival of human pathogens due to additional nutrients introduced into the soil but rather decreases the numbers of cultivable cells and cells enter the vbnc state – probably because they are exposed to stress. This stress could be caused by chemicals, pollutants or other components of sewage sludge.

Another possible explanation for the observed reduced survival of human pathogens in soil after treatment with sewage sludge is the influence of soil microbial communities which can be altered due to sewage sludge treatment. Quantification of 16S rRNA gene copy numbers in soil with sewage sludge and control soil showed that after addition of sewage sludge the 16S rDNA gene copy numbers per gram of soil were significantly enhanced compared to control soil. Bacterial communities were analyzed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and Illumina MiSeq sequencing of 16S rRNA gene fragments. Comparison of molecular fingerprints in a DGGE gel based on 16S rRNA gene fragments that were amplified from total community DNA showed that the bacterial communities of soil with sewage sludge were completely different from bacterial communities in control soil. Fingerprints of control soil showed a high number of fainter bands which indicate many populations with

comparable abundance. Meanwhile, fingerprints of soil treated with sewage sludge showed fewer bands and some stronger bands indicating presence of populations with increased abundance. Analysis of bacterial communities in soil in samples 0, 14 and 119 days after sewage sludge treatment using Illumina MiSeq sequencing of 16S rRNA gene fragments demonstrated prolonged changes of bacterial communities due to sewage sludge treatment. Changes of bacterial community composition and abundances of populations in soil after addition of sewage sludge could lead to increased competition in soil or in the rhizosphere of plants grown in this soil. Microorganisms in sewage sludge could be better equipped for competition for space or nutrients from sewage sludge compared to the inoculated human pathogens. Also the introduction of antagonists with sewage sludge into soil is possible and could decrease survival of human pathogens.

Sewage sludge does not only contain nutrients, but also pollutants like heavy metals, chemicals and antibiotics. Because of selection pressure, available nutrients and high cell densities, wastewater treatment plant are considered hotspots of horizontal gene transfer which facilitate spread of resistance genes (Rizzo et al., 2013). Sewage sludge consequently also contains bacteria which are resistant to heavy metals and antibiotics and carry the respective resistance genes. These genes can be located on mobile genetic elements or integrons. When sewage sludge is used as a fertilizer, also the contained microorganisms are introduced into the environment which fosters spread of resistances. The development of multi-resistances is possible as well which reduces the therapeutic potential of antibiotics to treat infections. The influence of sewage sludge treatment on the abundances of mobile genetic elements and resistance genes in soil was analyzed in a long term experiment over 119 days. TaqMan qPCR and high throughput-qPCR arrays were used to identify types of mobile genetic elements and resistance genes present as well as their abundances over the course of the experiment and compared to control soil. Results showed a prolonged effect of sewage sludge treatment on mobilome and resistome of soil. Sewage sludge contains a multitude of resistant bacteria, resistance genes and mobile genetic elements which are potentially transferable to bacterial human pathogens and they are introduced into the environment via sludge. Therefore the role of mobile genetic elements which are more and more recognized as key determinants for substantial properties of bacteria should be further investigated (see review Shintani et al. 2015, *Frontiers in Microbiology*). Plasmids which are transferable to Gammaproteobacteria were isolated from sewage sludge using exogenous plasmid isolation in biparental matings. 96.3% of the isolated plasmids belonged to the broad host range incompatibility group IncP-1 and 95.5% to the  $\epsilon$  subgroup.

Among the experimental variants tested within the scope of this project was the coinoculation of human pathogens with *Rhizoctonia solani* as an example for a phytopathogenic fungus as well as *Meloidogyne hapla* and *Pratylenchus crenatus* as examples for phytoparasitic nematodes. The hypothesis analyzed was that phytopathogens can provide entry sites for human pathogens to get into the plant tissue and consequently enable internalization or increase the frequency of internalization respectively. Besides, phytopathogens could also serve as vectors which can transport bacteria attached to their surface towards the plant.

In greenhouse experiments it was analyzed whether the presence of phytopathogens fosters or allows the internalization of human pathogens into the edible parts of lettuce plants. For this purpose the human pathogens were inoculated at a final concentration of  $10^6$  colony forming units per gram of soil and lettuce plants were checked for presence of human pathogens after 21 and 49 days. Furthermore, the survival of LT2 in soil and in the rhizosphere of the lettuce plants was monitored. It was shown that the nematode species which were chosen for these experiments successfully infected lettuce plants and were able to proliferate inside the plant tissue. The nematode infection did not have an impact on leaf fresh mass of lettuce plants and no differences in numbers of cultivable LT2 in soil or in the rhizosphere were found between controls and samples inoculated with nematodes. As the nematodes enter into the roots, move inside the roots and feed on plant tissue, wounds occur which provide potential entry sites. LT2 were found in the rhizosphere of lettuce plants after co-inoculation of phytopathogen-

ic nematodes, but at none of the sampling time points internalization of LT2 into lettuce leaves was detected. One possible explanation for this observation could be that infection with nematodes triggered defense responses of the plant (Manosalva et al., 2015), which counteracted entry of human pathogens.

Because biofilm formation can contribute to enhanced survival of HP on plants (Yaron and Römling, 2014), we hypothesized that enhanced survival in soil after preadaption in LM could be due to increased ability to form biofilms. *In vitro* biofilm assays with a set of different *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 showed a strain specific effect of LM on biofilm formation. While biofilm formation of *S. Senftenberg* was significantly enhanced in LM, LT2 showed better biofilm formation in LB. This indicates that increased survival of LT2 after preadaptation in lettuce medium was most likely not due to increased ability of biofilm formation but rather caused by different factors. Furthermore, these results indicated that the ability to form biofilms as well as the influence of preadaptation on survival in soil is strain specific.

From the experiments conducted within the frame of this project, it can be concluded, that internalization of human pathogens into the edible parts of lettuce plants under the tested environmental conditions is rather unlikely or rare. Under the experimental conditions tested, no internalization of LT2 or *E. coli* O157:H7 was detected in the phyllosphere of lettuce plants that were grown in contaminated soil. Neither the treatment of soil with sewage sludge, nor the inoculation of phytopathogenic nematodes led to detectable colonization of the phyllosphere of lettuce plants with LT2 or *E. coli* O157:H7. Presence of the tested human pathogens even at high cell densities which are likely to be found in the environment only as point contaminations does therefore not necessarily lead to contamination of the phyllosphere of lettuce plants through internalization via the roots of plants grown in contaminated soil. The experiments analyzing the survival of HP in soil and the influence of preadaptation on survival showed furthermore, that different strains can behave completely different with respect to their persistence. Hence there are indications for strain specific behavior. A long term survival of LT2 and *E. coli* O157:H7 in soil at low numbers was demonstrated and LT2 survived better compared to *E. coli* O157:H7. Increased numbers of 16S rRNA gene copies were found after addition of sewage sludge, compared to control soil as well as significant changes of the bacterial community in soil. This can result in increased competition for available nutrients in soil as well as possibly antagonism. High diversity contributes to prevention of establishment of invading populations (Mallon et al., 2015). Treatment of soil with sewage sludge results in decreased diversity of the bacterial population of soil which could represent an increased risk of establishment of introduced bacterial human pathogens. The possibility of contamination of plants could therefore be increased after addition of sewage sludge to soil but contamination of plant phyllosphere samples was not detected under the tested conditions. A potential risk of sewage sludge application is hence probably rather the transfer and spread of resistances for example by horizontal gene transfer.

## 1 Einleitung

Mit der Nahrung aufgenommene humanpathogene Enterobakterien, wie zum Beispiel pathogene *E. coli*-Stämme, *S. enterica* und *Listeria monocytogenes* können Krankheiten beim Menschen verursachen. Pflanzliche Lebensmittel, die typischerweise roh verzehrt werden, sind als Auslöser für Erkrankungen seit dem Ausbruchsgeschehen mit dem *E. coli*-Stamm O104:H4 im Mai 2011 in Deutschland in die Wahrnehmung der breiten Öffentlichkeit gelangt und es gibt zunehmend Berichte über lebensmittelbedingte Infektionen. Kontaminationen von Frischeprodukten mit HP können entlang der gesamten Produktionskette auftreten; u.a. auf dem Feld z.B. über den Boden, kontaminiertes Beregnungswasser, Verfrachtung von kontaminierten Partikeln durch Wind oder organische Dünger, wie Klärschlamm. Das Wissen über Faktoren, welche die Persistenz von HP in der pflanzlichen Umwelt beeinflussen, ist jedoch begrenzt. Ziel der Forschung ist es, die Verbreitung von HP und die Faktoren, die das Überleben von HP im Boden oder die Etablierung von HP an Pflanzen beeinflussen, besser zu verstehen. Solche Faktoren können z.B. die Gegenwart nährstoffreicher Dünger wie Klärschlamm, Präadaption von HP, die Fähigkeit zur Biofilmbildung oder das Vorhandensein von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden sein. Erkenntnisse zum Einfluss bestimmter Faktoren sollen es ermöglichen, Bedingungen zu vermeiden, die den Eintrag von bakteriellen HP, ihr Überleben oder die Internalisierung von HP in Pflanzen begünstigen, um lebensmittelbedingte Ausbrüche zu verhindern bzw. zu reduzieren.

Klärschlamm verbleibt als nährstoffreicher fester Rückstand nach der Behandlung von Abwasser in Kläranlagen. Klärschlamm wird u.a. als Dünger für landwirtschaftliche Böden verwendet. Bodeneigenschaften, wie der Gehalt organischen Materials, pH-Wert, Porosität und Wasserhaltekapazität können hierdurch verbessert werden. Außerdem können für das Pflanzenwachstum wichtige Nährstoffe wie Phosphor, Stickstoff und Spurenelemente recycelt werden. Die Verwendung von Klärschlamm als Dünger in der Landwirtschaft birgt allerdings auch einige Risiken. Neben wertvollen Nährstoffen sind auch Schadstoffe, wie Schwermetalle im Klärschlamm enthalten, die oft die Anwendung in der Landwirtschaft einschränken. Abhängig vom Ursprung des Abwassers, kann der Klärschlamm auch giftige Stoffe, Medikamente oder Antibiotika enthalten (Clarke und Smith, 2011).

In Kläranlagen befindet sich außerdem eine Vielzahl von Mikroorganismen, die resistent gegen die im Abwasser bzw. im Klärschlamm enthaltenen Stoffe sind oder unter dem Selektionsdruck werden können. Kläranlagen stellen ideale Bedingungen für die Verbreitung von Resistenzen dar und werden auch als ‚Hotspot‘ für horizontalen Gentransfer bezeichnet, da neben der Verfügbarkeit von ausreichend Nährstoffen, enger Kontakt zwischen Mikroorganismen sowie diverse Selektionsdrücke durch Chemikalien, Metallverbindungen oder Antibiotika vorhanden sind. Bakterien können durch die Aufnahme von Resistenzgenen über horizontalen Gentransfer von mobilen genetischen Elementen, wie Plasmiden mit Integrons, Transposons oder Insertionssequenzen resistent gegen Antibiotika und Schadstoffe werden. (Rizzo et al., 2013). Bei der Ausbringung von Klärschlamm gelangen nicht nur Schwermetallverbindungen und Chemikalien in den Boden, sondern auch Mikroorganismen und mit ihnen Resistenzgene und mobile genetische Elemente. Dies führt zu Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden sowie auch des Mobiloms und Resistoms. Die Ausbringung von Klärschlamm stellt somit einen Eintragungsweg für Bakterien mit transferablen Resistenzen in mikrobielle Gemeinschaften von Böden dar und kann so zur Verbreitung von Resistenzgenen und resistenten Bakterien in der Umwelt beitragen. Inwieweit Klärschlamm das Überleben von Salmonellen im Boden durch seine hohen Nährstoffmengen oder enthaltene mobile genetische Elemente, die die Resistenz gegen vielfältige Umweltstressfaktoren erhöhen oder zu einer verbesserten Biofilmbildung führen, befördert, sollte im Rahmen dieses Projekts untersucht werden.

## Projektziele

Ziel dieses Projekts war die Analyse des Überlebens von verschiedenen bakteriellen HP in Boden. Dabei sollten der Einfluss von Klärschlamm (organischer Dünger) analysiert und die Aufnahme von HP aus Boden über die Pflanzenwurzel unter verschiedenen Bedingungen erforscht werden.

Folgende Faktoren, die potentiell die Persistenz von HP in der pflanzlichen Umwelt allgemein beeinflussen, wurden berücksichtigt:

- ▶ Klärschlamm als organischer Dünger im Boden
- ▶ Präadaptierte HP durch Anzucht auf Salatmedium
- ▶ Gegenwart des phytopathogenen Pilzes *Rhizoctonia solani* und Schaderregern (Nematoden) im Boden
- ▶ Mobile genetische Elemente und Resistenzgene u.a. aus Klärschlamm
- ▶ Unterschiedliche genetische Ausstattungen verschiedener HP-Stämme
- ▶ Fähigkeit zur Biofilmbildung

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Anheftung, Etablierung und möglichen Vermehrung der bakteriellen HP an und in Kulturpflanzen. Dabei sollten Verteilung und Ausmaß einer Besiedlung bzw. das epi- oder endophytische Überleben HP untersucht und die HP in der Pflanze lokalisiert werden. Zunächst war es aber das Ziel des Projekts, benötigte Detektionsmethoden zur kultivierungsabhängigen und -unabhängigen Detektion und Quantifizierung der verschiedenen HP im Boden und in Pflanzen zu etablieren.



## 2 Literaturstudie zum Vorkommen und Überleben von humanpathogenen Enterobakterien in verschiedenen Umwelthabitaten

Zu Beginn des Projekts wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, deren Ergebnis als Re-view im Journal für Kulturpflanzen veröffentlicht ist (Fornefeld et al., 2015). In dem Übersichtsartikel sind Informationen zu Kontaminationswegen, Einflussfaktoren auf das Überleben von *Salmonella* und pathogenen *E. coli* sowie zur Rolle mobiler genetischer Elemente zusammengetragen. Zudem werden die vorliegenden Daten zur Anhaftung, Internalisierung und die Rolle des Typ-III-Sekretionssystems sowie zur Antwort der Pflanze zusammengefasst und Methoden zur Detektion und Quantifizierung von HP in Umweltproben vorgestellt.

Um zu vermeiden, dass HP auf Pflanzen gelangen, wodurch es bei Rohverzehr zu Krankheitsausbrüchen kommen kann, müssen die Faktoren, die das Überleben dieser Erreger in der Umwelt beeinflussen, besser verstanden werden. Es sind bereits viele Studien zu diesem Thema durchgeführt worden, und es wurden zahlreiche, das Überleben beeinflussende abiotische und biotische Faktoren identifiziert. Einer dieser Faktoren ist die Temperatur. Beispielsweise überlebt *E. coli* umso besser in Wasser, je wärmer das Wasser ist (Vital et al., 2008). Dagegen überlebt *E. coli* O157:H7 in Gülle besser umso kühler es ist (Semenov et al., 2007). Feuchtigkeit begünstigt das Überleben, da die Fortbewegung von Bakterien vereinfacht wird. Auch der Bodentyp bzw. seine Textur wirkt sich aus. Sandige Böden können nur geringe Mengen Wasser speichern. Ton- oder lehmhaltige Böden ermöglichen die Adsorption von Mikroorganismen an Bodenpartikel und erhöhen dadurch die Überlebensfähigkeit. Der pH-Wert der Umgebung beeinflusst die Adsorption, was dazu führt, dass Inaktivierungsraten in sauren Böden geringer sind. Erhöhte Konzentrationen von Kationen führen zu höheren Adsorptionsraten. Von den in der Umwelt verfügbaren Nährstoffen kann nur ein Teil von Enterobakterien verwertet werden. Daher fördern Gülle, Pflanzen und Pflanzenreste durch die zusätzlich bereitgestellten Nährstoffe das Überleben und möglicherweise das Wachstum. Sonnenlicht bzw. UV-Strahlung hat letale Wirkung auf die meisten Mikroorganismen und belastet die Bakterien, die sich auf der Bodenoberfläche befinden. Tiefere Schichten sind nicht betroffen (Santamaría und Toranzos, 2003). Auch biotische Faktoren beeinflussen das Überleben von HP. So wurde z.B. in Gegenwart von Pflanzenpathogenen verstärkte Kolonisierung von Pflanzen durch HP gefunden (Ge et al., 2014; Simko et al., 2015). Andererseits besteht aber auch Konkurrenz mit der vorhandenen Mikroflora um Ressourcen; d.h. HP können von besser angepassten Organismen verdrängt werden. Pilze können als Vektoren für Enterobakterien auf bzw. in Pflanzen dienen (Cooley et al., 2003; Brandl, 2006).

Die Fitness von HP auf Pflanzen wird von ähnlichen Faktoren beeinflusst wie ihre Fitness in der Umwelt. Die Verfügbarkeit von Nährstoffen, UV-Strahlung, Konkurrenz bzw. Verdrängung durch vorhandene Mikroflora, toxische Substanzen, die von der Pflanze freigesetzt werden, Trockenstress und sich verändernde physikochemische Bedingungen spielen eine Rolle (Aruscavage et al., 2006; Brandl, 2006). Das Schicksal von HP auf Pflanzen wird außerdem beeinflusst durch Chemotaxis, Beweglichkeit und Quorum Sensing (Cooley et al., 2003; Kroupitski et al., 2009). Mithilfe von Flagellen und Fimbrien können sich die Bakterien an Pflanzen anheften (Berger et al., 2010). Die Aggregation und Bildung von Biofilmen erfolgt meist am Ansatz von Trichomen, um Stomata oder an Blattadern entlang, da dort die Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen am größten ist (Brandl und Mandrell, 2002). Internalisierung erfolgt über Wunden, Stomata oder andere Öffnungen (Solomon et al., 2002; Cooley et al., 2003; Kroupitski et al., 2009). Wunden können mechanisch oder durch Pflanzenpathogene verursacht werden. Sie können zudem durch das Freisetzen von Nährstoffen das Wachstum der Pathogene fördern (Dingman, 2000). Die Internalisierung ist ein aktiver Prozess, der auf der Fortbewegung mithilfe von Flagellen beruht (Cooley et al., 2003).

Epiphytische Bakterien und pathogene Enterobakterien haben gemeinsame Eigenschaften, wie die Fähigkeit des Anhaftens an Oberflächen, den Sigmafaktor RpoS, der eine Rolle bei der Anpassung an

Nährstoffmangel und andere Arten von Stress spielt, die Produktion von Zellulose, die für Biofilmbildung benötigt wird und UV-Toleranz, die wichtig für das Überleben auf den Oberflächen von Pflanzen ist. Außerdem ist bei beiden ein Typ-III-Sekretionssystem vorhanden, und das Muster der Kolonisierung von Pflanzen ist vergleichbar (Brandl, 2006).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es bereits eine Reihe von Untersuchungen zum Schicksal von HP in der Umwelt, im Boden und auf Pflanzen sowie zu den Faktoren, die dies beeinflussen, gibt. Welche Faktoren die Internalisierung von HP in Pflanzen beeinflussen, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Das Vorhandensein von Plasmiden ist möglicherweise ein solcher Einflussfaktor. Da es bereits viele Publikationen zur Kontamination von Kulturpflanzen durch Beregnungswasser gibt, sollte in diesem Projekt der Fokus auf die Untersuchung des Kolonisierungswegs über den Boden und die Wurzel gelegt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Auswahl und Herkunft der Bakterienstämme sowie Herstellung Rifampicin-resistenter Mutanten

Für die Experimente mit *E. coli* O157:H7 wurde der Stamm DSM 17076 ausgewählt, der keine Shiga-Toxine produziert und daher zur Risikogruppe 2 gehört. Bei den Arbeiten mit *S. Typhimurium* wurde der Stamm DSM 18522 verwendet, bei dem es sich um den Laborstamm LT2 handelt, der ebenfalls zur Risikogruppe 2 gehört (Abbildung 1). Beide Stämme wurden bei der DSMZ bestellt.

Abbildung 1 Modellstamm LT2 auf *Salmonella*-Chromo-Agar.

---



Des Weiteren wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Adam Schikora und einem neuem vom BMEL geförderten Forschungsprojekt vergleichend zu LT2 die Stämme 14028s sowie Deletionsmutanten dieses Stamms verwendet. Außerdem wurden *S. Senftenberg*, *S. enterica* Serovar Münster und *S. enterica* Serovar Brunei verwendet, die von Dr. Nicola Holden (The James Hutton Institute, Dundee, Scotland UK) und Prof. John Coia (Scottish Reference Centre for *Salmonella*, Glasgow, Scotland, UK) zur Verfügung gestellt wurden.

Zur Herstellung Rifampicin-resistenter Mutanten wurde eine Übernachtskultur des entsprechenden Stamms auf Rifampicin-haltigem Medium (50 mg L<sup>-1</sup>) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Spontan resistente Kolonien wurde zur Bestätigung der Resistenz auf Rifampicin-haltiges Medium überimpft.

### 3.2 Kopfsalat als Modellpflanze

Für die Gewächshausexperimente wurde exemplarisch der Kopfsalat *Lactuca sativa* var. capitata Sorte 'Tizian' als Modellpflanze verwendet. Kopfsalat wurde ausgewählt, da er mit einem jährlichen weltweiten Konsum von etwa 25 Mio t zu den in großen Mengen roh verzehrten Lebensmitteln gehört. Außerdem wurde die mikrobielle Gemeinschaft der Phyllosphäre von Kopfsalat bereits mittels Amplicon- und Metagenomsequenzierung untersucht, und dabei zeigte sich, dass ein hoher Anteil Enterobakterien, zu denen auch *E. coli* gehört, in der Phyllosphäre von Salat vorkommt (Erlacher et al., 2014). Der Salat wurde in Multitopfplatten ausgesät (Abbildung 2) und für die Mikrokosmosexperimente in größere Töpfe umgepflanzt.



Abbildung 2 Anzucht der Modellpflanze Kopfsalat *Lactuca sativa* cv Tizian im Gewächshaus.



### 3.3 DS-Boden für Mikrokosmos- und Gewächshausexperimente

Es wurde diluvialer Sand aus Großbeeren (52° 33' N, 13° 22' E) mit einem Tonanteil von 5,5% verwendet (Rühlmann und Ruppel, 2005). Der Boden wurde gesiebt (2 mm) und der Wassergehalt auf 50% der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt. Dies entspricht 112 mL Wasser pro Kilogramm Boden (Schreiter et al., 2014).

### 3.4 Ablauf der Probenahmen (Mikrokosmos- und Gewächshausversuche)

Für Mikrokosmosexperimente wurden die Bodenproben gründlich gemischt und jeweils eine repräsentative Probe für kultivierungsabhängige bzw. kultivierungsunabhängige Analysen entnommen, aus denen mit einer harschen Lyse (s. 3.6) die Gesamt-DNA isoliert wurde (Abbildung 3). Das Überleben von HP im Boden wurde mithilfe kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Methoden verfolgt.

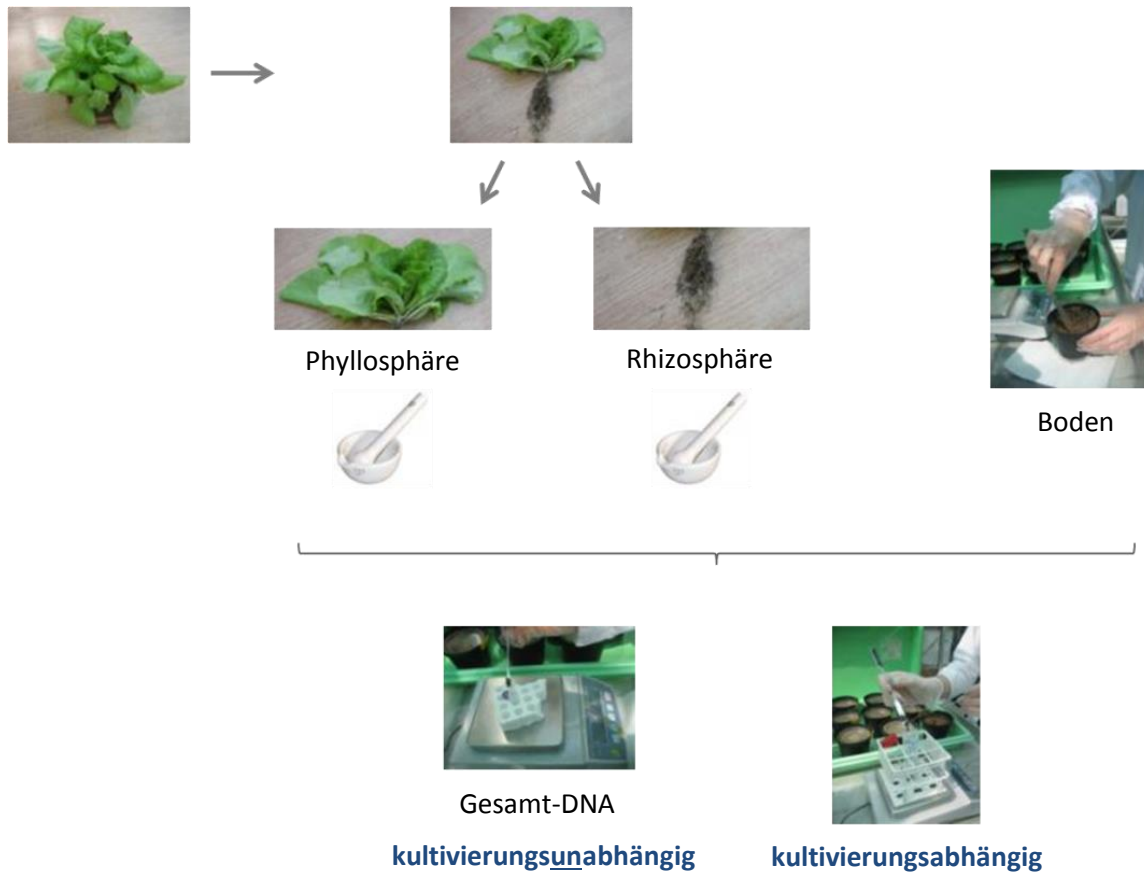
Abbildung 3 Schematischer Ablauf der Probenahmen bei Mikrokosmosversuchen.



Bei Gewächshausversuchen, in denen auch die mögliche Besiedelung von Kopfsalatpflanzen analysiert wurde, wurden bei der Probenahme Phyllosphärenproben (Blätter), Rhizosphärenproben (Wurzeln) und Bodenproben entnommen (Abbildung 4). Die Proben wurden jeweils gründlich homogenisiert

bzw. gemischt und jeweils eine repräsentative Probe für kultivierungsabhängige bzw. kultivierungsunabhängige Analysen entnommen. Der Nachweis von HP in den verschiedenen Pflanzenkompartimenten erfolgte ebenfalls mithilfe kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Methoden.

Abbildung 4 Schematische Darstellung der Probenahme bei Gewächshausversuchen.



### 3.5 Selektive Kultivierung und Anreicherung zum kultivierungsabhängigen Nachweis von Humanpathogenen

Zur selektiven Kultivierung der bakteriellen HP wurden Rifampicin-haltige Medien genutzt, die nur das Wachstum von Rifampicin-resistenten Bakterien ermöglichten. Aus der Anzahl gewachsener Kolonien wurde die Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) in der Ausgangsprobe berechnet. Für Proben, bei denen die KBE-Zahl der HP zu gering war, um quantifiziert zu werden, wurde ein Anreicherungsschritt durchgeführt. Dazu wurden die Proben 1:10 in gepuffertem Peptonwasser (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) verdünnt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.6 Extraktion der Gesamt-DNA aus Umweltproben

Die Extraktion der Gesamt-DNA aus Blatt-, Wurzel- und Bodenproben erfolgte mittels ‚FastDNA Spin Kit for Soil‘ (MP Biomedicals, Heidelberg). Diese Präparationen können Substanzen aus dem Boden enthalten, die sich inhibierend in PCR Reaktionen auswirken. Um festzustellen, ob eine weitere Aufreinigung und/oder Verdünnung der Proben notwendig ist, wurde mit einem Satz teils aufgereinigter

und verschieden stark verdünnter DNA-Proben eine 16S rRNA-Gen spezifische qPCR durchgeführt. Dabei lieferte die Variante Aufreinigung (GENECLEAN SPIN Kit, MP Biomedicals, Heidelberg) mit anschließender 1:5 Verdünnung der Proben das beste Ergebnis. Diese wurde für alle weiteren Arbeiten verwendet.

### **3.7 Quantitative Real-time PCR**

#### **3.7.1 Quantifizierung von Humanpathogenen**

Die Detektion und die Quantifizierung der Modellstämme erfolgte mittels quantitativer Real-time PCR (qPCR) ausgehend von Gesamt-DNA, die aus Boden-, Rhizosphären- und Phyllosphärenproben isoliert wurde. Zu Beginn des Projekts wurde zunächst eine Literaturrecherche durchgeführt; bereits publizierte Detektionssysteme wurden getestet. Für die Quantifizierung von *S. enterica* Typhimurium wurde ein qPCR-System entwickelt. Als Target wurde das für den Serovar Typhimurium spezifische Gen STM4497 (Kim et al., 2006) ausgewählt und qPCR-Primer mit passender TaqMan-Sonde mithilfe der Software CLC Main Workbench 7 (CLC bio, Aarhus, Denmark) für einen Bereich dieses Gens entwickelt (LT2-F: GTCAAATAACCCACGTTCA, LT2-R: TCTCAAAAACAACGGCTC LT2-PR: FAM-TCGCGCACCTCAACATCT-TAMRA). Die Methode der qPCR wurde außerdem zur Quantifizierung von mobilen genetischen Elementen und Resistenzgenen genutzt sowie als Real-time PCR zur Charakterisierung potentieller Transkonjuganten und Isolate.

#### **3.7.2 Quantifizierung von mobilen genetischen Elementen und Resistenzgenen**

Die Quantifizierung von mobilen genetischen Elementen und Resistenzgenen in Umweltproben erfolgte mittels qPCR ausgehend von isolierter Gesamt-DNA. Dazu wurden die in Tabelle 1 zusammengefassten Primersysteme verwendet.

Tabelle 1 Primer und TaqMan-Sonden zur Quantifizierung von mobilen genetischen Elementen und Resistenzgenen in Umweltproben mittels qPCR.

Target	Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	TaqMan-Sonde	Referenz
16S	<i>rrn</i>	cggtgaatacgttccygg	ggwtaccttggtacgactt	ctgttacacaccgccgctc	Suzuki et al., 2000
Klasse-I-Integrans	<i>int11</i>	gccttgatgttaccgagag	gatcggtcgaatgcgtgt	attcctggccgtgggtctgggttt	Barraud et al., 2010
IncP-1 Plasmide	<i>korB</i>	tcatcgacaacgactacaacg tcgtggataacgactacaacg	ttcttcttgcccttcgccag tlyttcytgcccttgccag ttcttgactcccttcgccag	tsaggtcgttgcttgccaggttcaat tcagytcrttgcytgccaggttctcvat	Jechalke et al., 2013a
LowGC-Plasmide	<i>traN</i>	gcttggcggtcagcaatt	ttaggaataacaatcgctacacctttac	cttctggctgctccgacacgaagc	Heuer et al., 2009
Resistenz gegen quaternäre Ammoniumverbindungen	<i>qacE</i>	cgcatTTTTTTTcttctctggtt	cccgaccagactgcataagc	tgaaatccatccctgctggtgt	Jechalke et al., 2013b
Streptomycinresistenz	<i>aadA</i>	ttgatttgctgggtactgtg	cttagtgatctgccttt	tggtaggtccagcggcggag	Walsh et al., 2011
Streptomycinresistenz	<i>strA</i>	tcaatcccgacttcttaccg	caccatggcaacaaccata	tgctcgaccaagagcggc	Walsh et al., 2011
Tetracyclinresistenz	<i>tet(A)</i>	ccgcgcttgggtcatt	tggtcgcgtcccagtg	tcggcgaggatcg	Guarddon et al., 2011
Tetracyclinresistenz	<i>tet(M)</i>	ggtttctcttgataactaaatcaatcr	ccaaccatayaatccttggtcrc	atgcagttatggargggatacgtatggy	Peak et al., 2007
Tetracyclinresistenz	<i>tet(W)</i>	gcagagcgtgggtcagctc	gacaccgtctgcttgatgataat	ttcgggataagctctccgccga	Smith et al., 2004

### **3.8 Nachweis von Humanpathogenen mittels PCR und anschließender Southern Blot-Hybridisierung**

Für HP in geringer Abundanz erfolgte die Detektion mittels PCR-Amplifikation aus Gesamt-DNA oder durch PCR kombiniert mit vorheriger Anreicherungskultur. Anschließend wurden Digoxigenin-markierte Sonden zur Hybridisierung verwendet, wodurch die Empfindlichkeit erhöht wird und ein spezifischer Nachweis möglich ist. Für die Detektion der Modellstämme wurden entsprechende spezifische Digoxigenin-markierte Sonden hergestellt. Die PCR-basierten Detektionsmethoden wurden nach der Etablierung routinemäßig zur Detektion und Quantifizierung der Humanpathogen-Modellstämme in den Proben verwendet.

### **3.9 Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften mittels DGGE-Fingerprints von 16S rRNA Genfragmenten**

Mittels der Methode der Denaturierungsgradientengelelektrophorese (DGGE) können DNA-Fragmente gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz voneinander getrennt werden. Mit Hilfe eines linear ansteigenden Gradienten der DNA-Denaturierungsmittel Formamid und Harnstoff können die DNA-Fragmente entsprechend ihres Schmelzverhaltens und ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten aufgetrennt werden. Die GC-Klammer, die in der PCR angefügt wird, verhindert, dass die beiden DNA-Stränge vollständig in Einzelstränge dissoziieren. Dadurch werden die PCR-Produkte im Denaturierungsgradienten partiell denaturiert und bleiben in der Polyacrylamid-Matrix hängen. Die partielle Denaturierung von PCR-Produkten erfolgt in Abhängigkeit von der Sequenz der DNA Stränge an unterschiedlichen Stellen im Denaturierungsgradienten und ermöglicht so eine Auftrennung der unterschiedlichen Fragmente. Die Methode wurde genutzt, um die bakteriellen Gemeinschaften verschiedener Proben zu analysieren und zu vergleichen. Dazu wurden die Gesamt-DNA aus den Proben extrahiert und mittels PCR 16S rRNA Genfragmente amplifiziert. Die einzelnen PCR-Produkte wurden dann im DGGE-Gel aufgetrennt. Es entstand ein Bandenmuster, anhand dessen Aussagen über die Diversität, Zusammensetzung und Variabilität der bakteriellen Gemeinschaften der Proben möglich waren. Für die PCR wurden die Primer F984-GC (gc-AACGCGAAGAACCTTAC) und R1378 (CGGTGTG-TACAAGGCCCGGAACG) wie bei Heuer et al. (1997) beschrieben verwendet. Die DGGE sowie die anschließende Silberfärbung wurden wie bei Heuer et al. (2001) und Weinert et al. (2009) beschrieben durchgeführt.

### **3.10 Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften mittels Illumina MiSeq Sequenzierung**

Mithilfe der Illumina MiSeq Plattform können im Hochdurchsatzverfahren 16S rRNA-Genfragmente sequenziert und so Informationen über Abundanzen und die taxonomische Zusammensetzung von Bakterienpopulationen einer Probe erhalten werden. Diese Sequenzierung wurde in Kooperation mit der Universität Kopenhagen durchgeführt.

### **3.11 Anfärbung und Quantifizierung phytopathogener Nematoden in Salatwurzeln**

Nematoden wurden in Gewebeproben von *Lactuca sativa* (cv. Tizian) angefärbt wie von BYBD et al. (1983) beschrieben. Dazu wurden die Wurzelproben gewaschen und vier Minuten in Natriumhypochlorit (1%) getränkt. Die Nematoden wurden in 40 mL Leitungswasser mit 1 mL Fuchsin-Stammlösung (3,5 g Fuchsin in 250 mL Essigsäure und 750 mL destilliertem Wasser) für ca. 30 Sekunden gekocht.

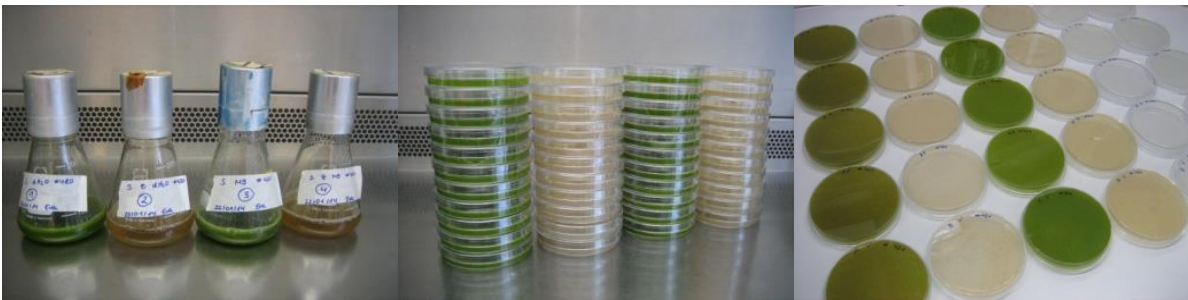


Anschließend wurden die Wurzeln durch Kochen in 20-30 mL Glycerin mit ein paar Tropfen 5 N HCl entfärbt. Die Wurzeln wurden in etwas Glycerin gegeben und die Nematoden unter dem Mikroskop (Leica EZ4HD) gezählt.

### 3.12 Präadaption der Humanpathogene

Je besser HP in der Umwelt und besonders auf Pflanzen überleben können, desto höher ist die Gefahr, dass Kontaminationen von Kulturpflanzen auftreten. Möglicherweise wird die Überlebensfähigkeit durch bestimmte Bedingungen, die zu einer Präadaption der Bakterien führen, erhöht. Da es das langfristige Ziel der Experimente ist, die Kolonisierung von Kulturpflanzen am Beispiel von Kopfsalat besser zu verstehen, wurde ein Medium entwickelt, welches ausschließlich Salatreste als Nährstoffe für HP enthält. Da es kein kommerzielles Medium aus Kopfsalat gibt, wurden verschiedene Medien (sowohl Agar- als auch Flüssigmedien) mit Salatbestandteilen hergestellt (Abbildung 5). Es war deutliches Wachstum der HP erkennbar. Damit waren Salatextrakt prinzipiell nutzbar und ausreichend für das Wachstum der beiden Modellstämme LT2 und *E. coli* O157:H7.

Abbildung 5 Medien mit Salatextrakt zur Anzucht und Präadaption von HP.

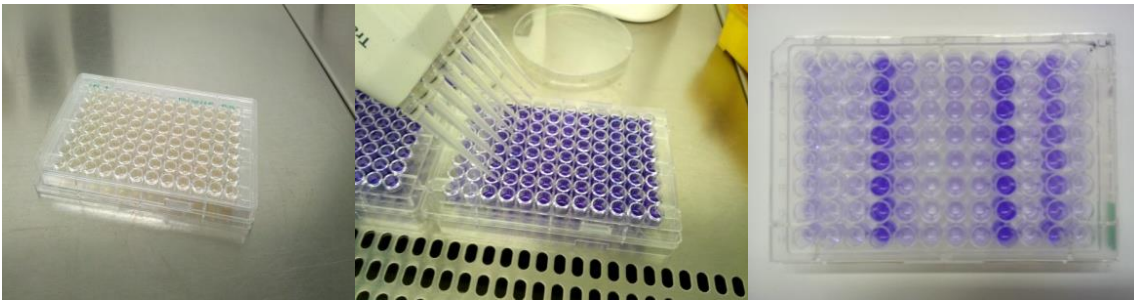


Anschließend wurde untersucht, ob und inwieweit die Zugabe eines Antibiotikums zum Salatmedium notwendig ist, damit ein Hintergrundwachstum von Bakterien aus dem Kopfsalat verhindert oder minimiert wird bzw. inwieweit eine Sterilfiltration ausreichend ist, ein Hintergrundwachstum zu unterdrücken. Des Weiteren wurde getestet, ob ein Puffersystem benötigt wird, um den pH-Wert in der Kultur konstant zu halten. Als Ergebnis dieser Vorversuche wurde ein steril filtriertes Medium mit einem Gehalt von 25% Salatextrakt in einem Puffersystem aus M9 Minimalsalzen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, 5x konzentriert eingesetzt, um die Endkonzentration laut Herstellerangaben zu erreichen) ohne Zugabe von Antibiotika als geeignet für die Versuche herausgearbeitet. Dieses wird im Folgenden als Salatmedium (lettuce medium, LM) bezeichnet und wurde in folgenden Versuchen zur Anzucht und Präadaption des Inokulums verwendet.

### 3.13 *In vitro* Biofilmassay

Die Fähigkeit verschiedener Stämme zur Biofilmbildung unter unterschiedlichen Bedingungen wurden mittels *in vitro* Biofilmassays in Anlehnung an das publizierte Protokoll von Stepanovic et al. (2007) untersucht. Dazu wurden die Stämme in 96-Well Mikrotiterplatten inokuliert und ohne Schütteln aerob inkubiert. Der gebildete Biofilm wurde mit Kristallviolettlösung gefärbt; die Extinktion der Proben wurde bei 570 nm gemessen (Abbildung 6).

Abbildung 6 *In vitro* Biofilmassay



### 3.14 Exogene Isolierung von Plasmiden (Biparental Mating)

Beim Biparental Mating werden transferierbare Plasmide auf einen leicht kultivierbaren Rezipienten übertragen. So wird die Untersuchung von Plasmiden auch aus nicht-kultivierbaren Bakterien ermöglicht. Diese Plasmide wurden in Bezug auf ihre Inkompatibilitätsgruppe sowie das Vorhandensein von Integrons und Resistenzgenen untersucht.

### 3.15 Agardiffusionstest zur Bestimmung von Resistenzen gegen Antibiotika, Desinfektionsmittel und Quecksilber (Antibiogramm)

Beim Agardiffusionstest zur Bestimmung von Resistenzen wird der zu untersuchende Stamm auf Mueller-Hinton Agar (Merck KGaA, Darmstadt) ausplattiert. Anschließend werden kleine Plättchen, die eine bestimmte Menge z.B. des zu testenden Antibiotikums enthalten, auf die Agarplatten gelegt. Nach Inkubation der Platten werden die Hemmhöfe um die Plättchen analysiert. Sie geben Auskunft über Antibiotika-Resistenzen des jeweiligen Stamms.

### 3.16 Hochdurchsatz qPCRs zur Quantifizierung von mobilen genetischen Elementen und Resistenzgenen (SmartChip)

SmartChip Real-time PCR Systeme ermöglichen die Durchführung einer großen Anzahl von qPCRs im Hochdurchsatzverfahren. Das System wurde in einer Kooperation mit Yong-Guan Zhu (Chinese Academy of Sciences, Xiamen, China) genutzt, um Bodenproben, die mit Klärschlamm behandelt worden waren, mit unbehandeltem Bodenproben hinsichtlich des Vorkommens verschiedener Resistenzgene und mobiler genetischer Elemente zu vergleichen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Genehmigung zum Arbeiten mit Humanpathogenen

Zu Beginn des Projektes musste eine Erlaubnis für Tätigkeiten mit Krankheitserregern gem. § 44 des Infektionsschutzgesetzes beantragt werden. Diese wurde vom Gesundheitsamt Braunschweig erteilt.

### 4.2 Einrichtung eines S2-Labors mit direktem Gewächshauszugang

Da die im Projekt durchgeführten Untersuchungen das Arbeiten im S2-Gewächshaus erforderten, wurde ein Labor mit direktem Zugang zum S2-Gewächshaus mit den für die geplanten Experimente benötigten Geräten ausgestattet. Dazu gehörte die Anschaffung neuer Geräte, die von Institutsmitteln erworben wurden: ein Stomacher-Laborhomogenisator zur Probenaufbereitung, eine Zentrifuge, die u.a. bei DNA-Extraktionen benötigt wird, ein Brutschrank und ein vollständiger Pipettensatz.

Abbildung 7 S2-Labor mit direktem Zugang zum S2-Gewächshaus zur Aufbereitung und Untersuchung von Proben aus Gewächshausversuchen mit HP.



### 4.3 Experimente zum Überleben von LT2 in DS-Boden

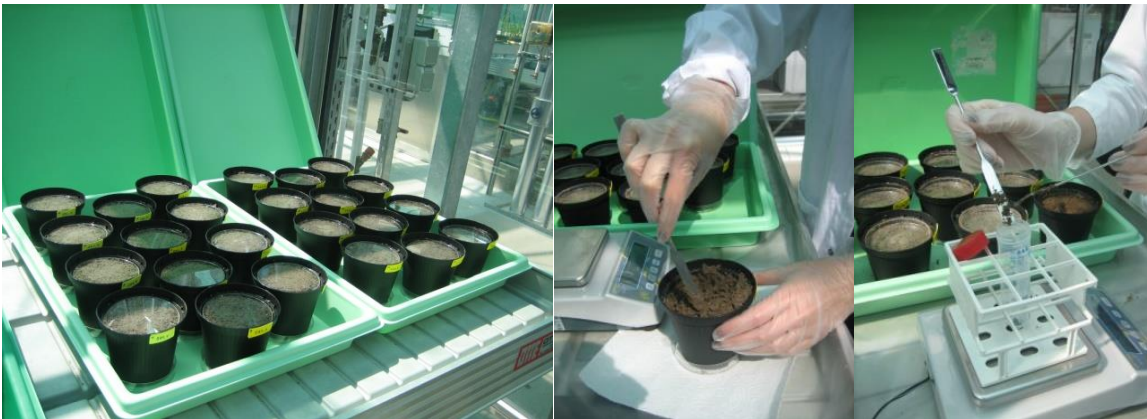
In den folgenden Experimenten wurde mit dem Modellstamm LT2 der Effekt von Klärschlamm als organischer Dünger im Boden und die Auswirkung von Präadaption von LT2 vor Inokulation in den Boden durch Anzucht in Salatmedium untersucht.

#### 4.3.1 Mikrokosmos-Langzeitversuch zur Analyse des Überlebens von LT2 in DS-Boden und des Einflusses von Klärschlamm und Präadaption in Salatmedium auf das Überleben

In einem Mikrokosmosversuch (Abbildung 8) wurde der mögliche Effekt von Klärschlamm auf das Überleben von LT2 im Boden untersucht. Zusätzlich wurde in dem Experiment analysiert, ob ein vorangestellter Präadaptionsschritt die Überlebensrate beeinflusst. In Böden mit bzw. ohne Klärschlamm wurde das Überleben von LT2 aus LB-Vorkultur mit dem von LT2 aus Salatmedium (LM)-Vorkultur verglichen. Dazu wurden die Böden mit LT2 in einer Konzentration von  $10^6$  KBE/g Boden aus der jeweiligen Vorkultur inokuliert. Die Töpfe wurden bei 20°C im Gewächshaus inkubiert und der Wassergehalt des Bodens konstant gehalten. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und mit Hilfe kultivierungsabhängiger Methoden auf das Vorhandensein von LT2 untersucht, um dessen Überleben im Boden über die Zeit zu verfolgen.

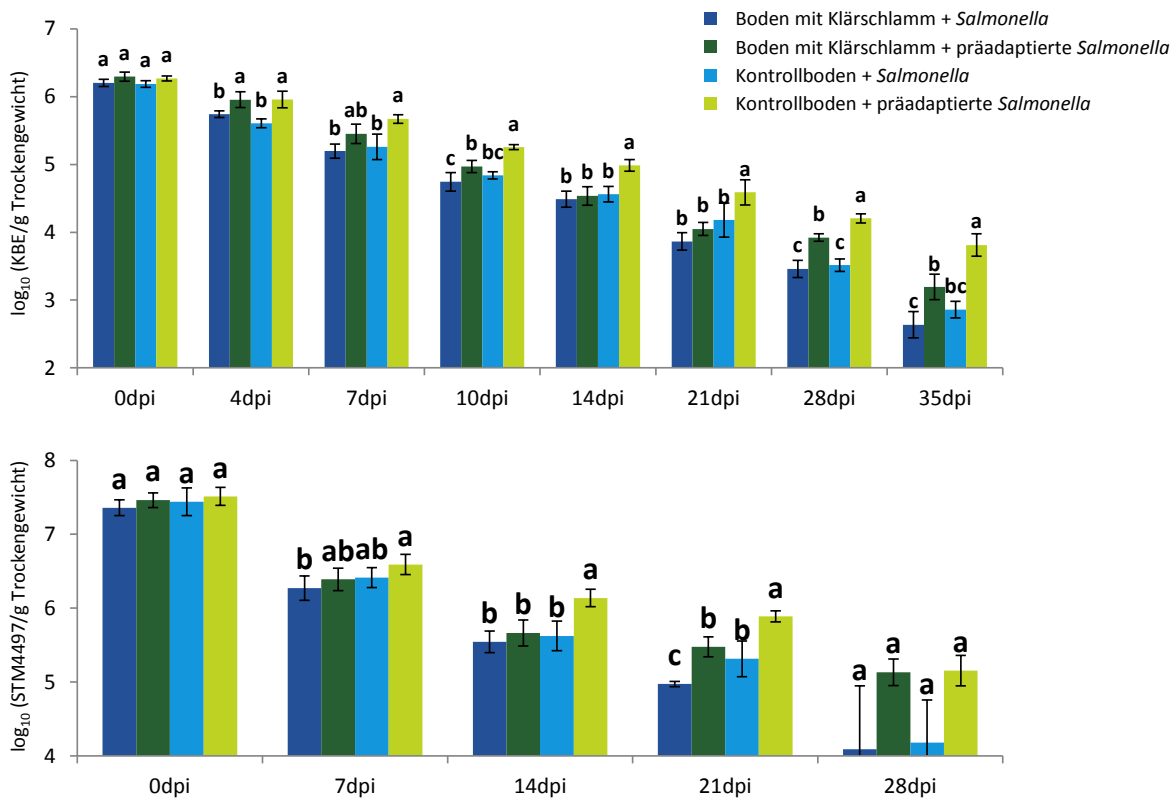


Abbildung 8 Mikrokosmosversuch zum Überleben von LT2 in Böden mit und ohne Klärschlamm unter Gewächshausbedingungen.



Bis 35 Tage nach Inokulation (days post inoculation, dpi) konnte die Anzahl der LT2-Kolonien (KBE) der Proben mittels kultivierungsabhängiger Methoden quantifiziert werden. Sie sank innerhalb von 5 Wochen von etwa  $10^6$  auf ca.  $10^3$  KBE/g Boden (Abbildung 9). Ab 10 dpi war die KBE-Zahl von LT2 bei der Behandlung ohne Klärschlamm mit präadaptierten LT2 aus LM-Vorkultur signifikant höher als bei allen anderen Behandlungen. Quantifizierung mittels qPCR bestätigte den signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen (Abbildung 9).

Abbildung 9 Quantifizierung von LT2 im Boden.

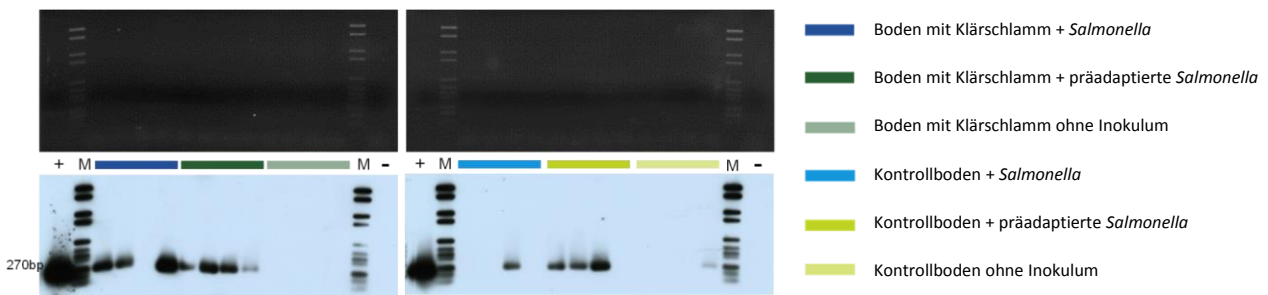


A: KBE-Zahl von LT2. B: Quantifizierung von *Salmonella* in Gesamt-DNA aus Boden mittels qPCR für das *S. Typhimurium*-spezifische Gen STM4497.

Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass der Präadaptionsschritt das Überleben fördert und LT2 in Gegenwart von Klärschlamm schlechter oder vergleichbar zum Boden ohne Klärschlamm überlebt. Das Salatmedium wurde für die Gewächshausversuche mit LT2 zur Anzucht des Inokulums verwendet.

Bei weiteren Probenahmen war die Zahl der LT2-Zellen im Boden zu gering, um quantifiziert zu werden. Aber auch 98, 119 und 175 dpi konnte LT2 nach Anreicherung mit anschließender selektiver Kultivierung bzw. mittels PCR-Southern Blot-Hybridisierung in Gesamt-DNA, die direkt aus den Böden isoliert worden war, detektiert werden (Abbildung 10).

Abbildung 10 Nachweis von LT2 98 Tage nach Inokulation in den Boden in Gesamt-DNA mittels PCR und anschließender Southern Blot-Hybridisierung.

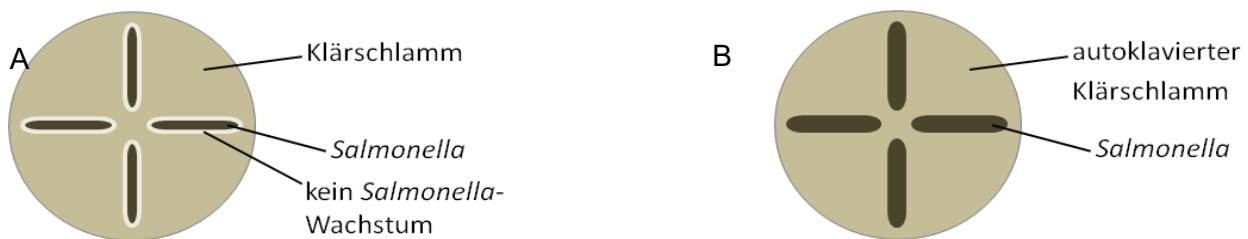


Dieses Mikrokosmosexperiment zeigte, dass die KBE-Zahl von LT2 im Boden zwar schnell absinkt, aber geringe Zellzahlen lange Zeit überleben und sich durch Anreicherung schnell vermehren lassen.

#### 4.3.2 Ergänzendes *in vitro* Experiment zur Untersuchung der Wirkung von Klärschlamm auf LT2

Um herauszufinden, worauf die unterschiedliche KBE-Zahl von LT2 in Boden mit bzw. ohne Klärschlamm beruhte, wurde ein ergänzendes Experiment durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob der Unterschied durch Konkurrenz bzw. antagonistische Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft des Klärschlammes verursacht wurde oder ob es eine hemmende Wirkung von Inhaltsstoffen des Klärschlammes gab. Dazu wurde Klärschlamm auf R2A-Medium (Merck KGaA, Darmstadt) ausplattiert und darauf mit einer Impföse LT2 ausgestrichen.

Abbildung 11 Analyse des hemmenden Effekts von Klärschlamm auf LT2.



A: kein Wachstum auf nicht autoklaviertem Klärschlamm; B: Wachstum auf autoklaviertem Klärschlamm.

Beim nicht autoklavierten Klärschlamm (Abbildung 11A) wächst LT2 nicht auf der ganzen Fläche, auf der mit der Impföse ausgestrichen wurde, es ist eine Art Hemmhof zwischen Klärschlamm und LT2 erkennbar. Beim autoklavierten Klärschlamm (Abbildung 11B) ist deutliches Wachstum von LT2 auf der gesamten Fläche des Ausstrichs erkennbar. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das schlechtere Überleben von LT2 in Boden mit Klärschlamm durch Konkurrenz oder antagonistische Wirkung der mikrobiellen Gemeinschaft des Klärschlammes bedingt sein könnte. Eine weitere Möglichkeit wären im Klärschlamm enthaltene Stoffe wie Antibiotika, die durch Autoklavieren ihre Aktivität verloren haben.

#### 4.4 Experimente zur Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen durch LT2

Für die Versuche zur möglichen Kolonisierung von Pflanzen durch LT2 wurde Kopfsalat als Modellpflanze verwendet (siehe auch 3.2). In Gewächshausversuchen wurde der Infektionsweg über die Wurzel ausgehend von kontaminiertem Boden simuliert.

##### 4.4.1 Vorversuch zur Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen durch LT2 in Klärschlamm-behandeltem Boden

In diesem ersten Vorversuch zur Kolonisierung von Kopfsalat durch LT2 sollte die Hypothese verfolgt werden, dass die Aufnahme von LT2 in Kopfsalatpflanzen durch Wurzelverletzungen beim Einpflanzen in Boden mit und ohne Klärschlamm ermöglicht bzw. begünstigt wird. Dabei sollte zudem untersucht werden, ob Klärschlamm im Boden einen Einfluss auf die Aufnahme von LT2 in die Pflanze hat. Dazu wurde LT2 in einer Konzentration von  $10^3$  KBE/g Boden in mit Klärschlamm behandelten Boden inokuliert und 28 Tage alte Salatpflanzen in den inokulierten Boden umgesetzt (Abbildung 12). Die Töpfe wurden bei 20 °C im Gewächshaus inkubiert und täglich mit destilliertem Wasser gegossen. Es wurden Proben von Salatblättern, Wurzeln und Boden auf das Vorhandensein von LT2 untersucht.

Abbildung 12 Vorversuch zur Kolonisierung von Salatpflanzen *Lactuca sativa* cv Tizian durch LT2.



Nach 14 Tagen konnte nur in einzelnen Bodenproben LT2 detektiert werden. In Blattproben wurde LT2 nicht nachgewiesen.

Bei diesem Versuch war der Infektionsdruck mit  $10^3$  KBE/g Boden relativ gering. Dies könnte der Grund dafür sein, dass 14 dpi nur in einzelnen Bodenproben LT2 detektiert werden konnten und zum Ende des Experiments auch nach Anreicherung keine kultivierbaren Salmonellen mehr nachweisbar waren. In folgenden Experimenten wurde daher LT2 in einer höheren Konzentration in den Boden inokuliert.

#### 4.4.2 Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm auf die Kolonisierung von Kopfsalattpflanzen durch LT2

In einem Gewächshausexperiment (Abbildung 13) wurde die mögliche Kolonisierung von Kulturpflanzen durch bakterielle HP am Beispiel der Besiedelung von Kopfsalat durch LT2 untersucht. Es sollte analysiert werden, welchen Einfluss Klärschlamm auf das Überleben von LT2 in der pflanzlichen Umgebung und auf die Kolonisierung von Kopfsalat hat und ob es zur Aufnahme von LT2 durch Wurzelverletzungen beim Einpflanzen in Boden mit und ohne Klärschlamm kommt. Aufgrund der Ergebnisse des Vorexperiments (6.4.1) wurde eine höhere Anfangs-KBE eingesetzt und damit ein ‚worst case‘-Szenario nachgeahmt. LT2 wurde in einer Konzentration von  $10^6$  KBE/g in mit Klärschlamm behandelten bzw. in unbehandelten Boden inokuliert und anschließend die Kopfsalattpflanzen eingepflanzt. 21 und 49 Tage nach der Inokulation des Bodens mit LT2 wurden jeweils Blatt-, Wurzel- und Bodenproben genommen und auf das Vorhandensein von LT2 untersucht. Die Quantifizierung bzw. der Nachweis von LT2 erfolgten mittels kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Methoden.

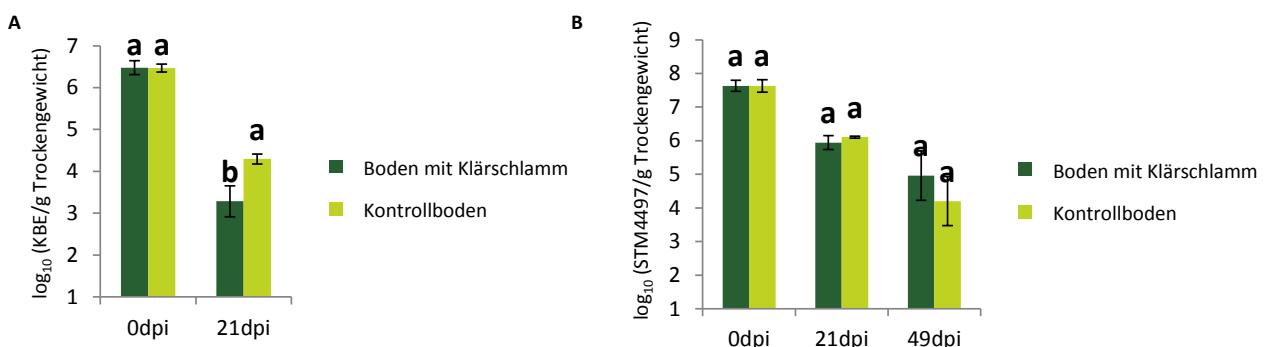
Abbildung 13 Mikrokosmos-Gewächshausexperiment



Links: 0 dpi, rechts: 21 dpi

Nach 21 Tagen war die Anzahl der KBE von LT2 von etwa  $10^6$  KBE/g Boden auf etwa  $10^3$  bzw.  $10^4$  KBE/g mit bzw. ohne Klärschlamm abgesunken (Abbildung 14A). Der Unterschied der KBE-Anzahl im Boden zwischen Behandlung mit und ohne Klärschlamm war signifikant. Nach 49 Tagen wuchsen nur noch vereinzelt Kolonien, deren Anzahl zu gering für eine Quantifizierung mittels kultivierungsabhängiger Methoden war. Es kann jedoch festgehalten werden, dass sich noch kultivierbare LT2 im Boden befanden. Die Ergebnisse der kultivierungsabhängigen Methoden konnten mittels qPCR bestätigt werden (Abbildung 14B).

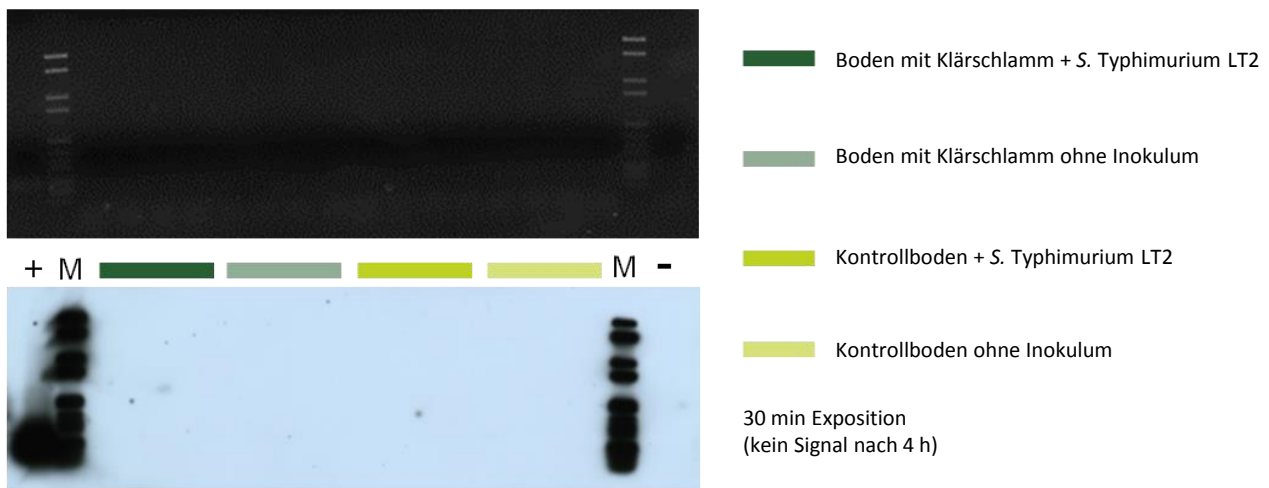
Abbildung 14 Quantifizierung von LT2 im Boden.



A: KBE-Anzahl von LT2 in Boden mit Klärschlamm (dunkelgrün) und in unbehandeltem Boden (hellgrün). B: Quantifizierung von LT2 in Gesamt-DNA aus Boden mit Klärschlamm (dunkelgrün) oder ohne Klärschlamm (hellgrün) mittels qPCR für das Typhimurium-spezifische Gen STM4497.

In den Rhizosphärenproben konnten 21 dpi KBE im Bereich von  $10^3$ /g Wurzelfrischgewicht ermittelt werden, und es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Behandlung mit und ohne Klärschlamm. Nach 49 Tagen war wie bei den Bodenproben ein Wachstum einzelner Kolonien zu verzeichnen, deren Anzahl zu gering war für eine quantitative Auswertung mit kultivierungsunabhängigen Methoden. Es kann also festgehalten werden, dass auch nach 49 Tagen noch kultivierbare LT2 in der Rhizosphäre vorhanden waren. In Blattproben konnte zu keinem Probenahmezeitpunkt LT2 nachgewiesen werden (Abbildung 15).

Abbildung 15 Kein Nachweis von LT2 in Gesamt-DNA aus Phyllospärenproben mittels PCR und anschließender Southern Blot-Hybridisierung.



Besseres Wachstum der Salatpflanzen, die in Boden mit Klärschlamm gewachsen waren führte zu einem deutlich höheren Blattfrischgewicht. Dies ist wahrscheinlich durch die zusätzlichen Nährstoffe zu erklären (vgl. Abbildung 13, rechts).

#### 4.5 Untersuchung der Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen durch LT2 bei Inokulation von Phytopathogenen

In vorangegangenen Versuchen (4.4.1, 4.4.2) wurden keine LT2-Zellen in Phyllospärenproben detektiert. Daher wurden Gewächshausexperimente durchgeführt, in der Bodenpilz *Rhizoctonia solani* oder phytopathogene Nematoden koinokuliert wurden. Die Hypothese dieser Experimente ist, dass Phytopathogene zum einen als Vektor fungieren und zum anderen Eintrittsstellen für LT2 in die Pflanze schaffen könnten. So könnte die Internalisierung von LT2 in die Pflanze ermöglicht bzw. begünstigt werden.



#### 4.5.1 Einfluss der Inokulation des phytopathogenen Pilzes *Rhizoctonia solani* AGI-1B auf die Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen mit LT2

*Rhizoctonia solani* AGI-1B ist ein weltweit verbreiteter Pilz, der in fast allen Böden vorkommt und u.a. Salatpflanzen befällt. Die Hyphen dieses Pilzes dringen mithilfe zellwandauflösender Enzyme direkt in Pflanzengewebe ein (Garcia et al., 2006).

Die Infektion der Kopfsalatpflanzen mit *R. solani* erfolgte, indem Blattstückchen, die mit dem Pilz befallen waren, in den Boden eingearbeitet wurden. Allerdings war die Infektion der Kopfsalatpflanzen unter Gewächshausbedingungen nicht erfolgreich, es waren kaum Befallssymptome an den Pflanzen zu erkennen. In diesem Experiment wurde LT2 nicht im Blattmaterial detektiert.

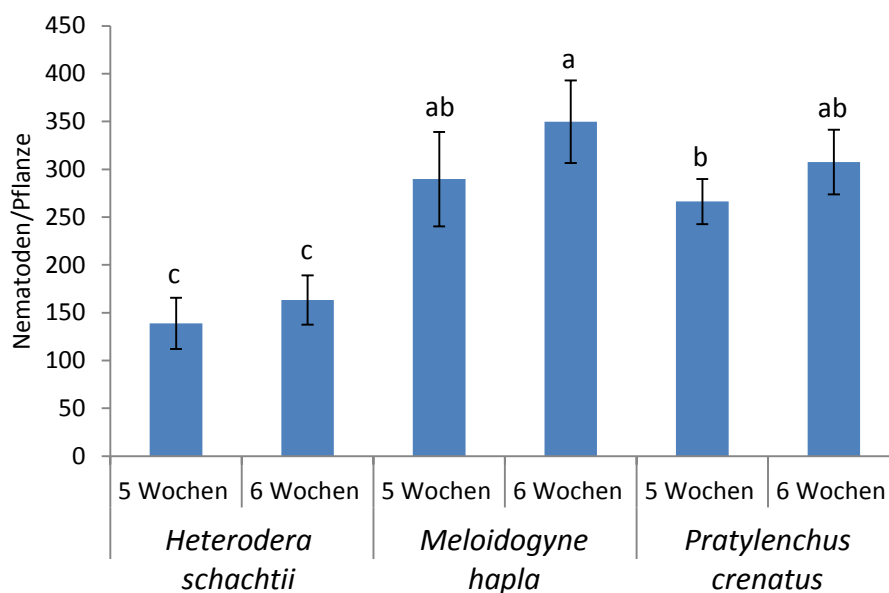
#### 4.5.2 Einfluss der Inokulation phytopathogener Nematoden auf die Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen mit LT2

Es wurden zwei Nematodenarten als Schaderreger für Kopfsalat zunächst in einem Vorversuch ohne Inokulation von LT2 getestet. Die Nematoden wandern zur Pflanzenwurzel und dringen dort ein.

##### 4.5.2.1 Vorversuch zur Identifizierung geeigneter Nematodengattungen zur Infektion von Kopfsalatpflanzen

In einem Vorversuch wurde getestet, ob die phytopathogenen Nematoden *Meloidogyne hapla*, *Heterodera schachtii* und *Pratylenchus crenatus* die Modellpflanze Kopfsalat infizieren, da bisher nicht bekannt war, ob die getesteten Gattungen die verwendete *L. sativa* Sorte ‚Tizian‘ infizieren können. Abbildung 16 zeigt die nach Anfärben der Salatwurzeln ermittelten Zahlen der jeweiligen Nematoden pro Pflanze.

Abbildung 16 Anzahl der Nematoden pro Pflanze bei *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne hapla* und *Pratylenchus crenatus* nach Infektion von 5 und 6 Wochen alten Kopfsalatpflanzen *Lactuca sativa* cv. Tizian.



Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) laut Tukey-Test.

Bei Infektion der Salatpflanzen mit *H. schachtii* wurden nach 21 Tagen durchschnittlich  $151 \pm 28$  Tiere pro Pflanze gefunden, bei Infektion mit *M. hapla*  $320 \pm 54$  und bei Infektion mit *P. crenatus*  $291 \pm 39$  Tiere pro Pflanze.

Der Versuch zeigte, dass die getesteten Nematodengattungen *L. sativa* cv. Tizian infizieren können und somit als Modellphytopathogene für Inokulationsversuche geeignet sind. Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden *M. hapla* und *P. crenatus* ausgewählt, da sie ein höheres Ausmaß der Infektion im Vergleich zu *H. schachtii* zeigten.

#### 4.5.2.2 Einfluss der Inokulation der phytopathogenen Nematoden *Meloidogyne hapla* und *Pratylenchus crenatus* auf die Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen mit LT2

Analog zum Koinokulationsexperiment mit *R. solani* sollte in einem Gewächshausexperiment untersucht werden, ob Nematoden die Besiedlung von Pflanzen durch LT2 beeinflussen. Auch hier sollte die Hypothese überprüft werden, dass bestimmte Phytopathogene als Vektoren fungieren oder Eintrittsstellen für LT2 in die Pflanze schaffen können. Es wurde untersucht, ob die Internalisierung von LT2 in die Pflanze durch die Koinokulation von Nematoden ermöglicht wird. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob verschiedene Nematodengattungen eventuell unterschiedliche Auswirkungen auf das Überleben von LT2 im Boden oder eine Besiedlung von Kopfsalatpflanzen haben. Für diese Versuche wurden *Meloidogyne hapla* und *Pratylenchus crenatus* ausgewählt. *M. hapla* gehört zu den gallenbildenden Nematoden. Die Larven dringen in die Wurzel der Wirtspflanze ein, bewegen sich durch das Gewebe und verursachen die Bildung von Wurzelgallen. Durch die Ausbildung der Gallen wird die Wasser- und Nährstoffaufnahme der Pflanzen gestört. *M. hapla* hat ein breites Wirtsspektrum und verursacht besonders an Tomaten, Möhren und Salat Schäden. *P. crenatus* gehört zu den Wurzelläsionsnematoden. Diese Endoparasiten bewegen sich durch das Wurzelgewebe und ernähren sich von den pflanzlichen Zellen, indem sie die Zellen anstechen und aussaugen. Es entstehen große Läsionen im Wurzelgewebe und die Pflanzen können absterben.

Die Infektion mit *M. hapla* und *P. crenatus* war in diesem Versuch ebenso wie im Vorversuch (s. 6.5.2.1) unter Gewächshausbedingungen sehr erfolgreich. Nach Infektion mit *M. hapla* waren deutliche Symptome an den Pflanzen zu beobachten (Abbildung 17).

Abbildung 17 Gallenbildung an Salatwurzeln von *Lactuca sativa* cv. Tizian durch Infektion mit dem phytopathogenen Nematoden *Meloidogyne hapla*.



Der Befall der Kopfsalatpflanzen wurde bei den Probenahmen nach 21 und 49 Tagen durch Anfärben der Nematoden in den Wurzeln mit Fuchsin-Lösung untersucht. Sowohl *M. hapla* (Abbildung 18) als auch *P. crenatus* (Abbildung 19) waren in die Salatwurzeln eingedrungen und hatten deutliche Symptome hervorgerufen (Abbildung 18 und Abbildung 19).

Abbildung 18 Infektion von Wurzeln von *Lactuca sativa* cv. Tizian durch den phytopathogenen Nematoden *Pratylenchus crenatus*.

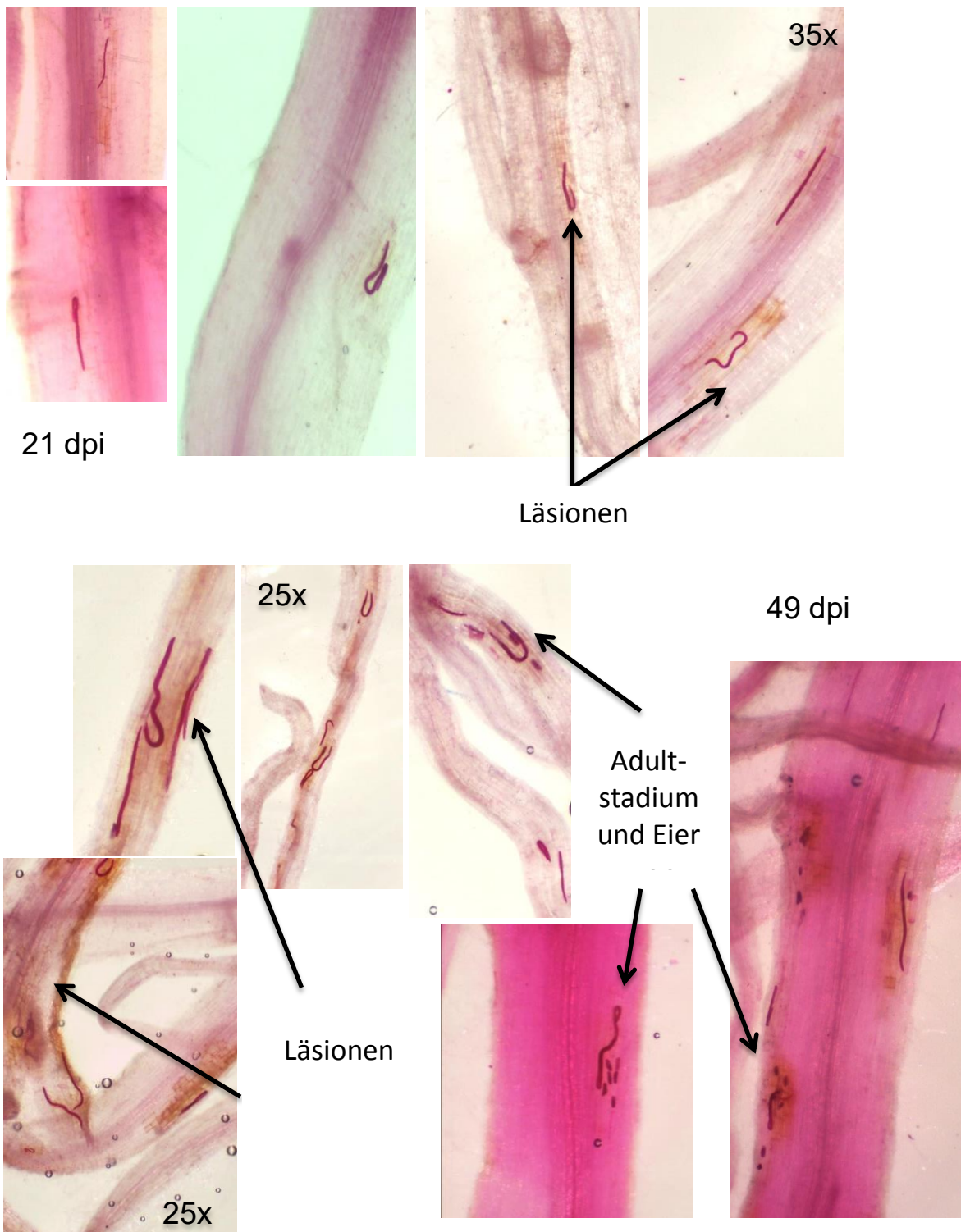
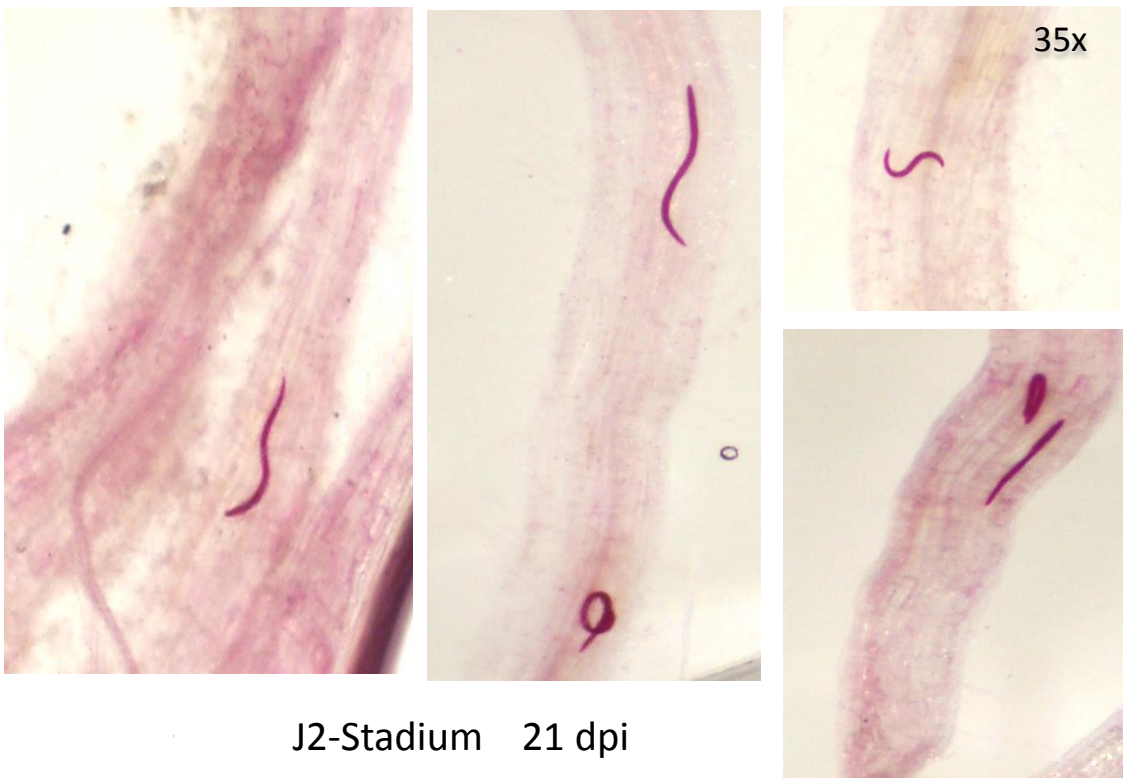


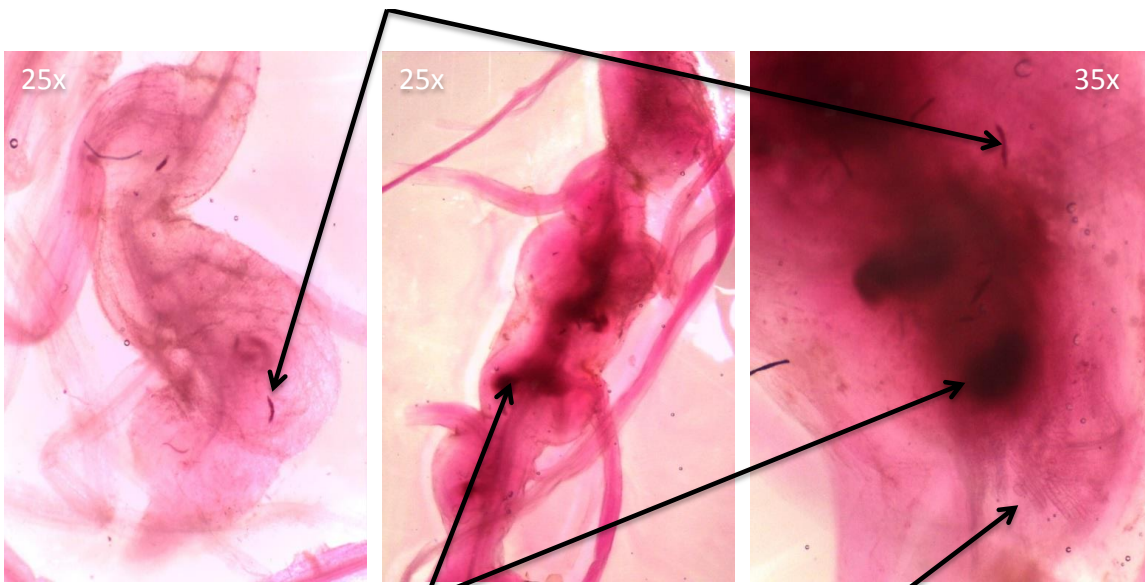


Abbildung 19 Infektion von Wurzeln von *Lactuca sativa* cv. Tizian durch den phytopathogenen Nematoden *Meloidogyne hapla*.



J2-Stadium 21 dpi

J4-Stadium



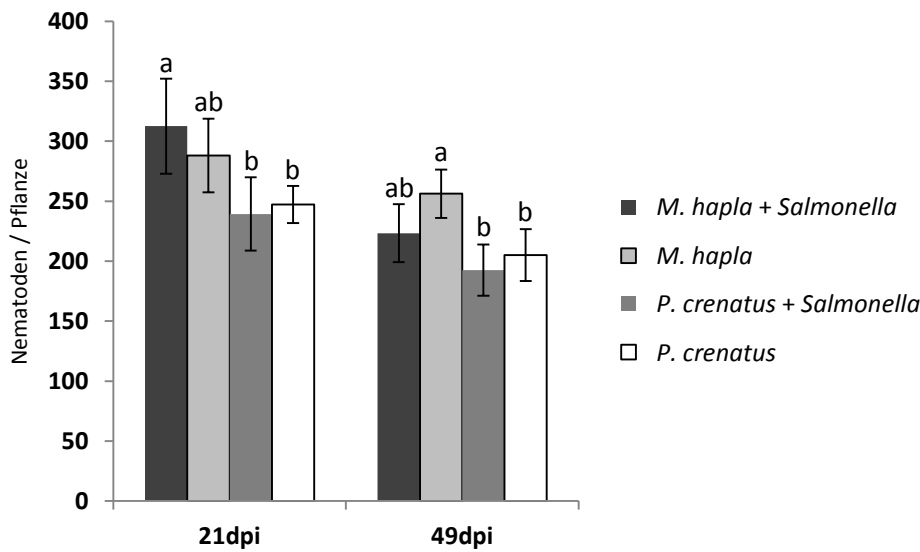
49 dpi

Nematoden ernähren sich von Zellen in den Gallen

Pilzhyphen

Die in den Salatwurzeln angefärbten Nematoden wurden unter dem Mikroskop gezählt und die Anzahl der Tiere pro Pflanze ermittelt (Abbildung 20).

Abbildung 20 Anzahl der Nematoden in den Salatwurzeln von *Lactuca sativa* cv. Tizian 21 und 49 Tage nach der Infektion mit den phytopathogenen Nematoden *Meloidogyne hapla* und *Pratylenchus crenatus*.

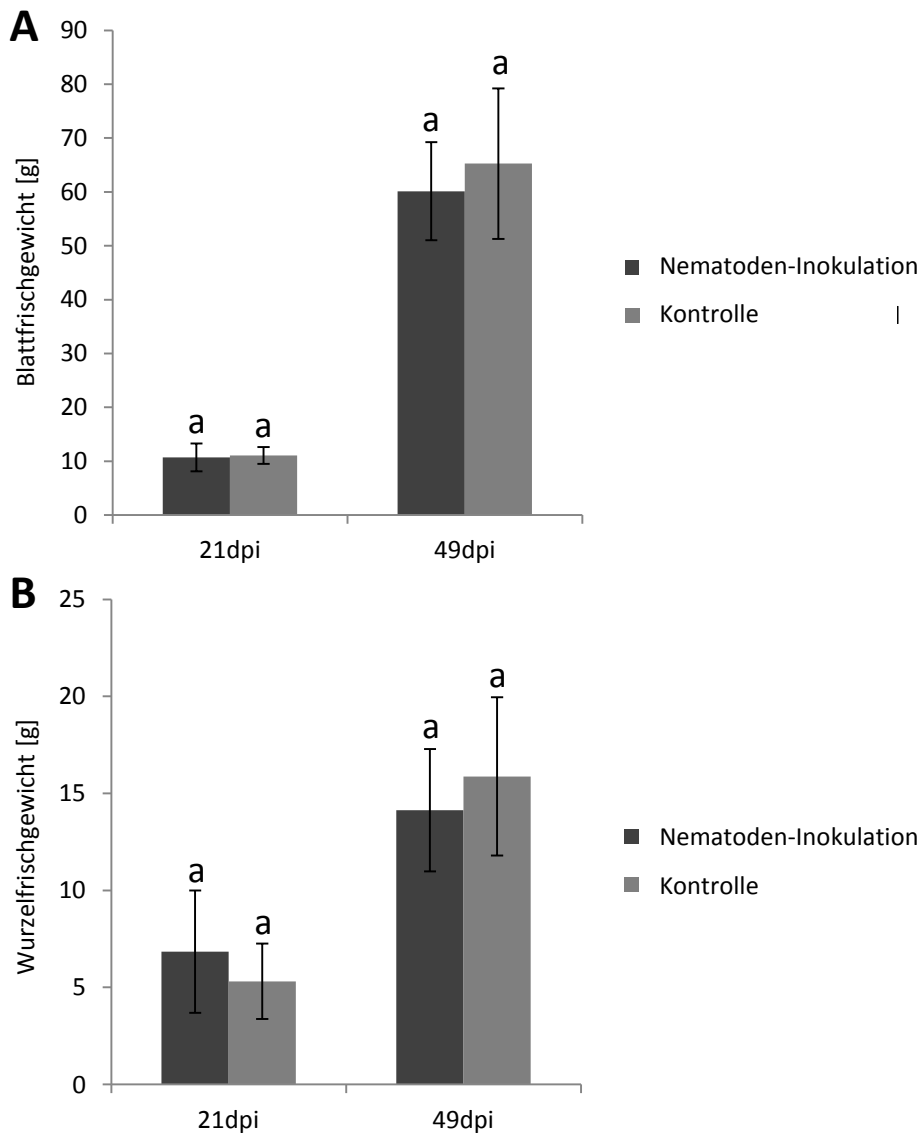


Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) laut Tukey-Test.

Die Anzahl der Nematoden pro Pflanze lag nach 21 Tagen bei  $272 \pm 41$  und bei  $219 \pm 32$  nach 49 Tagen, wobei die Anzahl der Tiere pro Pflanze für *M. hapla* verglichen mit *P. crenatus* etwas höher war.

Die Blatt- und Wurzelgewichte von Pflanzen, die mit phytopathogenen Nematoden inokuliert worden waren, unterschieden sich 21 dpi und 49 dpi nicht von denen der Kontrollpflanzen (Abbildung 21). Das durchschnittliche Blattgewicht lag bei  $10,8 \pm 2,3$  g nach 21 Tagen und  $61,8 \pm 10,9$  g nach 49 Tagen, während das durchschnittliche Wurzelgewicht jeweils sowohl in infizierten Pflanzen als auch in Kontrollpflanzen nach 21 Tagen  $6,3 \pm 2,9$  g und nach 49 Tagen  $14,7 \pm 3,5$  g betrug.

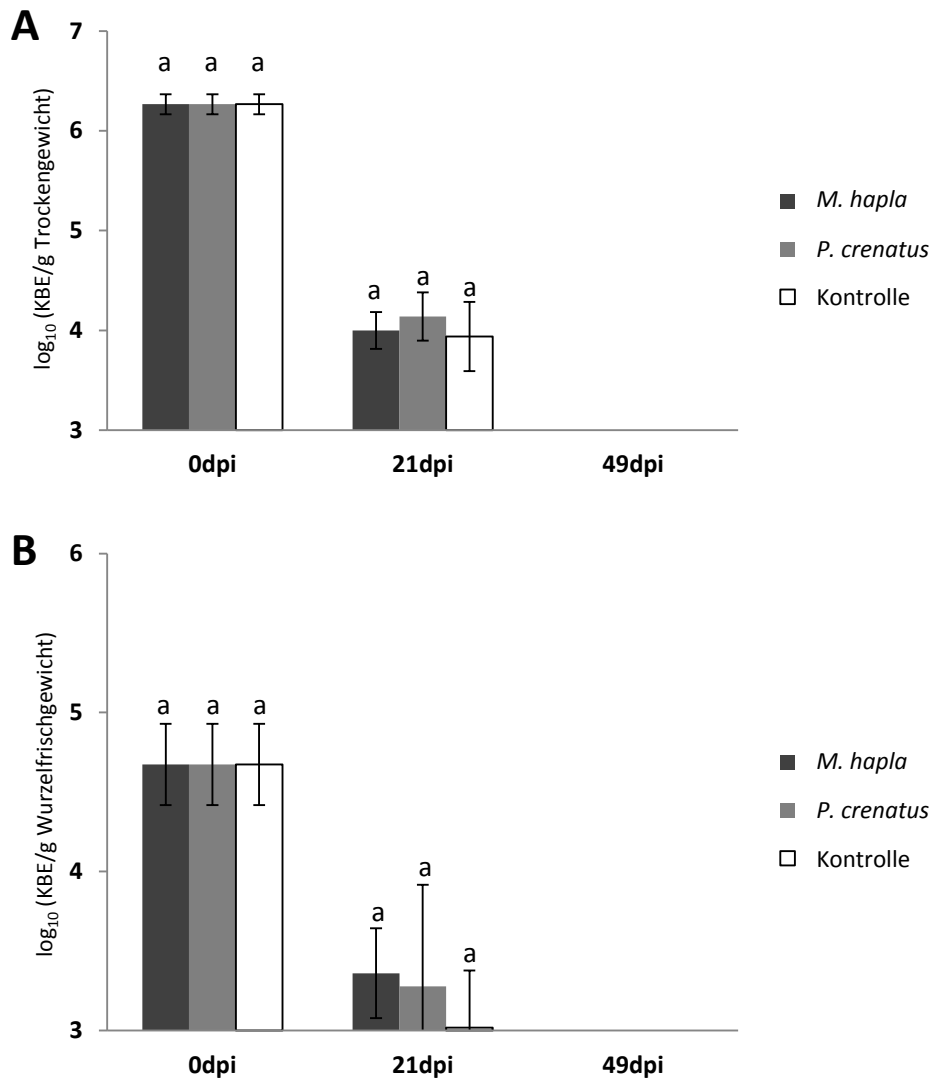
Abbildung 21 Blatt- und Wurzelfrischgewichte der Salatpflanzen nach 21 und 49 Tagen.



Gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied ( $P < 0,05$ , Infektion mit Nematoden:  $n=8$ ; Kontrollpflanzen:  $n=4$ ) laut Tukey-Test.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der LT2 KBE im Boden sowie in der Rhizosphäre in diesem Experiment zeigten 21 Tage nach der Inokulation in den Boden keine signifikanten Unterschiede der Anzahl von LT2 im Boden mit Nematoden im Vergleich zum Boden, in den keine Nematoden inokuliert wurden. Die Anzahl kultivierbarer LT2 in den Bodenproben sank von  $\log 6,3 \pm 0,1$  auf  $\log 4 \pm 0,3$  pro g Trockengewicht innerhalb von 21 Tagen. In den Rhizosphärenproben sank die Anzahl kultivierbarer LT2 von  $\log 4,7 \pm 0,3$  auf  $\log 3,2 \pm 0,4$  nach 21 Tagen. Nach 49 Tagen war die Abundanz von LT2 in den Proben unterhalb des Quantifizierungslimits. Das bedeutet, dass die Gegenwart der inokulierten Nematoden das Überleben von LT2 im Boden und in der Rhizosphäre nicht signifikant beeinflusst.

Abbildung 22 Anzahl kultivierbarer LT2 im Boden (A) und in der Rhizosphäre (B) von Salatpflanzen, die mit den phytopathogenen Nematoden *Meloidogyne hapla* oder *Pratylenchus crenatus* infiziert wurden, bzw. von nicht inokulierten Kontrollpflanzen.



Gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied ( $P < 0,05$ ) laut Tukey-Test.

In diesem Experiment konnte unter den untersuchten Bedingungen weder mit kultivierungsabhängigen noch mit kultivierungsunabhängigen Analysen eine Internalisierung von LT2 in der Phyllosphäre der Kopfsalatpflanzen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass entweder unter den analysierten Bedingungen keine Internalisierung von LT2 aus kontaminiertem Boden in Salatblätter stattfindet oder die Anzahl der Zellen von LT2 so gering ist, dass sie unterhalb des Detektionslimits liegt und daher nicht nachweisbar ist.

#### 4.6 Einfluss von Klärschlamm auf Abundanzen mobiler genetischer Elemente und Resistenzgene im Boden

In Abwasserreinigungsanlagen finden sich hohe Zelldichten von Mikroorganismen und es liegt eine hohe Konzentration an Nährstoffen vor. Zudem gibt es verschiedenste Selektionsdrücke durch Antibi-

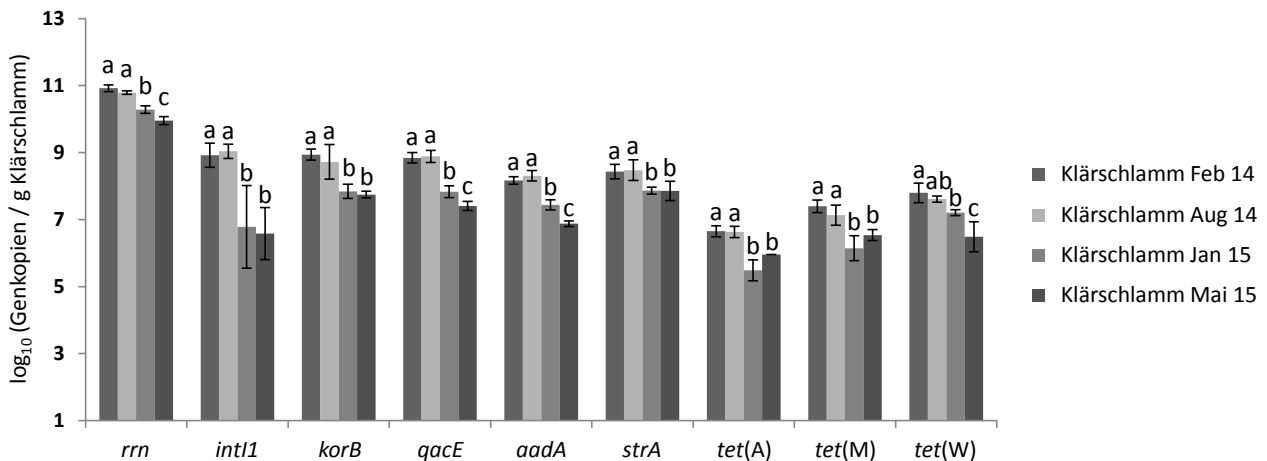
otika, Pharmazeutika und Schwermetalle im Abwasser. Somit stellen Kläranlagen einen ‚Hotspot‘ für die Übertragung mobiler genetische Elemente und Resistenzgene dar.

#### 4.6.1 Vergleich der Resistome und Mobilome von Klärschlammproben einer Kläranlage zu verschiedenen Zeitpunkten

Es wurde eine vergleichende Untersuchung von Klärschlammproben durchgeführt, die zu vier verschiedenen Zeitpunkten an einer städtischen Kläranlage genommen wurden. Mithilfe der qPCR wurde die Variabilität der Klärschlammproben im Hinblick auf das Vorkommen von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen und *Salmonella* untersucht. Aus Februar 2014, August 2014, Januar 2015 und Mai 2015 wurden Proben in jeweils vier Replikaten untersucht. Der Klärschlamm vom Februar 2014 wurde im Langzeitexperiment (s. 4.3.1) verwendet, und aus dem Klärschlamm vom Mai 2015 wurden Isolate und Transkonjuganten gewonnen (s. 4.7.3 und 4.6.4). In den Proben wurden die Zielgene *rrn* (16S rRNA Gene), *intI1* (Klasse-I-Integrans), *korB* (IncP-1 Plasmids), *qacE* (Resistenz gegen quarternäre Ammoniumverbindungen), *aadA* und *strA* (Streptomycin-Resistenz), *tet(A)*, *tet(M)* und *tet(W)* (Tetracyclin-Resistenz) quantifiziert.

Mittels qPCR wurde gezeigt, dass die Abundanzen der quantifizierten Zielgene für die vier untersuchten Klärschlammproben allgemein vergleichbar sind, d.h. in vergleichbarer Menge gefunden werden (Abbildung 23; die Werte relativ zur 16S-Gekopienzahl sind in Abbildung 24 zu finden).

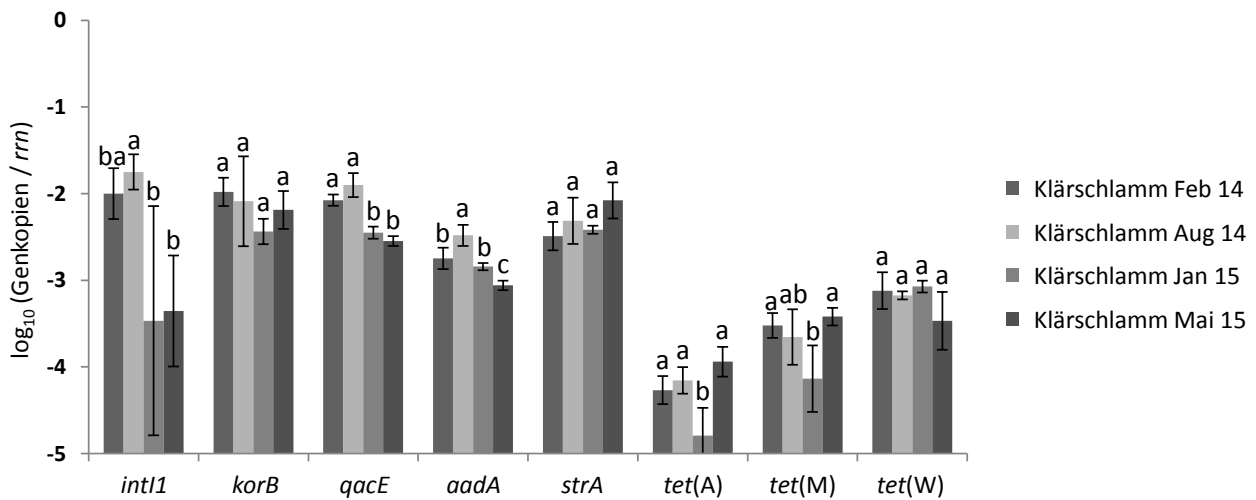
Abbildung 23 Absolute Abundanzen der Zielgene von 16S rRNA-Genfragmenten, Klasse-1-Integrans, IncP-1 Plasmiden und Resistenzgenen in Klärschlammproben einer städtischen Kläranlage zu vier Zeitpunkten zwischen Februar 2014 und Mai 2015.



Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede (P<0,05) laut Tukey-Test.

Die Kopienzahlen der quantifizierten Gene liegen im Bereich von  $10^7$  (*tet(A)*) bis  $10^{11}$  (*rrn*) Genkopien pro Gramm Klärschlamm. Aus den absoluten Genkopienzahlen wurden die Abundanzen relativ zur 16S rRNA-Genkopienzahl für die Klärschlammproben berechnet (Abbildung 24).

Abbildung 24 Relative Abundanzen der Zielgene für Klasse 1-Integrone, IncP-1 Plasmide und Resistenzgene in vier Klärschlammproben eines städtischen Klärwerks, die zwischen Februar 2014 und Mai 2015 genommen wurden.



Die Klärschlammprobe von Februar 2014 wurde für das Langzeit-Mikrokosmosexperiment verwendet (s. 6.3.1), und aus der Klärschlammprobe von Mai 2015 wurden Isolate und Transkonjuganten isoliert (s. 6.6.4 und 6.7.3). Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) laut Tukey-Test.

Die Zielgene *int11* (Klasse 1-Integrone), *korB* (IncP-1 Plasmide), *qacE* (Resistenz gegen quarternäre Ammoniumverbindungen), *aadA* und *strA* (Streptomycin-Resistenz) wurden in höherer relativer Abundanz in den Klärschlammproben gefunden als die Tetracyclin-Resistenzgene *tet(A)*, *tet(M)* und *tet(W)*. Die Proben aus dem Jahr 2014 wiesen, verglichen mit den Proben aus dem Jahr 2015, höhere Abundanzen für *qacE* auf. In den Proben von August 2014 wurde die höchste Anzahl *aadA*-Genkopien gefunden, und Proben vom Januar 2015 wiesen die geringste Anzahl *tet(A)*-Genkopien auf.

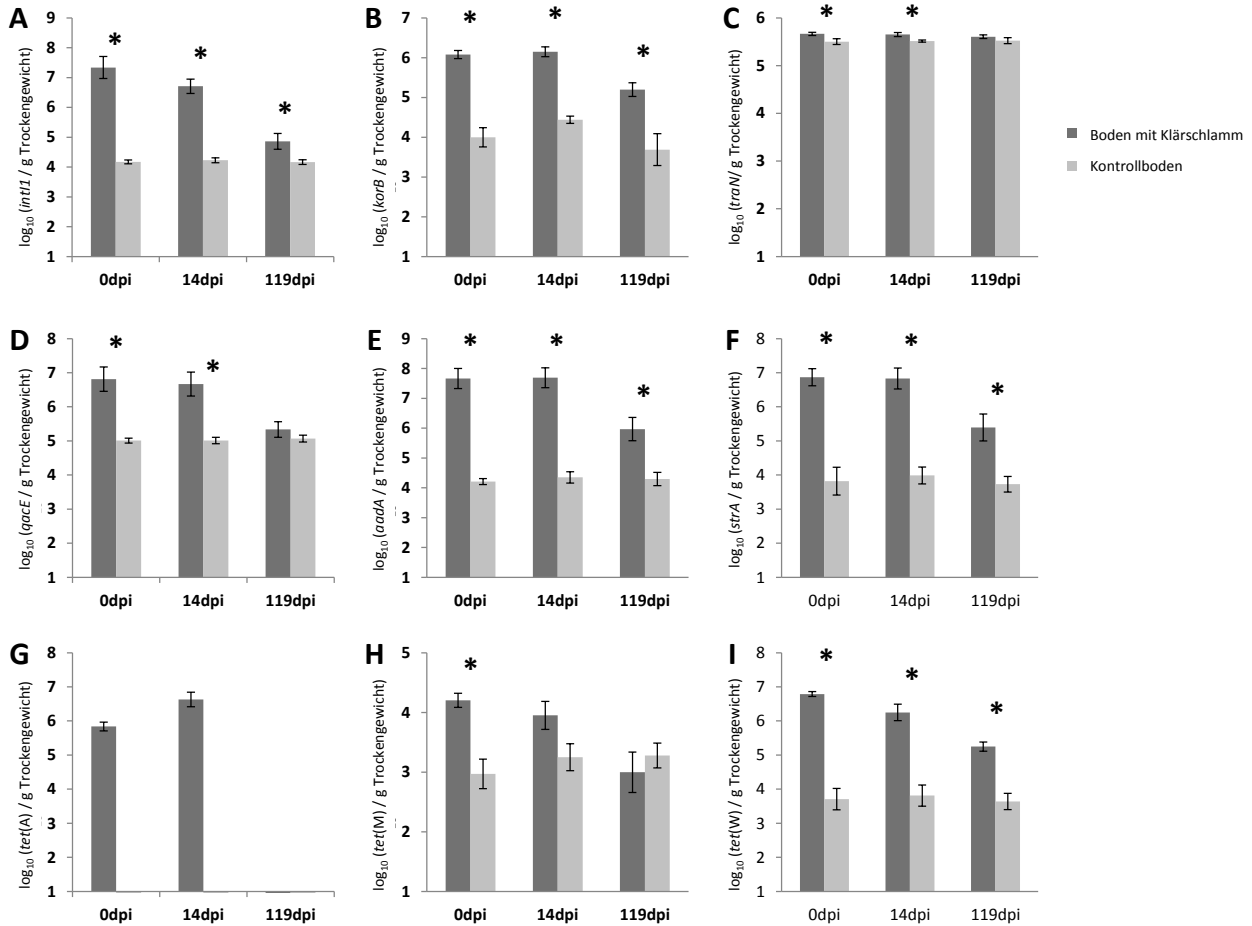
#### 4.6.2 Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm auf die Häufigkeit von mobilen genetischen Elementen und Resistenzgenen im Boden

In den folgenden Experimenten sollte die Hypothese untersucht werden, dass nach Zugabe von Klärschlamm erhöhte Abundanzen mobiler genetischer Elemente und Resistenzgene im Boden zu finden sind. Eine weitere Hypothese ist, dass in Klärschlämmen Plasmide auch auf HP übertragen werden und diesen unter bestimmten Bedingungen einen Selektionsvorteil verschaffen können. Durch die Verbreitung von Plasmiden oder Integrone können auch multiresistente Keime entstehen.

##### 4.6.2.1 Quantifizierung von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen mittels qPCR Biofilmassay

Es wurden Analysen zur Abundanz verschiedener mobiler genetischer Elemente und Gene, die Resistenzen gegen Desinfektionsmittel oder Antibiotika verleihen, in Klärschlämmen und in mit Klärschlamm behandelten Böden in Abhängigkeit von der Zeit durchgeführt. Für *int11* (Klasse I-Integrone), *korB* (IncP-1 Plasmide), *traN* (LowGC-Plasmide), *qacE* (Resistenz gegen quarternäre Ammoniumverbindungen), *aadA*, *strA* (Streptomycin-Resistenz), *tet(A)*, *tet(M)*, *tet(W)* (Tetracyclin-Resistenz) wurden die Abundanzen in Boden, der mit Klärschlamm behandelt wurde, verglichen mit den Abundanzen in Kontrollboden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 und Abbildung 26 dargestellt.

Abbildung 25 Absolute Häufigkeiten von Integrons, Plasmiden und Resistenzgenen in Boden, der mit Klärschlamm behandelt wurde, im Vergleich zu Kontrollboden jeweils 0, 14 und 119 Tage nach der Behandlung des Bodens mit Klärschlamm.

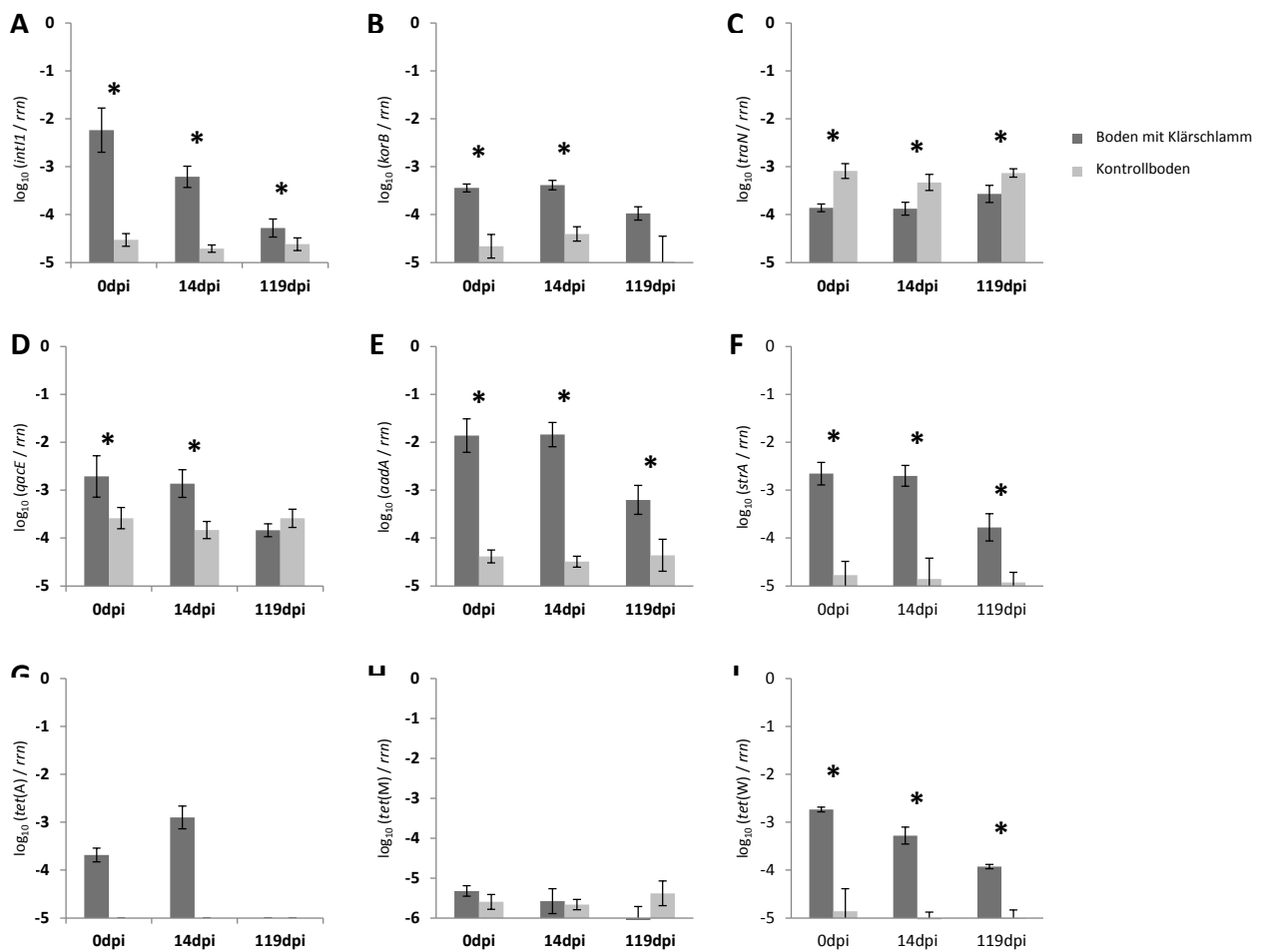


Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede (P<0,05) laut t-Test.

Für die Gene *intI1* (Klasse I-Integrons), *korB* (IncP-1 Plasmide), *traN* (LowGC-Plasmide), *qacE* (Resistenz gegen quarternäre Ammoniumverbindungen), *aadA*, *strA* (Streptomycin-Resistenz), *tet(A)*, *tet(M)* und *tet(W)* (Tetracyclin-Resistenz) wurden signifikant erhöhte Abundanzen der Genkopienzahlen pro Gramm Boden in Klärschlamm behandeltem Boden im Vergleich zum Kontrollboden gefunden (Abbildung 25). Nach vier Monaten Inkubation der Mikrokosmen wurden noch signifikante Unterschiede der Genkopienzahlen für *intI1*, *korB*, *aadA*, *strA* und *tet(W)* detektiert.



Abbildung 26 Relative Abundanzen von Integrons, Plasmiden und Resistenzgenen in Boden, der mit Klärschlamm behandelt wurde, im Vergleich zu Kontrollboden jeweils 0, 14 und 119 Tage nach der Behandlung des Bodens mit Klärschlamm.



Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) laut t-Test.

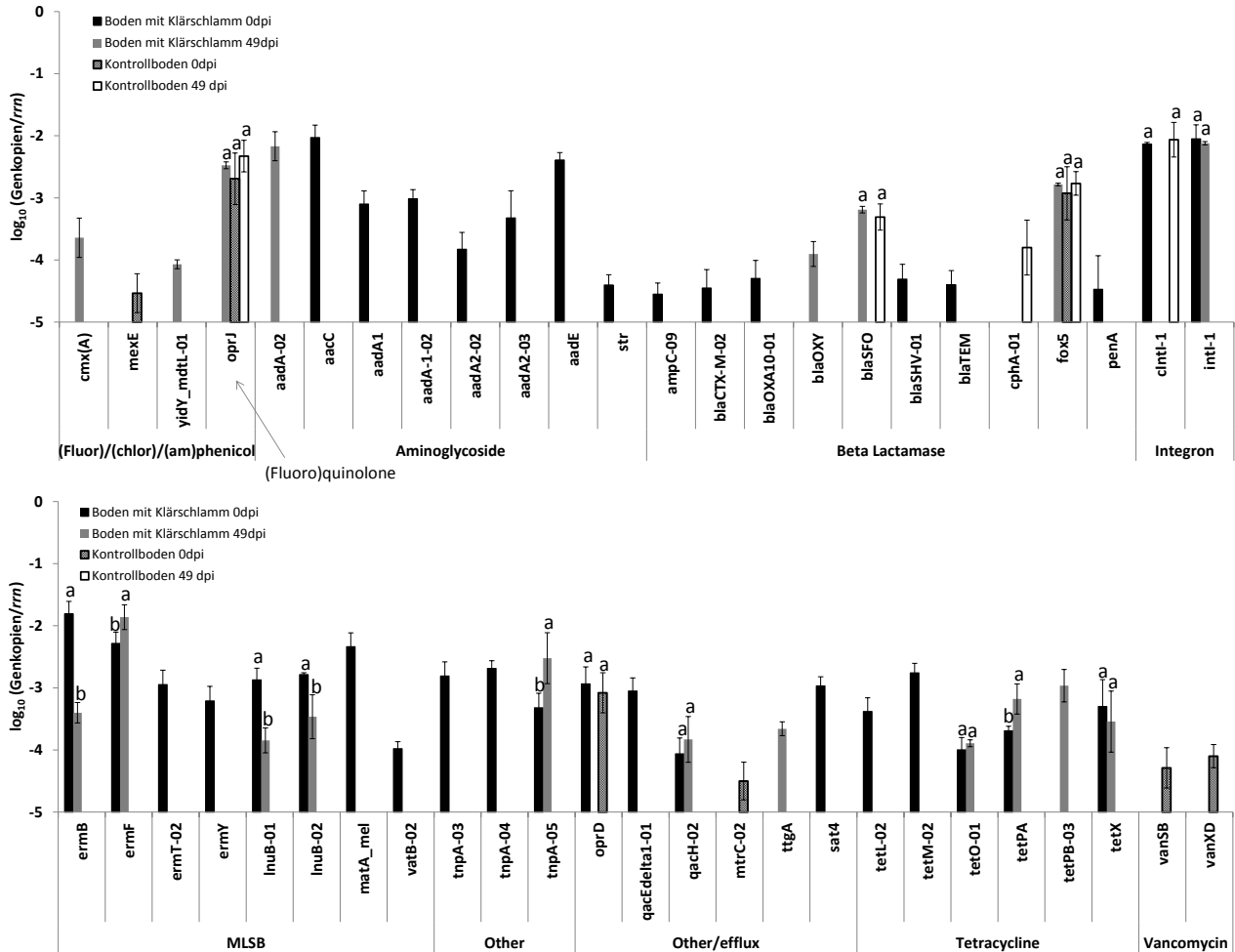
Die Quantifizierung von MGE und Resistenzgenen in Boden mit Klärschlamm im Vergleich zu unbehandeltem Boden in Proben zeigte 0 dpi signifikant höhere relative Abundanzen für sieben der neun quantifizierten Zielgene (Abbildung 26). Nach vier Monaten Inkubation der Mikrokosmen wurden signifikant erhöhte relative Abundanzen in Klärschlamm-behandeltem Boden im Vergleich zum Kontrollboden für *intI1* (Klasse I-Integrone), *aadA*, *strA* (Streptomycin-/Spectinomycin-Resistenz) und *tet(W)* (Tetracyclin-Resistenz) gefunden.

#### 4.6.2.2 High-throughput quantitative PCR (SmartChip) zur Quantifizierung von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen

Da anhand der Quantifizierung mittels qPCR (4.6.2.1) Unterschiede der Häufigkeiten von Integrone, Plasmiden und Resistenzgenen in Klärschlamm-behandeltem Boden im Vergleich zum unbehandeltem Boden für einige der untersuchten Gene gefunden wurden, sollten weitere Untersuchungen mithilfe quantitativer PCR-Arrays (vgl. ZHU et al. 2013) durchgeführt werden, um weitere Informationen zur Abundanz von bislang nicht erfassten Antibiotika-Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen zu erhalten. Dabei sollten Unterschiede zwischen Boden, der mit Klärschlamm behandelt wurde, im Vergleich zu unbehandeltem Kontrollboden sowie die Entwicklung der Abundanzen im Verlauf der

Zeit nach der Klärschlammbehandlung analysiert werden. In Proben von mit Klärschlamm behandeltem Boden und unbehandeltem Kontrollboden wurden 0 und 49 Tage nach der Klärschlammbehandlung höhere Abundanzen diverser Gene in Boden mit Klärschlamm im Vergleich zum unbehandelten Kontrollboden gefunden und somit die Ergebnisse der qPCR bestätigt sowie weitere Gene detektiert (Abbildung 27).

Abbildung 27 Relative Abundanzen in Boden mit Klärschlamm und unbehandeltem Boden nach 0 und 49 Tagen.



Angegebene Gene wurden in mindestens drei von vier biologischen Replikaten in allen drei technischen Replikaten detektiert.

Zu den detektierten Genen, die in höherer relativer Abundanz in Boden mit Klärschlamm im Vergleich zum unbehandelten Kontrollboden gefunden wurden, gehören Gene, die für Resistenzen gegen Chloramphenicol, Aminoglycoside, Beta-Lactam-Antibiotika oder Integrons codieren (Abbildung 27A) sowie Gene, die Resistenz gegenüber Macroliden, Lincosamiden und Streptogramin B (MLSB), Tetracyclinen oder anderen Antibiotika u.a. durch unspezifische Effluxmechanismen verleihen oder Transposasen codieren (Abbildung 27B).

### 4.6.3 Exogene Isolierung von Plasmiden aus Klärschlamm mittels „biparental mating“ und Charakterisierung der potentiellen Transkonjuganten

In diesem Experiment sollte die Hypothese untersucht werden, dass in Klärschlamm Plasmide vorkommen, die auf Gammaproteobakterien, zu denen auch viele HP gehören, übertragbar sind und dass diese Plasmide Resistenzen gegen Antibiotika tragen. Dazu wurden durch exogene Plasmidisolierung in ‚Biparental Matings‘ mittels Filtermating (vgl. 3.14) Plasmide aus Klärschlamm in den Rezipienten *Pseudomonas putida* KT2442 übertragen.

Bei Selektion auf Tetracyclin (30 µg/mL), Streptomycin (50 µg/mL) oder Gentamicin (10 µg) wurden jeweils potentielle Transkonjuganten gefunden, die weiter charakterisiert wurden. Ein Vergleich der BOX-PCR-Muster bestätigte, dass es sich bei den isolierten Transkonjuganten um den Rezipienten *P. putida* handelt. Insgesamt wurden 174 Transkonjuganten nach Selektion auf Tetracyclin (30 mg L<sup>-1</sup>) und 81 nach Selektion auf Streptomycin (50 mg L<sup>-1</sup>) isoliert (vgl. Tabelle 2). Aus allen untersuchten Transkonjuganten konnten Plasmide isoliert werden, die nach molekularer Charakterisierung zu den IncP-1 $\beta$  Plasmiden gehörten und Mehrfachresistenzen vermitteln. IncP-1 Plasmide haben einen weiten Wirtsbereich und transferieren effizient im Boden oder im Klärschlamm.

Tabelle 2 Überblick über isolierte Transkonjuganten im Rezipienten *Pseudomonas putida* KT2442 aus Klärschlamm nach Selektion aus Tetracyclin (30 mg L<sup>-1</sup>) oder Streptomycin (50 mg L<sup>-1</sup>) sowie isolierte Plasmide aus den Transkonjuganten.

Selektivmedium	Zahl der Transkonjuganten	extrahierte Plasmide
TC <sup>30</sup>	174	100 (88/88)
SM <sup>50</sup>	81	100 (10/10)

Resistenztests (vgl. Tabelle 3) zeigten das Vorhandensein von Resistenzen gegen Tetracyclin (30 µg/mL), Streptomycin (50 µg/mL), Gentamicin (10 µg), Quecksilber (30 µg/mL), Doxycyclin (30 µg/mL) und das als Desinfektionsmittel verwendete Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, 5 µg).

Tabelle 3 Überblick über die Ergebnisse der Resistenztests gegen Antibiotika sowie als Desinfektionsmittel verwendete Chemikalien mit den aus Klärschlamm isolierten Transkonjuganten.

Isoliert von	Tc <sup>30</sup>	Sm <sup>50</sup>	Gm <sup>10</sup>	Hg <sup>30</sup>	Dox <sup>30</sup>	CTAB <sup>5</sup>
TC <sup>30</sup>	100 (136/136)	94,9 (129/136)	29,4 (40/136)	3,7 (5/136)	99,3 (135/136)	99,3 (135/136)
SM <sup>50</sup>	52,4 (11/21)	100 (21/21)	0 (0/21)	4,8 (1/21)	52,4 (11/21)	100 (21/21)

Mittels Real-time PCR wurden die Gene *intI1* (Klasse I-Integrans), *tet(A)* (Tetracyclin-Resistenz), *qacE*-Resistenz gegen quarternäre Ammoniumverbindungen, *korB* (IncP-1 Plasmide) in den Trans-

konjuganten detektiert. Die Resistenzgene *tet(M)* und *tet(W)* wurden in Real-time PCRs nicht detektiert.

Tabelle 4 Detektion von Integrans, Plasmiden und Resistenzgenen in Transkonjuganten aus Klärschlamm mittels Real-time PCR.

Isoliert von	<i>intl1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>qacE</i>	<i>IncP-1</i>	<i>IncP1ε</i>
TC <sup>30</sup>	97,1 (132/136)	91,9 (125/136)	0 (0/70)	0 (0/70)	94,6 (87/92)	96,5 (110/114)	95,5 (42/44)
SM <sup>50</sup>	52,4 (11/21)	42,9 (9/21)	0 (0/21)	0 (0/21)	81 (17/21)	95,2 (20/21)	N/A

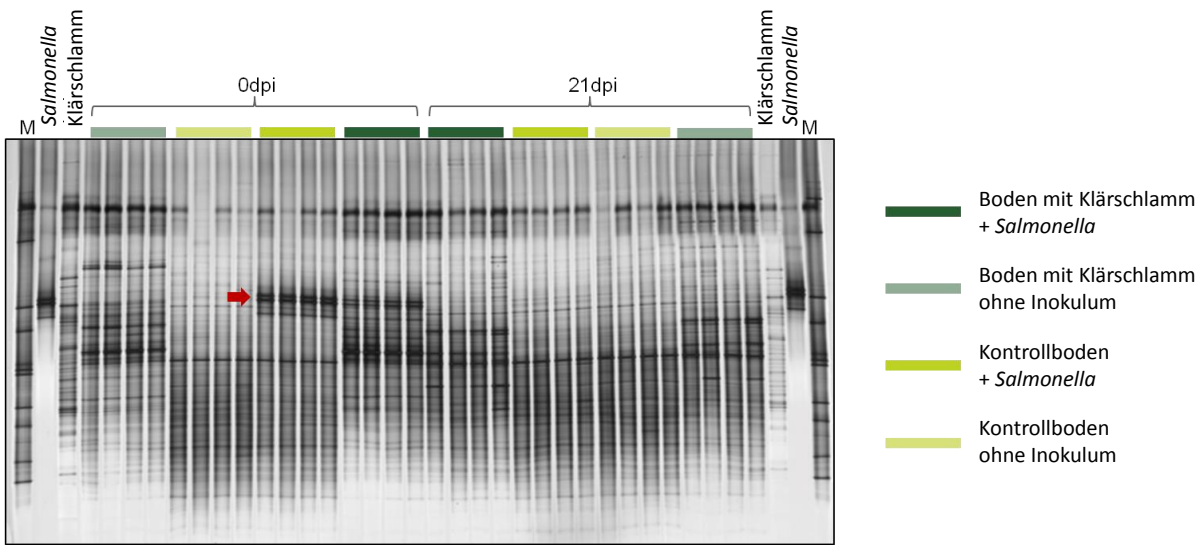
## 4.7 Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm auf die mikrobiellen Gemeinschaften im Boden

In den folgenden Versuchen sollten die mikrobiellen Gemeinschaften in Boden mit und ohne Klärschlamm untersucht werden und dabei die Hypothese überprüft werden, dass die Behandlung von DS-Boden mit Klärschlamm zu einer Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden führt. Es sollten die Taxa im Boden identifiziert werden, die nach Behandlung des Bodens mit Klärschlamm veränderte Abundanz zeigen, da diese möglicherweise für das schlechtere Überleben von LT2 im Boden nach Klärschlammbehandlung (6.3.1) mitverantwortlich sind.

### 4.7.1 Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften in mit Klärschlamm behandeltem Boden im Vergleich zu unbehandeltem Boden mittels DGGE

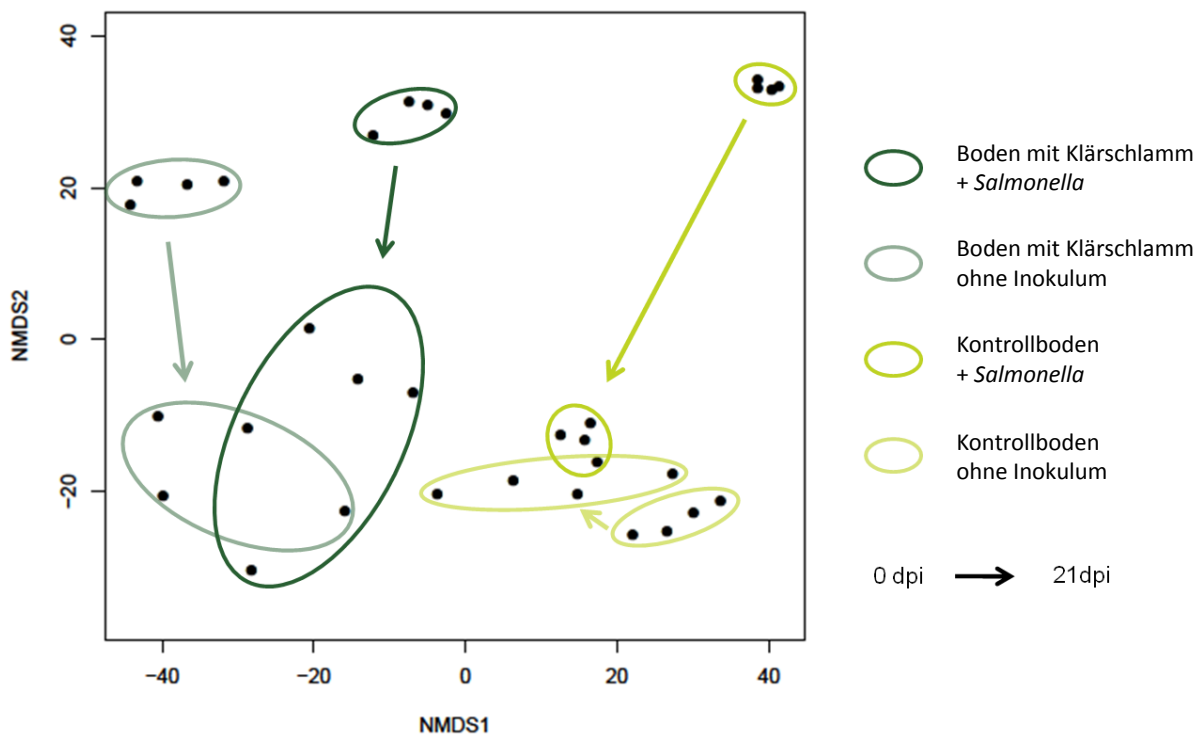
Zunächst wurde die DGGE genutzt, um die bakteriellen Gemeinschaften in Boden mit und ohne Klärschlamm zu charakterisieren und zu vergleichen. Diese Methode erlaubt es, verschiedene Proben anhand der Fingerabdrücke ihrer mikrobiellen Gemeinschaften zu vergleichen. Das DGGE-Gel (Abbildung 28) zur Analyse von Proben der Zeitpunkte 0 und 21 dpi aus dem Mikrokosmos-Langzeitversuch (4.3.1) zeigte, dass die Klärschlammbehandlung die bakteriellen Gemeinschaften im Boden stark verändert. Zudem waren bei den Proben mit Inokulation von LT2 in den Boden zum Versuchsstart (0 dpi) deutliche Banden im DGGE erkennbar, die 21 dpi schwächer waren.

Abbildung 28 Analyse der bakteriellen Gemeinschaften in Boden mit und ohne Klärschlamm mittels DGGE.



Aus der Analyse der Bandenmuster der Proben im DGGE-Gel konnte mithilfe der Software GelcompareII (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) eine Ähnlichkeitsmatrix exportiert werden, aus der ein NMDS-Plot erstellt werden kann (Abbildung 29). In diesen Plots sind Objekte, die weit voneinander entfernt sind, einander unähnlich, und je näher sie beieinander sind, desto ähnlicher sind sie.

Abbildung 29 Darstellung der bakteriellen Gemeinschaften in Boden mit und ohne Klärschlamm im NMDS-Plot.



Die Darstellung im NMDS-Plot veranschaulicht, dass sich die Bodenproben mit und ohne Klärschlamm im Hinblick auf ihre bakteriellen Gemeinschaften deutlich voneinander unterscheiden. Inokulation von LT2 in den Boden führte dazu, dass sich Proben mit und ohne Inokulation 0 dpi deutlich unterscheiden; nach 21 Tagen waren kaum noch Unterschiede zu erkennen.

Die Methode der DGGE ermöglicht es, viele Proben gleichzeitig auf einem Gel zu vergleichen um einen Überblick über die Proben zu gewinnen. Allerdings hat die Methode den Nachteil, dass Populationen durch mehr als eine Bande im Gel repräsentiert sein können oder die PCR-Produkte unterschiedliche Populationen dieselbe elektrophoretische Mobilität haben und nicht als unterschiedliche Banden im Gel erscheinen. Fingerabdrücke können zudem nur innerhalb eines Gels verglichen werden und daher ist die Anzahl der Proben, die vergleichend untersucht werden können limitiert. Außerdem müssen um Populationen zu identifizieren, Banden aus dem Gel ausgeschnitten, reamplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Daher wurde ergänzend zur DGGE die Methode der Illumina MiSeq Sequenzierung zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaften im Boden genutzt.

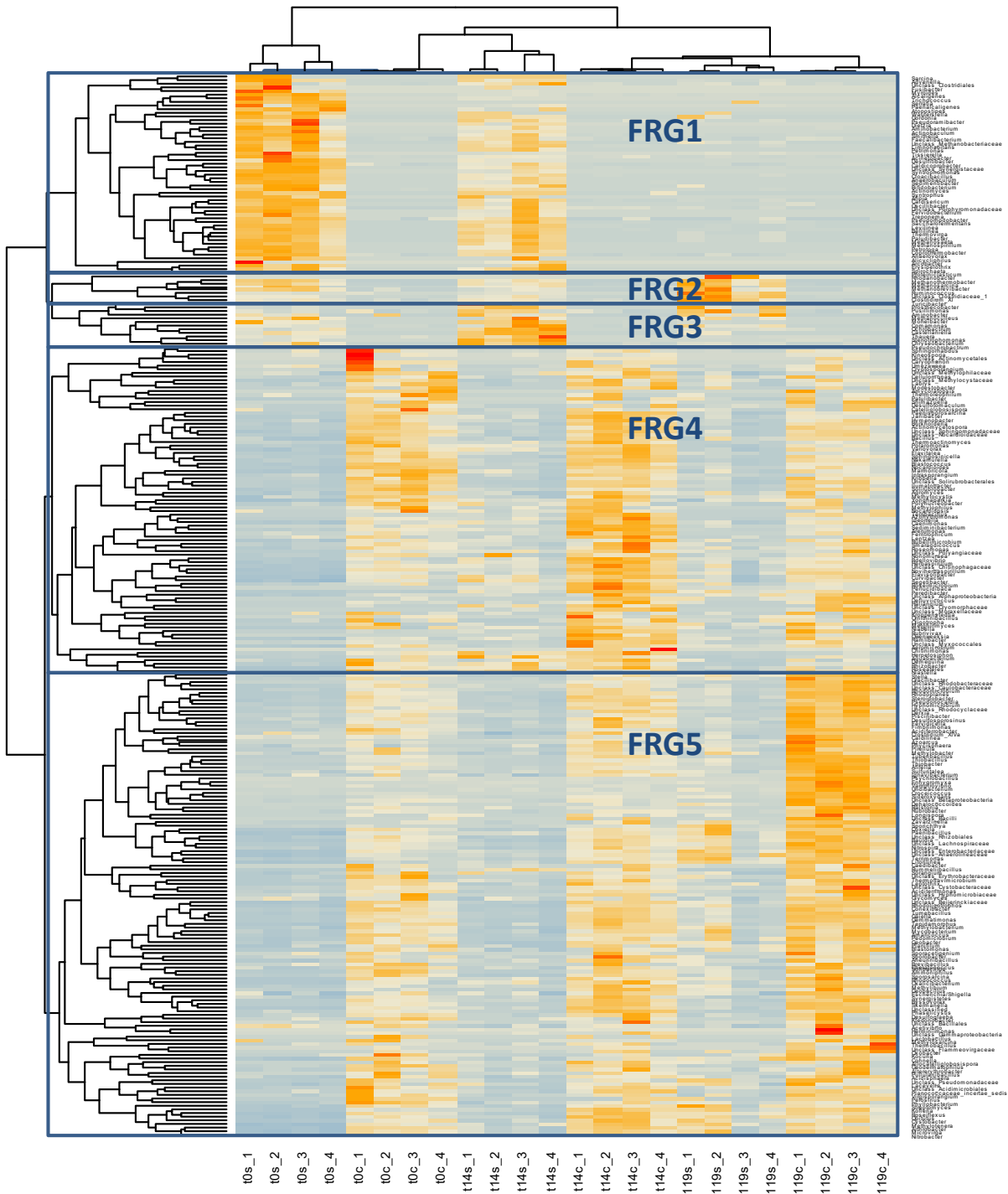
#### **4.7.2 Illumina MiSeq Sequenzierung zur Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm auf die Zusammensetzung des Bodenmikrobioms**

Bei der Illumina MiSeq Sequenzierung handelt es sich um eine Next-Generation Sequencing (NGS)-Methode, die es ermöglicht, Veränderungen der Zusammensetzungen mikrobieller Gemeinschaften als Reaktion auf Behandlungen oder im Verlauf der Zeit zu analysieren. Dominante Taxa können in den untersuchten Proben identifiziert werden sowie Taxa, deren Abundanz sich aufgrund einer Behandlung ändert. Dabei ermöglicht es diese NGS-Methode im Gegensatz zur DGGE auch Taxa mit niedriger relativer Abundanz zu identifizieren und zu verfolgen. Bodenproben von mit Klärschlamm behandeltem Boden und Proben von unbehandeltem Boden 21 Tage nach der Einarbeitung von Klärschlamm in den Boden wurden in je vier Replikaten mittels Illumina MiSeq Sequenzierung untersucht. Diese Bodenproben stammten aus dem Gewächshausversuch zur Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm auf die Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen durch LT2 (4.4.2). Die Ergebnisse zeigen, dass es z. T. signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung des Bodenmikrobioms zwischen den Böden mit Klärschlamm und den Kontrollböden ohne Klärschlamm gibt.

Ein weiteres Probenset, das aus dem Mikrokosmos-Langzeitversuch zur Analyse des Überlebens von LT2 in DS-Boden und des Einflusses von Klärschlamm und Präadaption in Salatmedium auf das Überleben (4.3.1) stammt, wurde ebenfalls mittels Sequenzierung von 16S rRNA-Genfragmenten untersucht. Es wurden jeweils vier Replikate von Bodenproben mit oder ohne Klärschlamm der Zeitpunkte 0, 14 und 119 dpi analysiert.

Aus den Ergebnissen der Illumina-Sequenzierung wurden ein OTU-Report erstellt und die Taxa identifiziert, die signifikant auf die Behandlung mit Klärschlamm reagieren. Daraus wurde die in Abbildung 30 gezeigte „Heatmap“ auf Genus Level erzeugt, um einen Überblick über den Effekt der Behandlung mit Klärschlamm auf die bakterielle Gemeinschaft des Bodens zu erlangen. Anhand dieser Heatmap wurden die in der Abbildung gezeigten sogenannten ‚Response Groups‘ definiert und deren Signifikanz und damit die nicht zufällige Verteilung bestätigt ( $P < 0,05$ ).

Abbildung 30 Heatmap auf Genus-Ebene zur Veranschaulichung des Effekts der Klärschlammbehandlung auf die bakterielle Gemeinschaft im Boden 0, 14 und 119 Tage nach der Klärschlammbehandlung.

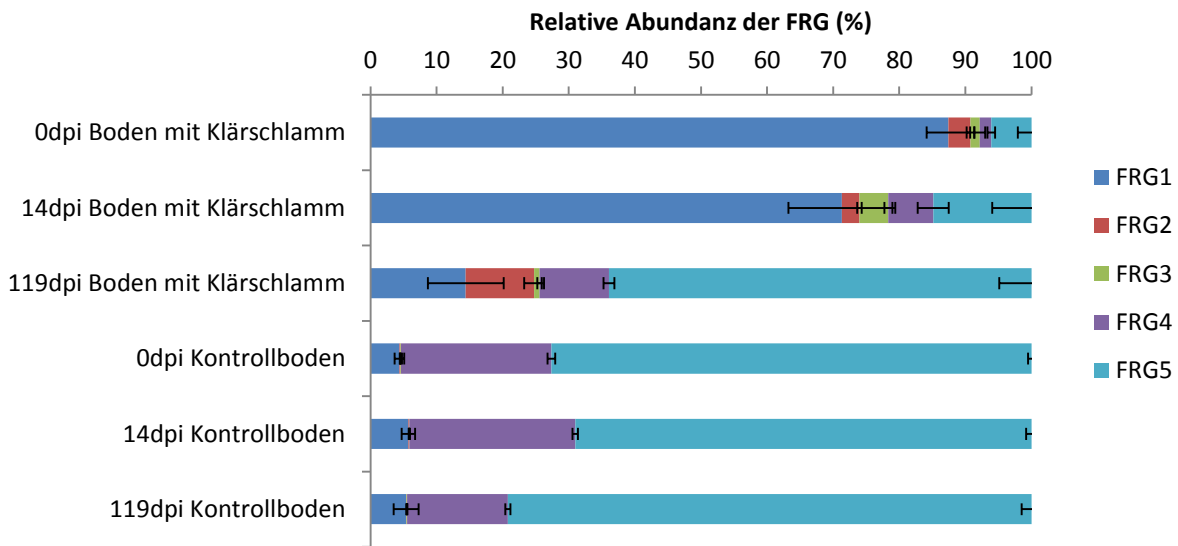


V.l.n.r.: 0, 14, 119 dpi jeweils Boden mit Klärschlamm in vier Replikaten und Kontrollboden in vier Replikaten.

Die relativen Häufigkeiten der in Abbildung 30 dargestellten Response Groups in den untersuchten Klärschlammproben des Langzeitexperiments sind in Abbildung 31 dargestellt.

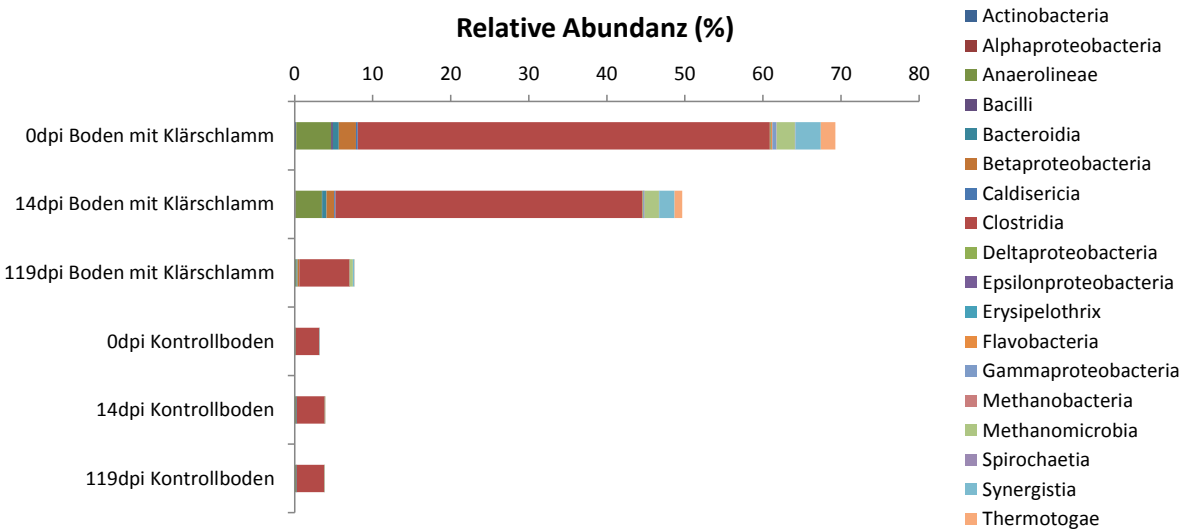


Abbildung 31 Überblick über die Verteilung der Häufigkeiten der definierten Response Groups in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi.



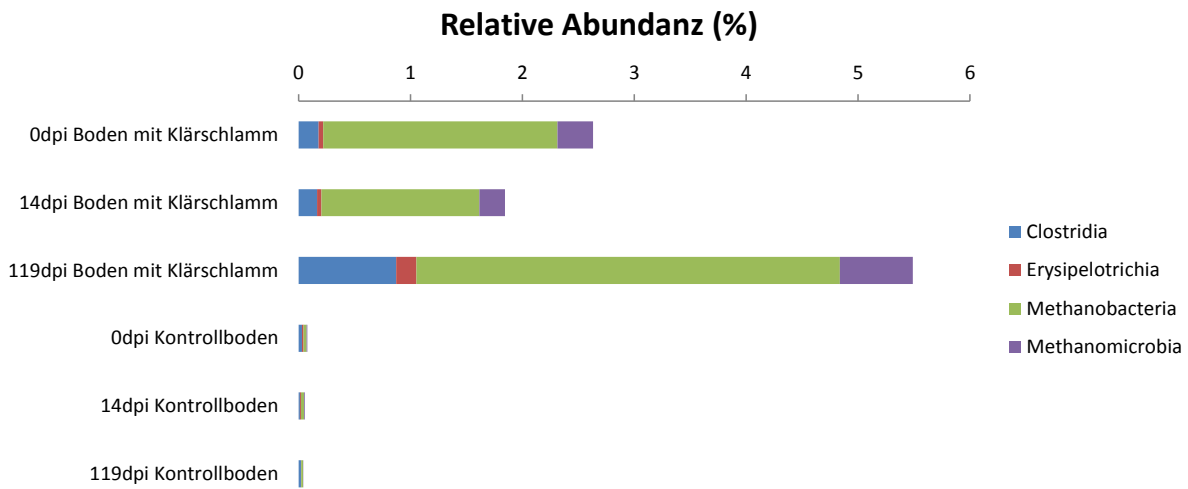
In dem Boden, der mit Klärschlamm behandelt wurde, ist die Response Group 1 in den Proben 0 und 14 dpi die mit der größten Häufigkeit, während in den Kontrollproben sowie im Boden mit Klärschlamm nach 119 Tagen Response Group 5 die größte Häufigkeit zeigt. Die folgenden Abbildungen zeigen die relativen Häufigkeiten der Taxa in den Response Groups 1 bis 5.

Abbildung 32 Relative Häufigkeiten der Taxa der Response Groups 1 in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi.



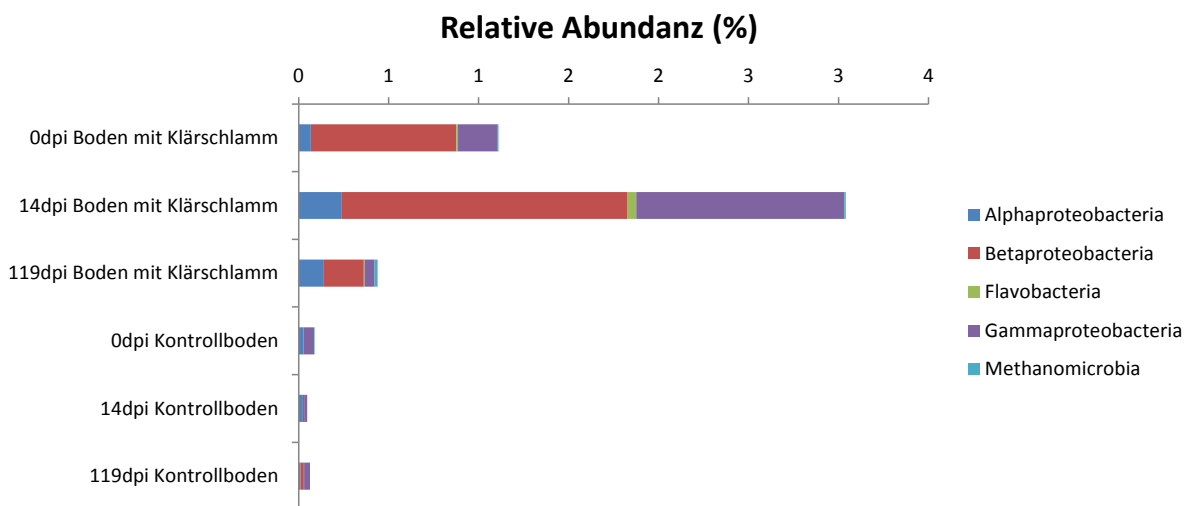
Innerhalb der Response Group 1 (Abbildung 32) sinkt die relative Häufigkeit der *Clostridia* von 53% 0 dpi auf 39% 14 dpi und 6% 119 dpi. In den Kontrollproben liegt die Abundanz bei etwa 3%.

Abbildung 33 Relative Häufigkeiten der Taxa der Response Group 2 in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi.



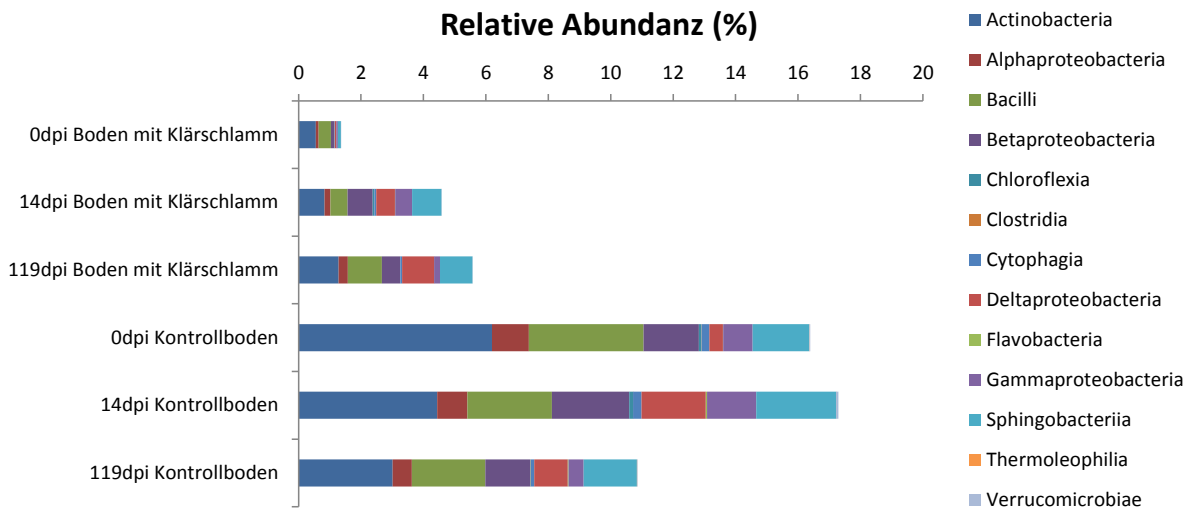
In der Response Group 2 (Abbildung 33) beträgt die Häufigkeit der *Methanobacteria* 0 dpi 2%, 14 dpi 1% und 119 dpi 4%.

Abbildung 34 Relative Häufigkeiten der Taxa der Response Group 3 in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi.



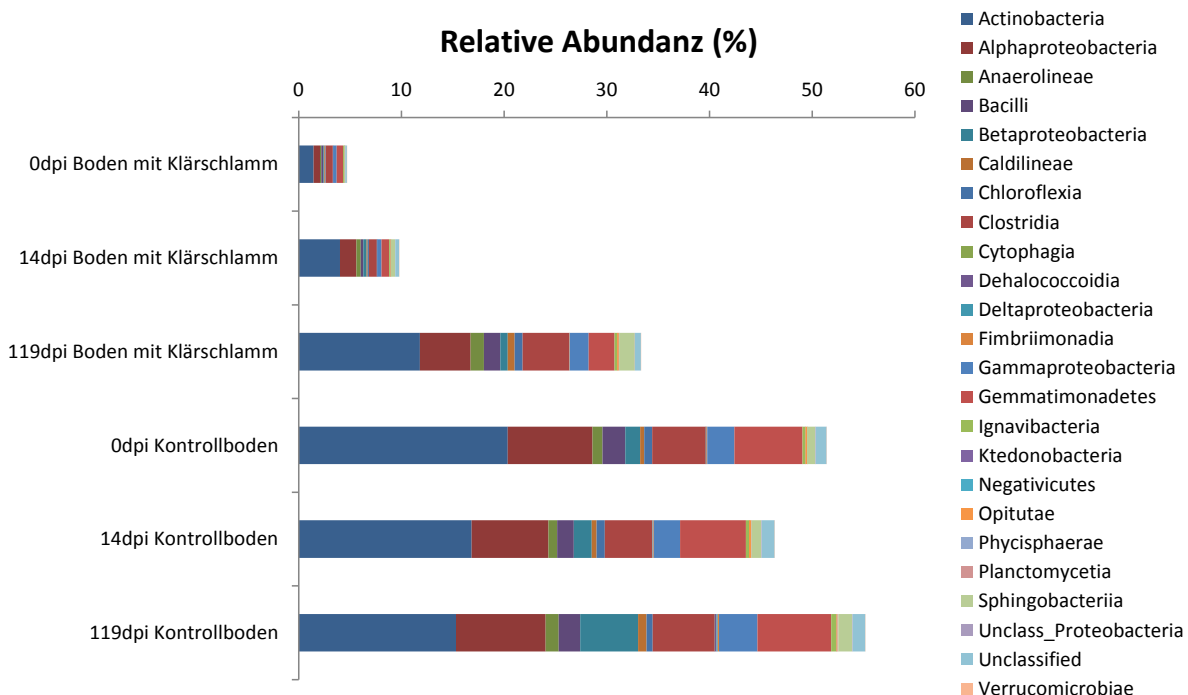
Die Häufigkeit der *Betaproteobacteria* in der Response Group 3 (Abbildung 34) beträgt 0 dpi 1%, 14 dpi 2% und 119 dpi 0% und die der *Gammaproteobacteria* 0 dpi 0%, 14 dpi 1% und 119 dpi 0%.

Abbildung 35 Relative Häufigkeiten der Taxa der Response Group 4 in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi.



Die Taxa, die in der Response Group 4 (Abbildung 35) zusammengefasst sind, sind in Kontrollproben in höherer Abundanz zu finden als in den Proben des mit Klärschlamm behandelten Bodens.

Abbildung 36 Relative Häufigkeiten der Taxa der Response Group 5 in den Bodenproben mit Klärschlamm sowie in den Kontrollproben jeweils zu den Probenahmezeitpunkten 0, 14 und 119 dpi.



In der Response Group 5 (Abbildung 36) ist die Häufigkeit der Taxa in den Kontrollproben wie in der Response Gruppe 4 größer als in den Proben mit Klärschlammbehandlung.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Behandlung des Bodens mit Klärschlamm die bakteriellen Gemeinschaften im Boden verändert und dass diese im Verlauf der Zeit wieder ähnlicher zu den Gemeinschaften im Kontrollboden werden, jedoch auch nach 119 Tagen noch ein Unterschied erkennbar ist. Die Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft durch die Behandlung mit Klärschlamm wird durch die Veränderung der Abundanzen der Response Groups abgebildet, wobei die größten Veränderungen bei der Häufigkeit von Response Group 5 zu finden sind.

### 4.7.3 Kultivierung von Isolaten aus Klärschlamm und Charakterisierung der Isolate

Zur weiteren Charakterisierung des Klärschlammes wurden aus Klärschlammproben vom Mai 2015 kultivierbare Isolate auf den selektiven Medien MacConkey-Agar, Chromocult-Coliform-Agar und Pseudomonas-Chromo-Agar jeweils ohne Zusatz von Antibiotika, mit Tetracyclin (15 µg/mL) oder Gentamicin (10 µg) isoliert. Bei der weiteren Charakterisierung ausgewählter Isolate auf Eosin-Methylen-Blau (EMB)-Agar, Trypton-Galle X-glucuronide (TBX)-Agar, Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar und *Salmonella*-Chromo-Agar wurden Isolate identifiziert, bei denen es sich laut Selektivmedien um *E. coli*, *Salmonella* oder *Pseudomonas* handelt und die möglicherweise HP oder Nosokomialkeime sein könnten. Bei diesen ausgewählten Isolaten wurden in Tests Resistenzen gegen Tetracyclin (30 µg/mL), Streptomycin (50 µg/mL), Gentamicin (10 µg), Quecksilber (30 µg/mL), Doxycyclin (30 µg/mL) und gegen das als Desinfektionsmittel verwendete Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, 5 µg) gefunden (s. Tabelle 5). Mithilfe von Real-time PCRs wurden zudem die Gene *intI1* (Klasse I-Integrans), *tet(A)* (Tetracyclin-Resistenz), *qacE* (Resistenz gegen quarternäre Ammoniumverbindungen) in den Transkonjuganten detektiert. Eine Plasmidextraktion zeigte, dass sieben der Isolate Plasmide enthielten.

Tabelle 5 Charakterisierung ausgewählter Isolate aus Klärschlamm

Isolat	Resistanztest <sup>1</sup>							BOX-PCR <sup>2</sup>	Plasmid-extr. <sup>3</sup>	real-time PCR		
	Tc <sup>30</sup>	Sm <sup>50</sup>	Gm <sup>10</sup>	Hg <sup>30</sup>	Dox <sup>30</sup>	CTAB <sub>5</sub>	ohne			<i>intI1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>qacE</i>
I11	-	-	-	+	-	++	+		-	-	-	0
I35	+	+	+	-	+	++	++	0	-	++	++	++
I41	0	-	+	-	-	+	+		-	-	-	+
I46	0	+	-	0	-	+	++	x	x	++	++	++
I48	0	+	-	+	-	++	++	x	x	++	++	++
I53	0	+	-	+	-	++	++	x	x	++	++	++
I58	0	+	-	-	-	++	++		-	-	-	++
I73	+	+	0	+	-	+	+	x	x	++	++	++
I74	+	+	0	+	-	+	+	x	x	++	++	++
I82	0	+	-	0	-	+	+	x	x	++	++	++
I91	+	0	-	0	-	+	+		-	-	-	+
I93	+	+	0	0	+	+	+	0	+	++	-	+
I95	+	+	0	-	+	+	+	0	-	-	-	+
I96	+	+	-	-	+	+	+		-	-	-	+
I97	+	-	-	-	+	+	+		-	-	-	+

Isolat	Resistanztest <sup>1</sup>							real-time PCR				
	Tc <sup>30</sup>	Sm <sup>50</sup>	Gm <sup>10</sup>	Hg <sup>30</sup>	Dox <sup>30</sup>	CTAB <sup>5</sup>	ohne	BOX-PCR <sup>2</sup>	Plasmid-extr. <sup>3</sup>	int11	tet(A)	qacE
I98	+	+	-	-	+	o	+		-	-	-	+
I101	+	+	+	-	+	+	+		-	-	-	o

Wachstumstest<sup>1</sup> auf Antibiotika-haltigem Müller-Hinton-Agar bzw. Agar ohne Antibiotikum als Kontrolle („ohne“), „+“ bedeutet Wachstum, „++“ starkes Wachstum, „o“ schwaches bzw. nicht eindeutiges Wachstum und „-“ kein Wachstum; <sup>2</sup>Isolate mit gleichem Symbol haben das gleiche BOX-Muster; <sup>3</sup>Isolate mit gleichem Symbol zeigen nach Plasmidextraktion ein Plasmid vergleichbarer Größe; „-“ bedeutet keine Plasmidbande.

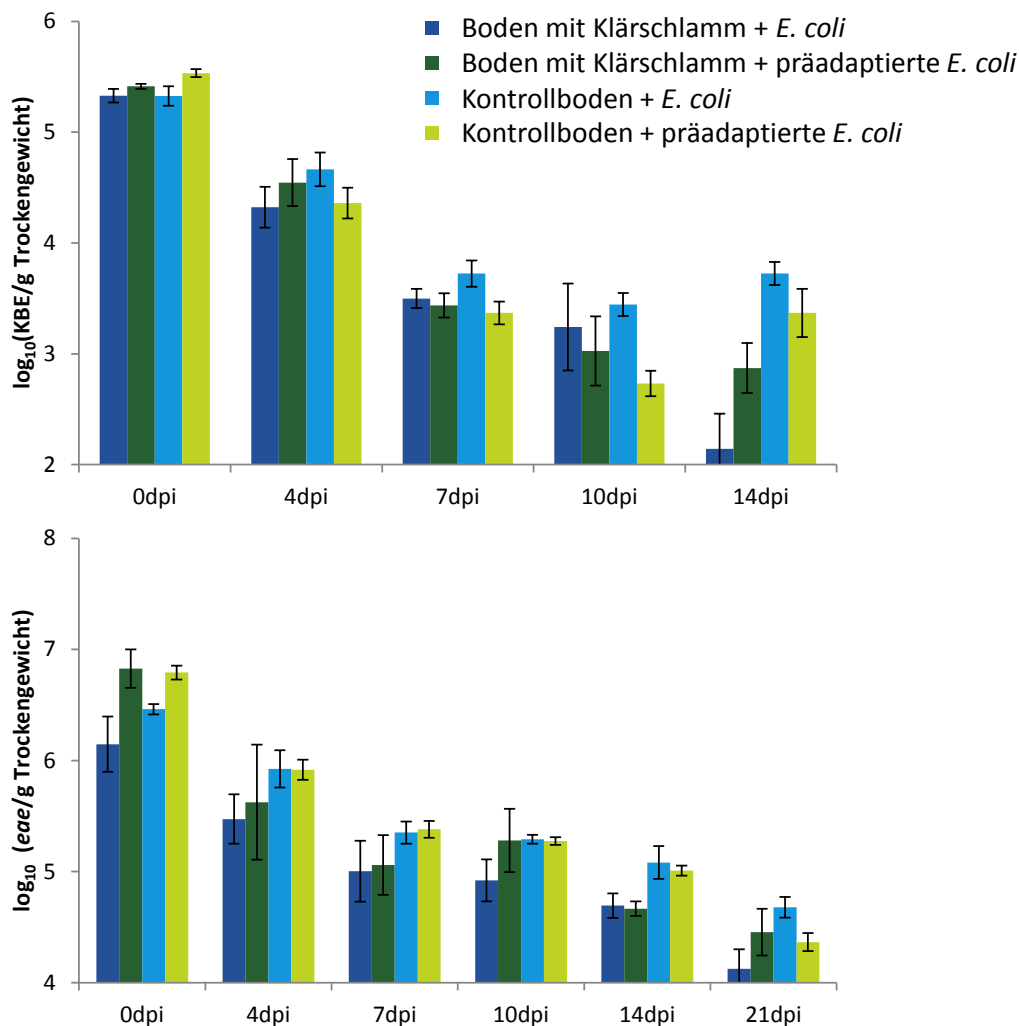
Ein Abschnitt des 16S rRNA-Gens der sieben Isolate, die Plasmide enthielten, wurde sequenziert, um Informationen über die Identität der Isolate zu erhalten. Ein Vergleich mit Sequenzen bakterieller 16S rRNA-Gene mittels BLAST zeigte für alle analysierten Isolate die größte Ähnlichkeit zur 16S rRNA von *Morganella morganii*, einem Bakterium, das häufig als Kommensal im Verdauungstrakt von Menschen und Säugetieren vorkommt und allgemein als harmlos angesehen wird. Einige Vertreter dieser Spezies tragen jedoch Resistenzplasmide und können nosokomiale Infektionen z.B. nach Operationen auslösen.

#### 4.8 Experimente zum Überleben von *Escherichia coli* O157:H7 in DS-Boden

Analog zu den Experimenten mit LT2 wurden Mikrokosmos- und Gewächshausversuche mit einem weiteren Modell-Humanpathogen, einem *Escherichia coli* O157:H7-Stamm, der keine Shiga-Toxine produziert, durchgeführt, um ggf. Unterschiede oder Gemeinsamkeiten im Verhalten der beiden Stämme vor allem in Bezug auf das Überleben im Boden, die mögliche Kolonisierung von Pflanzen und den Effekt von Klärschlamm identifizieren zu können. Die hierbei getestete Hypothese war, dass verschiedene Stämme unterschiedliches Verhalten zeigen.

##### 4.8.1 Überleben von *E. coli* O157:H7 in DS-Boden und Untersuchung des Einflusses von Klärschlamm und Präadaption in Salatmedium

Analog zu dem bereits mit LT2 durchgeführten Versuch wurde ein Mikrokosmosversuch mit *E. coli* O157:H7 durchgeführt, um zu untersuchen, inwiefern das Vorhandensein von Klärschlamm als nährstoffreicher Dünger und die Präadaption von *E. coli* O157:H7 in Salatmedium Einfluss auf das Überleben dieses Stamms im Boden haben. Wie bei dem Versuch mit LT2 gibt es sechs verschiedene Behandlungen: mit Klärschlamm behandelte Boden und unbehandelter Kontrollboden, jeweils inokuliert mit *E. coli* O157:H7 aus LB-Vorkultur, präadaptierten *E. coli* O157:H7 aus LM-Vorkultur oder ohne Inokulum. Das Überleben von *E. coli* O157:H7 im Boden wurde mit kultivierungsabhängigen und -unabhängigen Methoden verfolgt. Drei Wochen nach der Inokulation in den Boden konnten in allen Ansätzen *E. coli* O157:H7-Kolonien nachgewiesen werden und mittels qPCR die Anzahl der *E. coli* O157:H7 anhand der eae-Genkopien quantifiziert werden. Die KBE-Anzahl der *E. coli* O157:H7 sank innerhalb von drei Wochen um ca. 3 log-Einheiten (s. Abbildung 37).

Abbildung 37 KBE-Zahl von *E. coli* O157:H7 im Boden. Quantifizierung von *E. coli* O157:H7 im Boden.

A: KBE-Zahl von *E. coli* O157:H7. B: Quantifizierung von *E. coli* O157:H7 in Gesamt-DNA aus Boden mittels qPCR für das Gen *eae*.

Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die KBE-Anzahl der *E. coli* O157:H7 schneller absank als bei LT2 und damit *E. coli* O157:H7 unter den getesteten Bedingungen im Boden schlechter überlebt als LT2 (vgl. 4.3.1). Im Klärschlamm-behandelten Boden wurde eine höhere relative Abundanz des präadaptierten *E. coli* O157:H7 und damit die Tendenz zu besserem Überleben in Boden nach Präadaption in Boden ohne Klärschlamm gefunden. In unbehandeltem Boden war ein solcher Effekt im Gegensatz zum Experiment mit LT2 nicht zu beobachten (vgl. 4.3.1). Die Zugabe von Klärschlamm hatte eher negativen Einfluss auf das Überleben von *E. coli* O157:H7 im Boden. Die beobachteten Tendenzen konnten anhand der Quantifizierung des *eae*-Zielgens mittels qPCR bestätigt werden.

#### 4.8.2 Einfluss der Inokulation von *Meloidogyne hapla* auf die Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen mit *E. coli* O157:H7 unter Gewächshausbedingungen

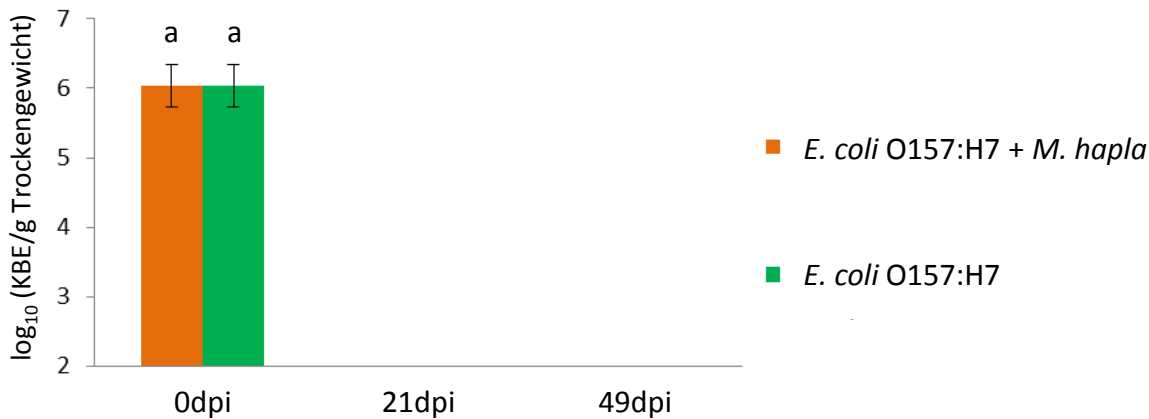
In einem Gewächshausversuch wurde untersucht, ob und inwiefern die Inokulation des pflanzenparasitären Nematoden *M. hapla* Einfluss auf das Überleben von *E. coli* O157:H7 im Boden hat und ob es zur Internalisierung von *E. coli* O157:H7 in Kopfsalatpflanzen kommt. Anhand der Ergebnisse des Versuchs mit LT2 wird eine der beiden Nematodengattungen *M. hapla* oder *P. crenatus* für ein Koinokula-

tionsexperiment mit *E. coli* O157:H7 ausgewählt. Es sollte die Hypothese untersucht werden, dass durch die Nematoden Eintrittsstellen geschaffen werden, die *E. coli* O157:H7 die Internalisierung in Kopfsalatpflanzen ermöglichen bzw. die Internalisierung begünstigen.

Die Infektion mit *M. hapla* unter Gewächshausbedingungen war sehr erfolgreich. Es konnten deutliche Symptome an den Pflanzen festgestellt werden und es wurden durchschnittlich 180 Nematoden pro Pflanze gezählt. Dies bestätigte die Beobachtungen der Infektionen von Kopfsalatpflanzen mit *M. hapla* in vorangegangenen Experimenten (4.5.2.1, 4.5.2.2).

Es konnte jedoch unter den untersuchten Bedingungen weder mit kultivierungsabhängigen noch mit kultivierungsunabhängigen Analysen eine Internalisierung von *E. coli* O157:H7 in der Phyllosphäre der Salatpflanzen nachgewiesen werden. Zu keinem Probenahmezeitpunkt wurde *E. coli* O157:H7 im Blattmaterial detektiert. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind im Hinblick auf die Internalisierung in Blattmaterial mit den Ergebnissen des Koinokulationsexperiments für LT2 vergleichbar.

Abbildung 38 Quantifizierung der kultivierbaren *E. coli* O157:H7 im Boden



Bei der Probenahme nach 21 Tagen waren *E. coli* O157:H7 in Boden- und Rhizosphärenproben nicht mehr quantifizierbar (s. Abbildung 38). Nach 49 Tagen wurden auch nach Anreicherung keine *E. coli* O157:H7 im Boden detektiert. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten, dass *E. coli* O157:H7 im Boden schlechter überlebt als LT2, und es wurde keine Kolonisierung von Pflanzen unter den getesteten Bedingungen beobachtet.

#### 4.9 Experimente zum Überleben von LT2 im Vergleich zu weiteren *Salmonella*-Stämmen: S. Senftenberg und 14028

In Zusammenarbeit mit einem neuen BMEL Verbundprojekt wurde untersucht, ob *Salmonella*-Stämme mit unterschiedlicher genetischer Ausstattung sich unterschiedlich in der Umwelt verhalten. Der Stamm S. Senftenberg exprimiert eine Version des Flagellins, die vom pflanzlichen Immunsystem nicht erkannt wird. Die in den folgenden Experimenten untersuchte Hypothese war, dass bestimmte genetische Faktoren entscheidend für die erfolgreiche Etablierung von HP an und in Kulturpflanzen sind und dass eine andere Variante des Flagellins einer dieser Faktoren sein könnte.



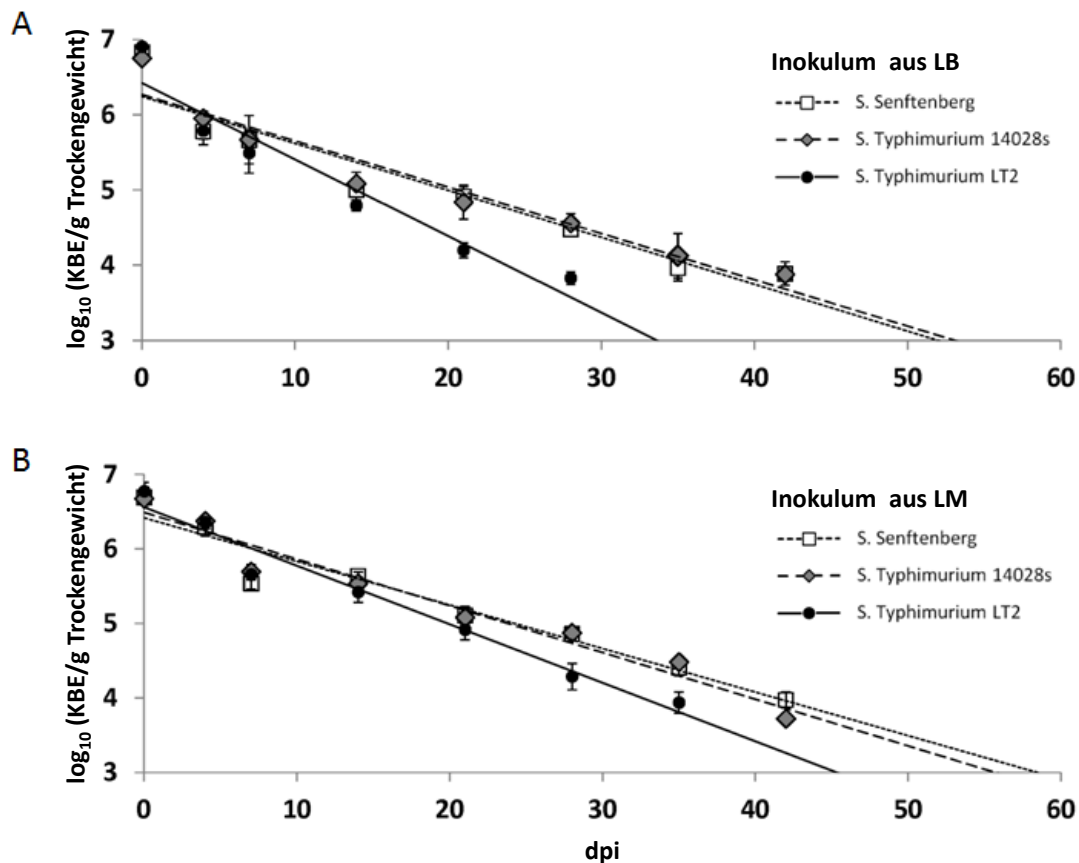
#### 4.9.1 Überleben von LT2 in DS-Boden im Vergleich zu 14028 und S. Senftenberg und Untersuchung des Einflusses drei verschiedener Arten der Präadaption

Die Hypothese, die in diesem Experiment untersucht werden sollte, war, dass 14028 und S. Senftenberg besser in DS-Boden überleben als der abgeschwächte Laborstamm LT2. Des Weiteren wurde die Hypothese untersucht, dass Präadaption bei allen untersuchten *Salmonella*-Stämmen zu verbessertem Überleben im Vergleich zu nicht präadaptierten Salmonellen aus LB-Medium führt.

Die Ergebnisse des Mikrokosmosexperiments zeigen, dass die Stämme 14028 und Senftenberg allgemein besser in DS-Boden überleben als der abgeschwächte Laborstamm LT2 (Abbildung 39) - und die aufgestellte Hypothese wurde damit bestätigt.

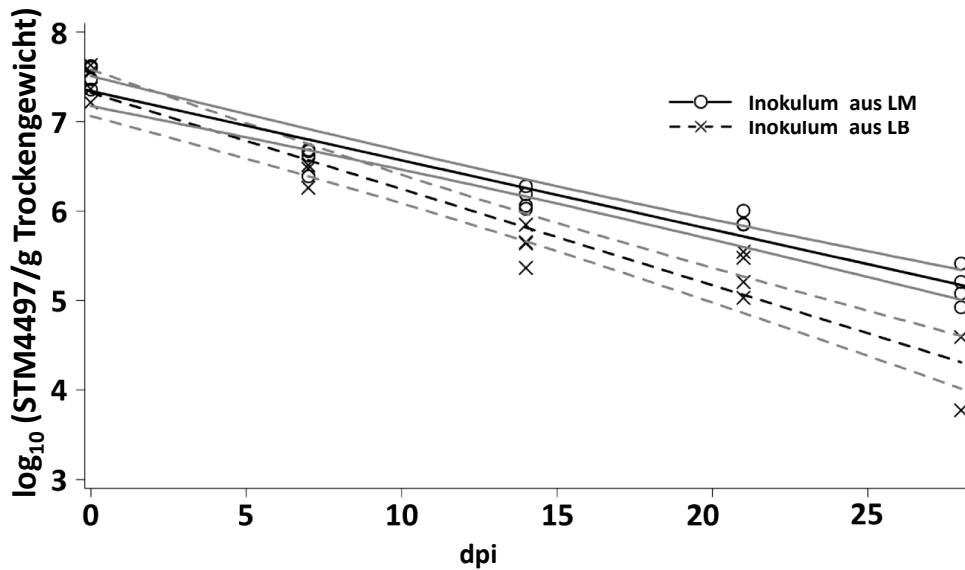
Außerdem wurde festgestellt, dass Präadaption durch Salatmedium bei allen drei untersuchten Stämmen zu verbessertem Überleben im Vergleich zu LB-Medium führt (Bestätigung vorangegangener Experimente für LT2; s. Abbildung 39).

Abbildung 39 Überleben von *Salmonella*-Stämmen im Boden nach Präadaption durch Salatmedium (lettuce medium, LM) im Vergleich zu nicht-präadaptierten Salmonellen aus LB.



Dieser Effekt ist besonders auffällig für den Stamm LT2, bei dem die Anzucht in LM im Vergleich zur Anzucht in LB dazu führt, dass der Stamm ca. 10 Tage länger im Boden mit kultivierungsabhängigen Methoden quantifizierbar bleibt. Die Ergebnisse wurden für LT2 mithilfe der spezifischen qPCR für *S. Typhimurium* bestätigt (Abbildung 40).

Abbildung 40 Quantifizierung von *Salmonella* im Boden anhand des Typhimurium-spezifischen Gens STM4497.



Graue Linien stellen 5% Konfidenzintervalle dar.

#### 4.9.2 *In vitro* Biofilmassay zur vergleichenden Analyse der Fähigkeit zur Biofilmbildung bei verschiedenen Stämmen und zur Untersuchung des Einflusses von Präadaption auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung E

Es ist wird vermutet, dass die Kolonisierung von Pflanzen durch bakterielle HP wesentlich durch ihre Fähigkeit, Biofilme zu bilden, beeinflusst wird (Yaron und Römling, 2014). Mittels *in vitro* Biofilmassay wurde die These untersucht, dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung mit Persistenz in der Umwelt und der Fähigkeit zur Kolonisierung von Pflanzen korreliert. Außerdem sollte überprüft werden, ob Präadaption die Biofilmbildung fördert. Es wurden verschiedene Humanpathogen-Modellstämme sowie zum Vergleich Stämme mit bekanntem Potential zur Biofilmbildung untersucht. Das Ergebnis des Biofilmassay ist in Abbildung 41 gezeigt, und die Ergebnisse der quantitativen Auswertung des Biofilmassays sind in Abbildung 42 dargestellt.

Abbildung 41 Ergebnis des Biofilmassay mit verschiedenen *Salmonella*-Stämmen und *E. coli* O157:H7.

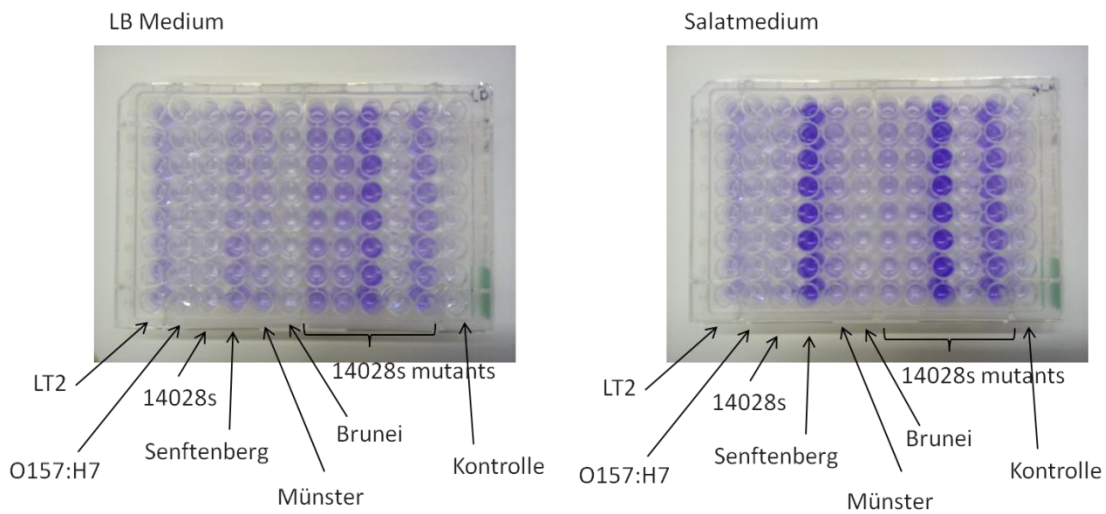
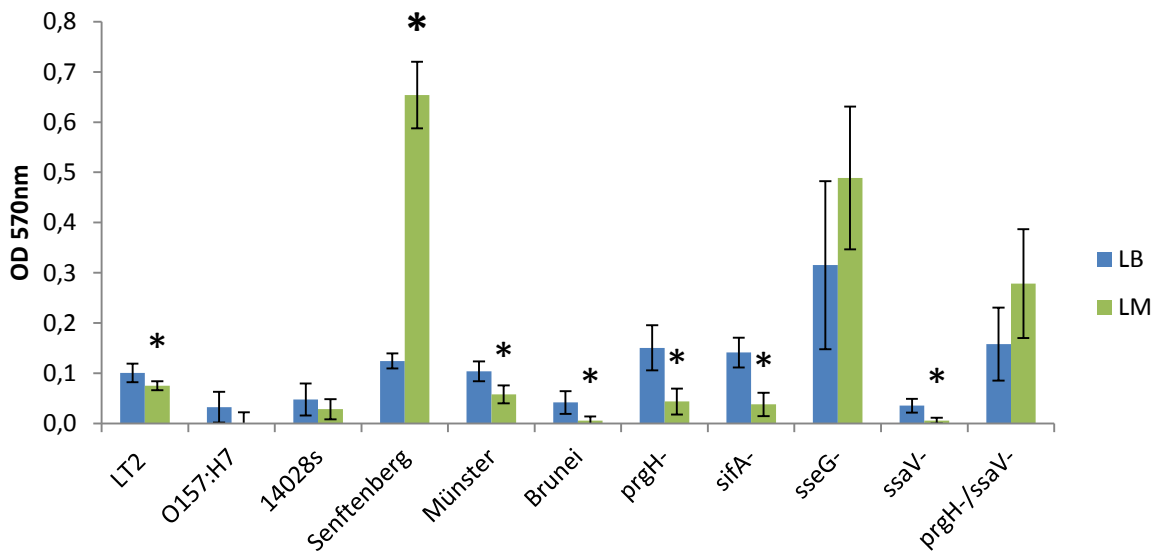


Abbildung 42 Quantitative Auswertung des Biofilmassay.



Mit einem Sternchen gekennzeichnet sind die Ergebnisse von Stämmen, bei denen der Unterschied der Biofilmbildung zwischen Wachstum in LB und Wachstum in LM signifikant ist ( $p < 0,05$ , Tukey-Test).

Der Biofilmassay zeigt, dass *E. coli* O157:H7 allgemein weniger Biofilm im Vergleich zu den getesteten *Salmonella*-Stämmen bildet. Bei Wachstum in Salatmedium ist eine deutlich stärkere Biofilmbildung bei *S. enterica* Serovar Senftenberg und den 14028 Mutanten *sseG*- und Doppelmutante *prgH*-/*ssaV*- im Vergleich zu den übrigen *Salmonella*-Stämmen zu beobachten. Außerdem ist bei *S. enterica* Serovar Senftenberg in Salatmedium eine deutlich stärkere Biofilmbildung im Vergleich zu Wachstum in LB zu beobachten. Die Mutante *sseG*- und die Doppelmutante *prgH*-/*ssaV*- zeigen eine stärkere Biofilmbildung bei Wachstum in Salatmedium im Vergleich zu Wachstum in LB.

#### **4.9.3 Gewächshausexperiment zur Analyse der Kolonisierung von Kopfsalatpflanzen mit LT2, 14028 und *S. enterica* Serovar Senftenberg bei Koinokulation von *M. hapla***

In diesem Gewächshausexperiment sollte untersucht werden, ob nach gemeinsamer Inokulation der phytopathogenen Nematoden *Meloidogyne hapla* und *Salmonella* durch die Koinokulation das Zusammentreffen von Nematoden und Bakterien erreicht wird bzw. vermehrt zustande kommt, sodass die Phytopathogene Eintrittsstellen für bakterielle HP in die Pflanze schaffen oder als Vektor fungieren können und so insgesamt die Wahrscheinlichkeit der Internalisierung der *Salmonella*-Stämme erhöht wird. Die Hypothese in diesem Experiment war, dass 14028 und *S. Senftenberg* im Gegensatz zum abgeschwächten Laborstamm LT2 in der Lage sind, Pflanzen zu besiedeln. Es wurden jedoch in diesem Experiment keine *Salmonella*-Stämme im Blattmaterial detektiert.

## 5 Schlussfolgerung/Fazit

Die Ökologie von HP wie beispielsweise *Salmonella* in der pflanzlichen Umwelt ist in vielen Details noch nicht ausreichend verstanden. Die im Projekt durchgeführten Arbeiten zeigen, wie komplex das Überleben von HP im Boden ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kontamination des Bodens mit LT2 oder *E. coli* O157:H7 nicht zwangsläufig zu einer Besiedlung der dort wachsenden Kopfsalatpflanzen mit den HP führen muss, sondern dass vielmehr die Bedingungen, unter denen eine Kontamination auftritt, das Schicksal von bakteriellen HP in der pflanzlichen Umwelt beeinflussen und darüber entscheiden, ob und in welchem Ausmaß sich die eingetragenen Bakterien in einem Habitat etablieren können. Im Rahmen des Projektes wurde unter anderem die Behandlung des Bodens mit Klärschlamm als ein wichtiger Einflussfaktor für das Überleben von LT2 und *E. coli* O157:H7 identifiziert.

Die durchgeführten Versuche zeigen das komplexe Zusammenspiel verschiedener Einflussfaktoren sowie Unterschiede zwischen Modellorganismen. Außerdem wurde gezeigt, dass Präadaption - also die Bedingungen, denen HP vor dem Einbringen in die untersuchte Umwelt ausgesetzt sind - wesentlichen Einfluss auf das Schicksal von HP haben kann. Daraus kann geschlossen werden, dass das Medium und allgemein die Bedingungen, unter denen bei Inokulationsexperimenten der untersuchte Organismus vor dem Einbringen in das entsprechende Habitat angezogen wird, enorm wichtig für den Ausgang des Experiments sein können und daher stärker berücksichtigt werden sollten, auch im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Studien. In diesem Zusammenhang wurden auch Hinweise darauf gefunden, dass es sich bei dem Einfluss der Präadaption um ein stammspezifisches Verhalten handelt. Für die Erforschung der Faktoren, die das Überleben und die Verbreitung von Pathogenen in der pflanzlichen Umwelt und auf Pflanzen beeinflussen, ist grundsätzlich wichtig, dass geeignete Nachweismethoden verfügbar sind. Hierbei ist es kritisch, dass diese Methoden spezifisch und sensitiv sowie an die untersuchte Matrix angepasst und eindeutig auswertbar sind.

Es wurde bereit gezeigt, dass HP Bakterien prinzipiell in der Lage sind Pflanzen zu besiedeln und Pflanzen zunehmend als alternative Wirte für HP wahrgenommen werden (Brandl, 2006; Schikora et al., 2012a). Es gibt allerdings auch Studien, in denen keine Internalisierung inokulierter HP festgestellt wurde (Erickson et al., 2014) und es wird davon ausgegangen, dass die Kolonisierung eher selten ist (Gu et al., 2011).

Zusammenfassend kann als Fazit der im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Experimente festgehalten werden, dass keine Internalisierung der Modellstämme LT2 oder *E. coli* O157:H7 in Kopfsalatpflanzen *L. sativa* cv. Tizian aus kontaminierten Böden unter den getesteten Bedingungen festgestellt wurde. Es konnte allerdings ein Langzeitüberleben von LT2 und *E. coli* O157:H7 im Boden in geringer Zelldichte gezeigt werden, wobei LT2 im Vergleich zu *E. coli* O157:H7 besser überlebte. Auch in weiteren Experimenten zum Einfluss von Präadaption und zur Fähigkeit der Biofilmbildung wurden Hinweise auf stammspezifisches Verhalten gefunden.

Als wesentliches Ergebnis kann zudem festgehalten werden, dass die Diversität und Abundanz von Mikroorganismen im Boden einen großen Einfluss auf das Schicksal der inokulierten bakteriellen HP haben. Nach Zugabe von Klärschlamm wurde eine erhöhte Anzahl der 16S rRNA-Genkopien im Vergleich zum Kontrollboden gefunden, sowie eine deutliche Veränderung der bakteriellen Gemeinschaften im Boden festgestellt. Dies kann zu erhöhter Konkurrenz um vorhandene Ressourcen im Boden führen; außerdem kann möglicherweise Antagonismus vorliegen. Hohe Diversität trägt dazu bei, die Etablierung von neu eindringender Populationen zu verhindern (Mallon et al., 2015). Dies bedeutet, dass bei Behandlung des Bodens mit Klärschlamm aufgrund der erhöhten Diversität ein geringeres Risiko vorliegt, dass sich HP Bakterien etablieren können. Die Möglichkeit der Kontamination von Pflanzen ist also geringer und konnte unter den getesteten Bedingungen nicht festgestellt werden. Ein mögliches Risiko der Klärschlammbehandlung liegt daher eher in der Übertragung von Resistenzen beispielweise durch horizontalen Gentransfer.

Der Einfluss von verschiedenen Bodenarten, organischem Dünger (Hühnertrockenkot, Schweinegülle) auf das Überleben von verschiedenen *Salmonella* Stämmen im Boden und in der Rhizosphäre und Phyllosphäre von Salat, Feldsalat und Tomaten wird derzeit im Rahmen des BMEL Verbundprojekts „Aufnahme von *Escherichia coli* und *Salmonella enterica*“ (BLE Forschungsvorhaben 13HS026 bis - 029) verfolgt.



## 6 Quellenverzeichnis

- Aruscavage, D., K. Lee, S. Miller und J.T. Lejeune, 2006: Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *Journal of Food Science* 71 (8), 89-99.
- Barak, J.D., L.C. Kramer und L.Y. Hao, 2011: Colonization of tomato plants by *Salmonella enterica* is cultivar dependent, and type 1 trichomes are preferred colonization sites. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2), 498-504.
- Barraud, O., M.C. Baclet, F. Denis und M.C. Ploy, 2010: Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (8), 1642-1645.
- Berg, G. und K. Smalla, 2009: Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbial Ecology* 68 (1), 1-13.
- Berger, C.N., S.V. Sodha, R.K. Shaw, P.M. Griffin, D. Pink, P. Hand und G. Frankel, 2010: Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12 (9), 2385-2397.
- Brandl, M.T., 2006: Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology* 44, 367-392.
- Brandl, M.T. und R.E. Mandrell, 2002: Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (7), 3614-3621.
- Bybd, D.W., T. Kirkpatrick und K.R. Barker, 1983: An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15 (1), 142-143.
- Clarke, B.O. und S.R. Smith, 2011: Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International* 37 (1), 226-247.
- Cooley, M.B., W.G. Miller und R.E. Mandrell, 2003: Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8), 4915-4926.
- Dingman, D.W., 2000: Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in bruised apple (*Malus domestica*) tissue as influenced by cultivar, date of harvest, and source. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (3), 1077-1083.
- Erickson, M.C., C.C. Webb, J.C. Diaz-Perez, L.E. Davey, A.S. Payton, I.D. Flitcroft, . . . M.P. Doyle, 2014: Absence of internalization of *Escherichia coli* O157:H7 into germinating tissue of field-grown leafy greens. *Journal of Food Protection* 77 (2), 189-196.
- Erlacher, A., M. Cardinale, R. Grosch, M. Grube und G. Berg, 2014: The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Frontiers in Microbiology* 5, 175.
- Fornefeld, E., A. Schikora, G. Berg, R. Grosch, A. Erlacher, T. Kühne und K. Smalla, 2015: Humanpathogene Bakterien auf Pflanzen. *Journal für Kulturpflanzen* 67 (9), 297-309.
- Garcia, V.G., M.A.P. Onco und V.R. Susan, 2006: Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4 (1), 55-79.
- Ge, C., C. Lee, E. Nangle, J. Li, D. Gardner, M. Kleinhenz und J. Lee, 2014: Impact of phytopathogen infection and extreme weather stress on internalization of *Salmonella* Typhimurium in lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 168-169, 24-31.
- Gu, G., J. Hu, J.M. Cevallos-Cevallos, S.M. Richardson, J.A. Bartz UND A.H. van Bruggen, 2011: Internal Colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Tomato Plants. *PLoS One* 6 (11), e27340.
- Guarddon, M., J.M. Miranda, J.A. Rodríguez, B.I. Vázquez, A. Cepeda und C.M. Franco, 2011: Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of *tetA* and *tetB* bacterial tetracycline resistance genes in food. *International Journal of Food Microbiology* 146 (3), 284-289.
- Heuer, H., C. Kopmann, C.T. Binh, E.M. Top und K. Smalla, 2009: Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low %G+C content. *Environmental Microbiology* 11 (4), 937-949.
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla und E.M.H. Wellington, 1997: Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8), 3233-3241.

- Heuer, H., G. Wieland, J. Schönfeld, A. Schönwälder, N.C.M. Gomes und K. Smalla, 2001: Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. *Protocols and Applications*, ed Rouchelle I. P. (Wymondham: Horizon Scientific Press), 177–190.
- Jacobsen, C.S. und T.B. Bech, 2012: Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Research International* 45 (2), 557-566.
- Jechalke, S., S. Dealtry, K. Smalla und H. Heuer, 2013a: Quantification of IncP-1 plasmid prevalence in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (4), 1410-1413.
- Jechalke, S., S. Schreiter, B. Wolters, S. Dealtry, H. Heuer und K. Smalla, 2013b: Widespread dissemination of class 1 integron components in soils and related ecosystems as revealed by cultivation-independent analysis. *Frontiers in Microbiology* 4, 420.
- Kim, H.J., S.H. Park und H.Y. Kim, 2006: Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 and non-LT2 *Salmonella* genomic sequences, and genotyping of *Salmonellae* by using PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9), 6142-6151.
- Kroupitski, Y., D. Golberg, E. Belausov, R. Pinto, D. Swartzberg, D. Granot und S. Sela, 2009: Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (19), 6076-6086.
- Leff, J.W. und N. Fierer, 2013: Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *Plos One* 8 (3), e59310.
- Mallon, C.A., J.D. Elsas und J.F. Salles, 2015: Microbial invasions: the process, patterns, and mechanisms. *Trends in Microbiology* 23 (11), 719-729.
- Manosalva, P., M. Manohar, S.H. VON Reuss, S. Chen, A. Koch, F. Kaplan, . . . D.F. Klessig, 2015: Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nature Communications* 6.
- Oliver, J.D., 2010: Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34 (4), 415-425.
- Peak, N., C.W. Knapp, R.K. Yang, M.M. Hanfelt, M.S. Smith, D.S. Aga und D.W. Graham, 2007: Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology* 9 (1), 143-151.
- Quilliam, R.S., A.P. Williams und D.L. Jones, 2012: Lettuce cultivar mediates both phyllosphere and rhizosphere activity of *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS One* 7 (3), e33842.
- Rizzo, L., C. Manaia, C. Merlin, T. Schwartz, C. Dagot, M.C. Ploy, . . . D. Fatta-Kassinos, 2013: Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the Total Environment* 447, 345-360.
- Rühlmann, J. und S. Ruppel, 2005: Effects of organic amendments on soil carbon content and microbial biomass - results of the long-term box plot experiment in Grossbeeren. *Archives of Agronomy and Soil Science* 51 (2), 163-170.
- Santamaría, J. und G.A. Toranzos, 2003: Enteric pathogens and soil: a short review. *International Microbiology* 6 (1), 5-9.
- Schikora, A., A.V. Garcia und H. Hirt, 2012a: Plants as alternative hosts for *Salmonella*. *Trends in Plant Science* 17 (5), 245-249.
- Schikora, M., B. Neupane, S. Madhogaria, W. Koch, D. Cremers, H. Hirt, . . . A. Schikora, 2012b: An image classification approach to analyze the suppression of plant immunity by the human pathogen *Salmonella* Typhimurium. *BMC Bioinformatics* 13.
- Schreiter, S., G.C. Ding, H. Heuer, G. Neumann, M. Sandmann, R. Grosch, . . . K. Smalla, 2014: Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Frontiers in Microbiology* 5, 144.
- Semenov, A.V., A.H. van Bruggen, L. van Overbeek, A.J. Termorshuizen und A.M. Semenov, 2007: Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS Microbial Ecology* 60 (3), 419-428.
- Simko, I., Y.G. Zhou und M.T. Brandl, 2015: Downy mildew disease promotes the colonization of romaine lettuce by *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *BMC Microbiology* 15.
- Smith, M.S., R.K. Yang, C.W. Knapp, Y. Niu, N. Peak, M.M. Hanfelt, . . . D.W. Graham, 2004: Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (12), 7372-7377.

- Solomon, E.B., S. Yaron und K.R. Matthews, 2002: Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (1), 397-400.
- Stepanovic, S., D. Vukovic, V. Hola, G. di Bonaventura, S. Djukic, I. Cirkovic und F. Ruzicka, 2007: Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115 (8), 891-899.
- Suzuki, M.T., L.T. Taylor und E.F. Delong, 2000: Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11), 4605-4614.
- Vital, M., F. Hammes und T. Egli, 2008: *Escherichia coli* O157 can grow in natural freshwater at low carbon concentrations. *Environmental Microbiology* 10 (9), 2387-2396.
- Walsh, F., A. Ingenfeld, M. Zampiccoli, M. Hilber-Bodmer, J.E. Frey und B. Duffy, 2011: Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems. *Journal of Microbiological Methods* 86 (2), 150-155.
- Weinert, N., R. Meincke, C. Gottwald, H. Heuer, N.C.M. Gomes, M. Schloter, . . . K. Smalla, 2009: Rhizosphere communities of genetically modified Zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (12), 3859-3865.
- Yaron, S. und U. Römling, 2014: Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology* 7 (6), 496-516.
- Zhu, Y.G., T.A. Johnson, J.Q. Su, M. Qiao, G.X. Guo, R.D. Stedtfeld, . . . J.M. TIEDJE, 2013: Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (9), 3435-3440.