

Abschlussbericht *plantinfect*

Justus-Liebig-Universität Gießen

Universität Osnabrück

Universität Hohenheim

IGZ, Leibniz-Institut für Gemüse und Zierpflanzenbau Großbeeren

Zuwendungsempfänger: Justus-Liebig-Universität Gießen Universität Osnabrück Universität Hohenheim IGZ, Leibniz-Institut für Gemüse und Zierpflanzenbau Großbeeren	Förderkennzeichen: 13HS026-29
Vorhabensbezeichnung: Aufnahme von <i>Escherichia coli</i> und Salmonellen in Pflanzen (<i>plantinfect</i>)	
Laufzeit des Vorhabens: 1.04.2015 bis 30.09.2018	
Berichtszeitraum: 01.04.2015 bis 30.09.2018	
Koordinator Dr. Sven Jechalke	

Zusammenfassung

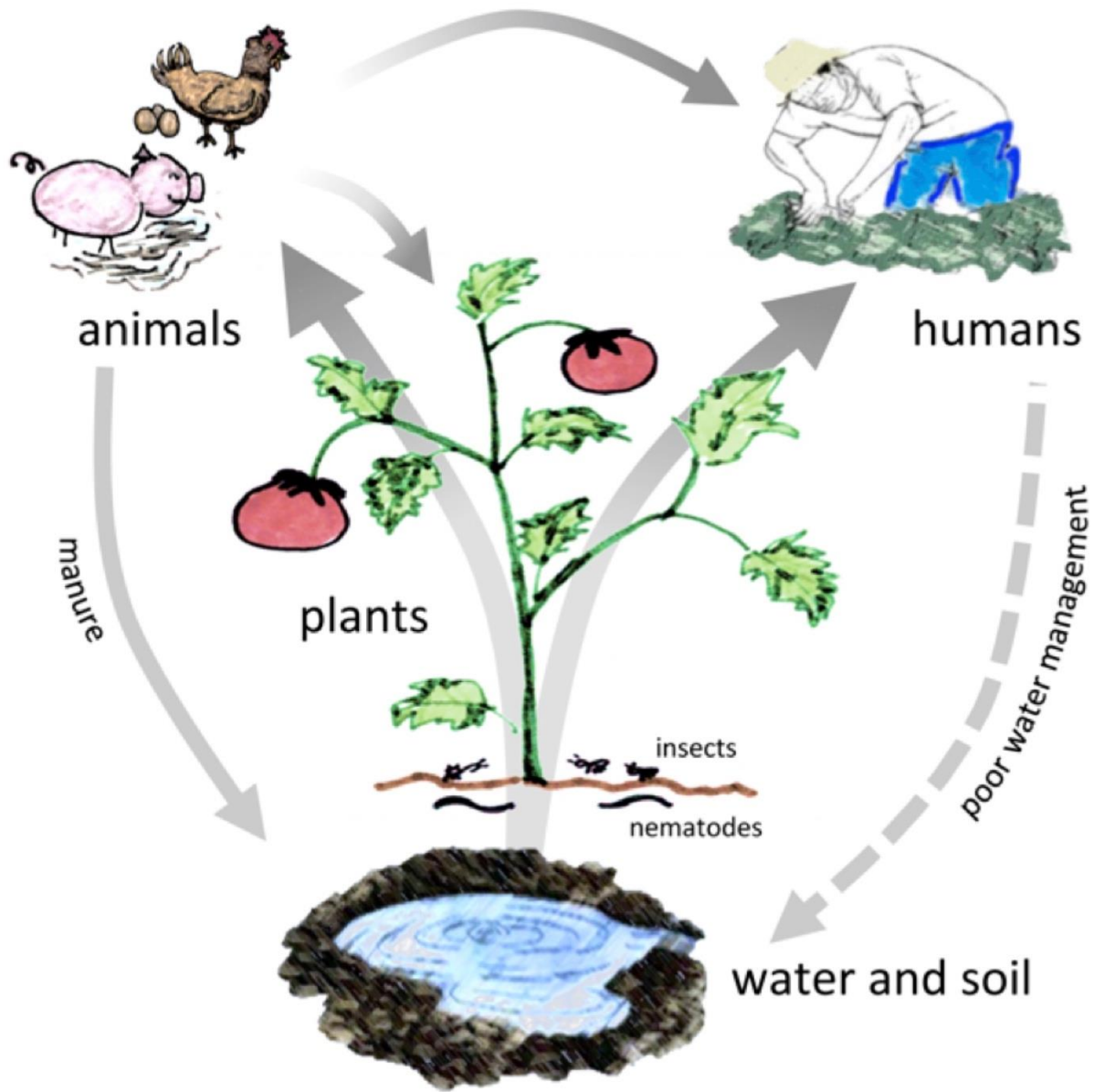
Humanpathogenen Bakterien (HPB) wie *Salmonella enterica* oder *Escherichia coli* sind in der Lage Kulturpflanzen besiedeln. Die Faktoren, die diese Besiedlung beeinflussen sind derzeit nur wenig untersucht. Ein Verständnis dieser Faktoren ist für die Bereitstellung von sicheren Frischeprodukten für den Verbraucher zwingend erforderlich. Im Rahmen des Projektes konnte gezeigt werden, dass die Populationen von *E. coli* und *S. enterica* in der Lage waren für mehrere Wochen im Boden zu überdauern. Als beeinflussende Faktoren wurden organische Düngung, Bodentyp und mikrobieller Diversität im Boden identifiziert. Sowohl Kopfsalat als auch Feldsalat wurden vom Boden ausgehend über die Wurzel besiedelt. Oberflächenstrukturen wie T3SS, Flagellen und Pili sind für die Kolonisierung ebenso von Bedeutung wie Bodentyp, Pflanzenart, Bakterienstamm und Zeitpunkt der Kontamination des Bodens. Nach Wachstum der Pflanzen in mit *S. enterica*-kontaminiertem Boden war eine geringe Befallshäufigkeit von 0,5-0,9% mit *S. enterica* besiedelter Pflanzen zu beobachten. Eine Kolonisierung der Pflanze kann auch über die Blätter erfolgen. *S. enterica* konnte auf und in Blättern mehrere Wochen nach einer Inokulation nachgewiesen werden. Für die Adhärenz von *E. coli* an Blättern wurden Ecp-Fimbrien als wichtiger Faktor identifiziert. Die erzielten Ergebnisse bezüglich der Zahl überdauerter HPB im Boden und der Befallshäufigkeit der Kulturpflanzen lassen einen Zusammenhang vermuten. Allerdings sind weitere Untersuchungen unter praxisnahen Bedingungen erforderlich, um die Zusammenhänge zwischen Zellzahl an HPB in Pflanzenanbausystemen, Bodenmikrobiom und Befallshäufigkeit aufzuklären. Das in diesem Projekt gewonnene bessere Verständnis der Genregulation der HPB und der Immunantwort der Pflanze während der Interaktion bietet Ansatzpunkte für neue Strategien einer Besiedlung mit HPB entgegen zu wirken. Diese könnten z.B. Züchtungsstrategien sein, die die Resistenz der Kulturpflanzen fördern und dazu beitragen dem Verbraucher sichere Lebensmittel zur Verfügung zu stellen.

Inhaltsverzeichnis

1	Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	10
1.1	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	11
1.1.1	Stand der Forschung.....	11
1.1.2	Eigene Vorarbeiten der Projektteilnehmer	13
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Spezifische Nachweisverfahren für HPB in Pflanzen und Böden (AP1)	16
2.1.1	Routinemäßige Kultivierung von Bakterienstämmen	16
2.1.2	Kultivierung-abhängige Quantifizierung von Salmonellen im Boden	16
2.1.3	Kultivierung-unabhängige Quantifizierung von Salmonellen im Boden	16
2.1.4	Nachweis von Salmonellen in der Phyllosphäre	17
2.1.5	Überleben von EHEC im Boden	17
2.1.6	„Viable but non-culturable“ (VBNC) Zustand	18
2.2	Aufnahme von HPB in Kulturpflanzen (AP2)	19
2.2.1	Zentralexperiment mit <i>Salmonella enterica</i>	19
2.2.2	Inokulationsexperimente mit <i>Escherichia coli</i> und Deletionsmutagenese	19
2.2.3	Inokulation von verschiedenen Pflanzenarten	20
2.2.4	Konstruktion von Stämmen und Plasmiden	21
2.2.5	Durchflusszytometrie.....	22
2.3	Verteilung der Bakterien an/in der Pflanze (AP3)	23
2.3.1	Visualisierung der Pflanzenbesiedlung durch <i>Salmonella</i>	23
2.3.2	Transmissionselektronenmikroskopie.....	23
2.4	Analyse der transkriptionellen Antworten	25
2.4.1	Transkriptom von Kopfsalat in Reaktion auf <i>S. Typhimurium</i> 14028s	25
2.4.2	Transkriptom von <i>S. Typhimurium</i> 14028s in Reaktion auf Boden, Salat- Wurzelexudate und Salatmedium.....	26
2.4.3	Extraktion von Wurzelexudaten	27
2.4.4	Transkriptom von EHEC-Stämmen in Reaktion auf Salatmedium	27

2.5	Ermittlung der Überlebensfähigkeit von <i>S. enterica</i> in Abhängigkeit von mikrobiellen Bodengemeinschaften	28
2.6	Übersicht über verwendete Materialien	29
3	Ergebnisse	32
3.1	Spezifische Nachweisverfahren für HPB in Pflanzen und Boden (AP1)	32
3.1.1	Nachweis und Extraktionseffizienz von <i>S. enterica</i> aus DS- und AL-Böden	32
3.1.2	Quantifizierung der Zellzahl von <i>S. enterica</i> mittels kultivierungs-abhängiger und –unabhängiger Methoden.....	33
3.1.3	Nachweisgrenze von <i>S. enterica</i> in Blattproben	33
3.2	Der Verlust an Kultivierbarkeit von <i>E. coli</i> bei Kupferstress	34
3.3	Faktoren die das Überleben von HPB im Boden beeinflussen (AP2)	35
3.3.1	Überleben der Salmonellen im Boden in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren	35
3.3.2	Überleben von <i>S. enterica</i> in Boden mit reduzierter mikrobieller Gemeinschaft.....	37
3.3.3	Überleben von <i>E. coli</i> (EHEC) in DS- und AL-Böden.....	39
3.4	Besiedlung von Kopf- und Feldsalat durch <i>S. enterica</i> (AP3)	40
3.4.1	Überleben von <i>S. enterica</i> auf den Blättern von Kopf- und Feldsalat.....	41
3.4.2	Visualisierung der Besiedlung von Kopf- und Feldsalatpflanzen durch <i>S. Typhimurium</i> 14028s.....	42
3.5	Besiedlung von Salatwurzeln und der Einfluss der genetischen Ausstattung der EHEC-Bakterien auf die Infektion (AP3).....	44
3.5.1	Einfluss von Bodentyp und Pflanzenart auf Adhärenz und Internalisierung von EHEC in den Wurzeln	46
3.6	Pflanzliche und bakterielle Antworten auf der Transkriptionsebene.....	48
3.6.1	Transkriptionelle Antwort von Kopfsalat auf Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> 14028s	48
3.6.2	Veränderung des Transkriptoms von <i>S. Typhimurium</i> 14028s in Reaktion auf Salat-Wurzelexudate und Salatmedium.....	50
3.6.3	Vergleichende Transkriptomanalyse verschiedener pathogener <i>E. coli</i> -Stämme in Anwesenheit von Salatbestandteilen.....	51
3.6.4	Veränderung des Transkriptoms von <i>S. Typhimurium</i> 14028s in autoklaviertem und natürlichen DS-Boden	53

3.7	Etablierung des Protokolls zur Bestimmung von Adhärenzraten von Bakterien an Salatoberflächen.....	54
3.8	Adhäsion der HPB an Kulturpflanzen	57
3.8.1	Analyse von adhäsiven Strukturen, der Motilität und Lipopolysaccharidschicht (LPS) von <i>S. Typhimurium</i> involviert in die Adhärenz an Feldsalat.....	57
3.8.2	Analyse von adhäsiven Strukturen von <i>S. Typhimurium</i> involviert in die Adhärenz an Kopfsalat.....	62
3.8.3	Analyse von adhäsiven Strukturen von <i>S. Typhimurium</i> involviert in die Adhärenz an Spinat	64
3.8.4	Einfluss von Stomata auf die Adhärenz von <i>S. Typhimurium</i> an Feldsalat	65
3.8.5	Analyse von adhäsiven Strukturen von pathogenen <i>E. coli</i> Stämmen (O157:H7 und O104:H4).....	67
3.9	Analyse des Proteoms	70
3.9.1	Analyse des Proteoms von <i>S. Typhimurium</i> unter verschiedenen umweltähnlichen Anzuchtbedingungen.....	70
3.10	Risikoeinschätzung für den Konsumenten und Interventionsstrategien auf der Basis der gewonnenen Erkenntnisse (AP4).....	71
4	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	75
4.1	Nutzen für die Risikobewertung	75
4.2	Projektrelevante Publikationen.....	77
5	Zusammenfassung.....	79
6	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	83
7	Literaturverzeichnis	85
8	Anhang.....	89



(Infektionswege von *Salmonella enterica* in der Umwelt, nach Hernández-Reyes and Schikora 2013)

Ziele

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

In den letzten Jahren ist die Anzahl an Infektionserkrankungen des Menschen, die durch den Verzehr von mit humanpathogenen Bakterien (HPB) wie Salmonellen und *Escherichia coli* belastetem frisch verzehrtem Obst und Gemüse bedingt sind, proportional gestiegen. Eine Kontamination von Pflanzen ist entlang der gesamten Produktionskette möglich und kann bereits vor der Ernte im Feld erfolgen. Die Bedeutungen des Bodentyps bzw. dessen physikochemischen Eigenschaften für die Aufnahme und Verteilung von HPB in - Nutzpflanzen sind derzeit nur unvollständig geklärt, auch die Rolle von organischem Dünger oder der Einarbeitung von belasteten Pflanzenresten in den Boden bleiben ungeklärt. Es fehlen auch Kenntnisse über die Aktivierung von Abwehrmechanismen der Nutzpflanzen nach einer Besiedelung mit bakteriellen Krankheitserregern. Im Rahmen des Projektes wird daher der Einfluss dieser Faktoren auf die Besiedelung von Kopfsalat und Feldsalat mit *Salmonella enterica* untersucht. Die Ergebnisse sollen einen Beitrag zur Risikoeinschätzung leisten. Die Ziele des Forschungsprogramms waren i) Etablierung von Methoden für den spezifischen Nachweis von HPB in pflanzlichen Geweben und im Boden; ii) Untersuchung von Faktoren die den Umfang der Besiedelung von Nutzpflanzen mit HPB beeinflussen; und iii) Risikoeinschätzung.

Generell gliederte sich das Vorhaben in vier Arbeitspakete (Tabelle 1):

1. Validierung von spezifischen Nachweisverfahren für *Salmonella* und EHEC in Kulturpflanzen und Boden. Adaptation internationaler Methoden wie z.B. das DIN CEN ISO/TS 13136 Verfahren für EHEC.
2. Beeinflussung der Abundanz und Aufnahme von *Salmonella* oder EHEC in Kulturpflanzen durch organische Dünger.
3. Untersuchung der Verteilung der Bakterien in der Pflanze mittels mikroskopischer, DNA-basierter Verfahren und Kultivierungsmethoden.
4. Risikoeinschätzung für den Konsumenten und Interventionsstrategien auf der Basis der gewonnenen Erkenntnissen.

Tabelle 1: Zeitplan der Arbeitspakete.

Arbeitspakete / Monate	1. Jahr		2. Jahr		3. Jahr	
	0-6	7-12	0-6	7-12	0-6	7-12
AP1. Nachweisverfahren						
AP2. Internalisierung						
A. Boden						
B. Pflanze						
C. Bakterien						
AP3. Systemische Kolonisierung						
AP4. Risikoeinschätzung						

1.1 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

1.1.1 Stand der Forschung

Salmonella enterica und EHEC gehören zu den wichtigsten bakteriellen Erregern von Durchfallerkrankungen. Bei EHEC sind darüber hinaus lebensbedrohliche extraintestinale Komplikationen, wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), zu beobachten. Während der EHEC Serotyp O157:H7 in den USA häufig als Infektionserreger auftritt, haben in Deutschland und Europa auch EHEC anderer Serotypen wie z.B. O26, O111, O103 und O104 zu Ausbrüchen geführt. Als Reservoir für beide Gruppen werden landwirtschaftliche Nutztiere, aber auch der Mensch angesehen. Ferner rückt die Übertragung der Erreger durch den Verzehr von nicht erhitzten pflanzlichen Lebensmitteln immer mehr in den Fokus. So wurden in den USA und in UK große Ausbrüche von *E. coli* O157:H7 und *S. enterica* Infektionen durch kontaminierten Spinat und andere Blattgemüse verursacht. Im Jahr 2011 fand in Deutschland der wohl größte EHEC-Ausbruch mit dem Serotyp O104:H4 statt. Insgesamt wurden dem Ausbruch fast 4000 Erkrankungsfälle zugeordnet, davon 855 an HUS, 53 Personen verstarben infolge der EHEC-Infektion. Als wahrscheinlichste Ursache des EHEC-Ausbruchs wurden kontaminierte Bockshornkleesprossen angesehen (RKI, 2011). Neueste Ausbrüche ereigneten sich im Dezember 2017 und im Juni 2018 in den USA. Durch den Verzehr von mit *E. coli* O157:E7 kontaminierten Romansalat wurden insgesamt 235 Personen infiziert, von denen 6 Personen verstarben (<https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-04-18/index.html>). Daher besteht hinsichtlich der Übertragung von HPB durch Pflanzen und deren möglicher Kontamination aus Quellen des umgebenden Ökosystems grundlegender Forschungsbedarf.

HPB können über Beregnungs- oder Oberflächenwasser, Gülle, Klärschlamm, direkte Fäkalkontaminationen (Wild), aber auch über Bodenpartikel oder im Boden befindliche, kontaminierte Pflanzenreste, mit den oberirdischen und unterirdischen Pflanzenteilen in Kontakt kommen (Jacobsen & Bech, 2012). Die erfolgreiche Etablierung von HPB auf Pflanzen setzt voraus, dass sich diese in der Konkurrenz mit der mikrobiellen Gemeinschaft erfolgreich durchsetzen. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Etablierung von HPB von der Pflanzenart und Sorte abhängig ist (Barak, *et al.*, 2011, Quilliam, *et al.*, 2012). Die Aufnahme von HPB durch Stomata, Trichome, Wurzeln und nach Verletzung wurde bereits experimentell gezeigt. So kann z.B. *S. enterica* Serovar Typhimurium Pflanzen als alternative Wirte verwenden. Diese Bakterien sind in der Lage, auf Pflanzenoberflächen zu haften und das Innere der Pflanzen aktiv zu besiedeln. Ähnlich wie bei der Infektion von tierischen Zellen unterdrückt *S. Typhimurium* mit Hilfe eines Typ-III-Sekretionssystems (T3SS) pflanzliche Abwehrreaktionen. Zusätzliche Analysen zeigten, dass die Interaktion von *Salmonellen* mit Pflanzen ein aktiver Prozess ist (Schikora, *et al.*, 2011, Shirron & Yaron, 2011, Schikora, *et al.*, 2012, Garcia, *et al.*, 2014). Die Analyse des *Salmonella*-Transkriptoms (RNA-basierte Analyse)

nach Besiedelung von Salat- und Korianderpflanzen zeigte deutliche Übereinstimmung mit dem *Salmonella*-Transkriptom nach Infektion von Tieren. Diese überraschende Parallelität deutet auf, zumindest im Teil, ähnliche Infektionsstrategien in Pflanzen und Tieren hin (Goudeau, *et al.*, 2013). Verschiedene *S. enterica* Serovare zeigen Variationen in ihrer Virulenz gegenüber Pflanzen, die ihre Abwehrreaktionen nach der Erkennung des von *S. enterica* stammenden Proteins Flagellin induzieren. Allerdings haben *S. enterica* Serovare Varianten des Flagellins entwickelt, die von der Pflanze nicht mehr erkannt werden. Auch die Kolonisierung von Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* O157:H7 hängt von Adhärenzfaktoren ab. Saldana, *et al.* (2011) konnten zeigen, dass Flagellen und Pili (insbesondere der „curl“ Typ) für die Kolonisierung der Blattoberflächen bedeutsam sind. Ähnlich wie bei pflanzenpathogenen Bakterien sind T3SS für die erfolgreiche Kolonisierung der Stomata und Blätter notwendig. Die Transformation eines nichtpathogenen *E. coli* Stamms mit einem Plasmid-kodierten T3SS befähigte den Stamm zur Kolonisierung und Internalisierung (Saldana, *et al.*, 2011). Auf Pflanzen aufgebrachte HPB konnten häufig über Wochen und Monate zumindest in geringer Anzahl nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde ein besseres Überleben von *E. coli* O157:H7 auf Pflanzen nach einer Passage durch den Verdauungstrakt von Kühen beobachtet (Semenov, *et al.*, 2010). Brandl and Amundson (2008) konnten zeigen, dass *E. coli* O157:H7 und *S. enterica* sich auf Salatblättern vermehren, wobei das Alter von Salatblättern wesentlich die Infektion beeinflusst. In den meisten Untersuchungen zum Überleben von Humanpathogenen auf Pflanzen und im Boden wurden traditionelle Kultivierungsverfahren genutzt. Allerdings wurde der sogenannte „Viable But Non-Culturable“ (VBNC)-Zustand von Zellen, die lebensfähig, aber nicht kultivierbar sind, für den Ausbruch von EHEC/EAEC O104:H4 als verantwortlich postuliert (Aurass, *et al.*, 2011).

Kolonisierung von Pflanzen durch HPB und deren Internalisierung wurde in den letzten Jahren vielfach berichtet (Schikora, *et al.*, 2012, Brandl, *et al.*, 2013, Hernandez-Reyes & Schikora, 2013). Erlacher, *et al.* (2014) konnten zeigen, dass *Enterobacteriaceae* etwa ein Drittel der Sequenzen des Gammaproteobakterien-Mikrobioms auf Salatblättern darstellen. Auf der Basis vieler unabhängiger Studien kommt man zu der Schlussfolgerung, dass Pflanzen ein natürliches Habitat von *Enterobacteriaceae* und damit auch von HPB wie z.B. *Salmonella* sind (Brandl, *et al.*, 2013, Fletcher, *et al.*, 2013). Die spezifische und variable Gen-/Proteinausstattung ist offensichtlich eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Besiedlung. So tragen Flagellen, Pili und T3SS, wesentlich zu ihrem Kolonisierungsverhalten bei. Wie häufig HPB auf Frischeprodukten vorkommen und ob landwirtschaftliche Managementformen ihr Vorkommen beeinflussen, ist nur unzureichend untersucht. Eine EU-weite Studie zeigte, dass 2,5% der Frischeprodukte mit *Salmonella* kontaminiert sind (Westrell, *et al.*, 2009). Neben der Reduzierung einer möglichen Exposition von Frischeprodukten mit Humanpathogenen müssen daher Faktoren bei der Prozessierung der Lebensmittel, die ihr Überleben und ihre Vermehrung vor und nach der Ernte begünstigen, erkannt und konsequent vermieden werden.

1.1.2 Eigene Vorarbeiten der Projektteilnehmer

1.1.2.1 Infektion mit *S. enterica* ist bei Pflanzen und Tieren ähnlich (JLU Gießen, AG Schikora)

Im Fokus der Studien der AG Schikora standen die Faktoren, die eine Infektion der Pflanze (*Arabidopsis*, Feldsalat) mit *Salmonella* beeinflussen. In früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass aus infizierten Pflanzen stammende *S. enterica* virulent für Mäuse sind. Die Untersuchung des pflanzlichen Immunsystems nach einer Infektion mit *S. enterica* zeigte, dass Pflanzen auf den Erreger ähnlich wie auf „konventionelle“ pflanzenpathogene Bakterien reagieren. Das bakterielle Protein Flagellin wird vom pflanzlichen Immunsystem erkannt, jedoch exprimieren verschiedene *S. enterica* Serovare (z.B. Senftenberg) eine Version des Flagellins, die nicht mehr erkannt wird und somit für das pflanzliche Immunsystem „unsichtbar“ bleibt. Des Weiteren hängt die *Salmonella*-Virulenz von Effektoren des T3SS ab. Physiologische Tests und eigens dafür entwickelte Algorithmen für Image Analysen zeigten, dass T3SS-Mutanten, die nicht in der Lage sind die T3SS-Effektoren zu injizieren, eine verminderte Virulenz gegenüber Pflanzen haben. 100 von den T3SS Effektoren wurden bereits kloniert und mehrere auf ihre Funktion in Pflanzen untersucht, Signalübermittlung und die MAP Kinasen sind häufige Ziele der bakteriellen Effektoren.

1.1.2.2 Virulenzfaktoren von Salmonellen (Universität Osnabrück, AG Hensel)

Die Arbeitsgruppe Hensel, Abt. Mikrobiologie der Universität Osnabrück untersucht die molekularen Mechanismen der Virulenz von *S. enterica*. Fokus bisheriger Arbeiten war das Verständnis der Anpassung von Salmonellen an den intrazellulären Lebensraum in Wirtszellen und die Rolle des T3SS für die intrazelluläre Lebensweise. Die Arbeitsgruppe verfügt über umfangreiche Erfahrung in der hochauflösenden mikroskopischen Analyse der Erreger-Wirt-Interaktion, besonders durch *live cell imaging*. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Untersuchung des Mechanismus der Adhäsion von *S. enterica* an verschiedene Oberflächen. Die Arbeitsgruppe verfügt über eine umfangreiche Sammlung isogener Mutantenstämme von *S. enterica* Serovar Typhimurium und ein Repertoire an Techniken zur genetischen Manipulation von Salmonellen. Aktuelle Arbeiten führten zu Datensätzen von Transkriptom unter Infektionsbedingungen bei Säugerzellen. Die hierzu etablierten Methoden können für vergleichende Analysen bei *Salmonella*-Pflanzen Interaktionen eingesetzt werden.

Salmonellen wie auch pathogene Stämme von *E. coli* verfügen über ein umfangreiches Repertoire an Genen für Adhäsionsfaktoren. So umfasst beispielsweise das Adhäsionom von *S. enterica* Serovar Typhimurium 18 distinkte Adhäsine. Für die meisten dieser Adhäsine wurde keine Rolle bei der Pathogenese der Salmonellose in Mensch oder Tier gefunden. Ebenso sind Bedingungen,

unter denen diese Adhäsine gebildet werden, noch unbekannt. Welche Adhäsionsfaktoren für das Überleben und die Verbreitung von Salmonellen außerhalb von Säugerwirten relevant sind, ist noch weitgehend ungeklärt.

1.1.2.3 Virulenzfaktoren von EHEC (Universität Hohenheim, AG Schmidt)

Im Fokus der wissenschaftlichen Arbeiten der AG Schmidt steht die Bedeutung der Gene auf beweglichen genetischen Elementen (Phagen, Plasmide) aus EHEC für die Virulenz und Anpassung, auch in einer Lebensmittelmatrix. So wurden die großen Virulenzplasmide von *E. coli* O157:H7 und O157:H⁻ beschrieben, und phagenkodierte Typ III-Effektoren charakterisiert. Insbesondere die Adaption an die Lebensmittelmatrix wurde studiert. Über einen Zeitraum von 6 Jahren wurde im Rahmen eines BMBF-Verbundprojekts EHEC aus Lebensmitteln isoliert, charakterisiert und populations- und molekularbiologisch beschrieben. Die Modulation des Primärmetabolismus und die Verwendung verschiedener C-Quellen wurden im Rahmen von Proteom- und Metabolomuntersuchungen erforscht. In Kooperation mit der Forschungsanstalt Agroscope in Wädenswil (Schweiz), wurden bereits Inokulationsversuche mit *E. coli* O157:H⁻ in Baby Leaf Salat der Sorte Alanet durchgeführt. Diese Versuche zeigten, dass *E. coli* O157:H⁻ wahrscheinlich über die Bewässerung in den Boden eingebracht wurde und davon ausgehend in die Pflanze eindringen können.

1.1.2.4 Boden und das pflanzliche Mikrobiom (IGZ Großbeeren, AG Grosch)

Im Fokus eines gemeinsamen DFG Projekts mit dem JKI Braunschweig (AG Smalla) stand die Charakterisierung des Einflusses des Bodentyps sowie der Pflanzenart (u.a. von Salat) auf die Etablierung von bakteriellen Antagonisten in der Rhizosphäre der Pflanze unter Berücksichtigung der pflanzenwachstumsfördernden und krankheitsunterdrückenden Wirkung der Antagonisten unter Feldbedingungen. Dazu wurden auch die Mikrobiota und deren Diversität im Boden und in der Rhizosphäre der Pflanze in An- und Abwesenheit des Pathogens *Rhizoctonia solani* untersucht. Mit Hilfe von kultivierungsunabhängigen, DNA-basierten Methoden konnte erstmals der Einfluss des Bodentyps auf die mikrobielle Diversität unter Feldbedingungen gezeigt werden. Einige taxonomische Gruppen wurden in der Rhizosphäre von Salat unabhängig vom Bodentyp angereichert. Die Besiedlungsdichte inokulierter Antagonisten (*Serratia* sp., *Pseudomonas* sp.) an Salat wurde durch selektive Kultivierung und quantitative PCR verfolgt.



(Anbausystem für Kopfsalat und Feldsalat auf *Salmonella*-kontaminiertem Boden)

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Spezifische Nachweisverfahren für HPB in Pflanzen und Böden (AP1)

2.1.1 Routinemäßige Kultivierung von Bakterienstämmen

Sofern nicht anders angegeben, wurden Bakterien routinemäßig aerob in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten mit Antibiotika kultiviert, wenn dies für die Selektion spezifischer Marker erforderlich war. Carbenicillin oder Kanamycin wurden bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt, wenn dies für die Selektion von Phänotypen oder die Erhaltung von Plasmiden erforderlich war. Für die Induktion des Tet-on-Systems wurde Anhydrotetracyclin (AHTC) bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml oder 100 µg/ml zum Medium dazugegeben. Die in dieser Studie verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

2.1.2 Kultivierungs-abhängige Quantifizierung von Salmonellen im Boden

Zur Quantifizierung von Salmonellen in Böden (Lehmsandboden (DS) und Auenlehm Boden (AL)) erfolgte eine serielle Verdünnung einer in 10 mM MgCl₂ resuspendierten Bodenprobe und anschließend eine Ausplattierung auf *Salmonella*-spezifischem Medium (XLD Medium, 37°C, 24h). Kolonien von Salmonellen verfärbten sich auf diesem Selektivmedium schwarz, was ihre Identifizierung erlaubt. Die erste Boden/MgCl₂-Suspension im Verhältnis 1:10 wurde zum Isolieren der Salmonellen aus dem Bodengefüge für eine Minute auf höchster Stufe gevortext. Parallel dazu wurde die Masse von repräsentativen Bodenproben ermittelt, die anschließend getrocknet wurden, um so deren Wassergehalt zu bestimmen. Die ausgezählten koloniebildenden Einheiten (CFU; „colony forming units“) wurden auf 1 g Trockenmasse des Bodens zurückgerechnet. Die Effizienz der Methode wurde zu Beginn geprüft (siehe 3.1.1).

2.1.3 Kultivierungs-unabhängige Quantifizierung von Salmonellen im Boden

Zum Nachweis der Salmonellen durch Amplifikation *Salmonella*-spezifischer Gene in extrahierter Boden-DNA wurde ein quantitatives PCR-Protokoll etabliert. Ziel war ein Vergleich der Ergebnisse in Bezug auf die Quantität der Salmonellen im Boden, erzielt mittels kultivierungs-abhängigen und -unabhängigen Methoden, um die Bildung von „viable but non-culturable“ (VBNC)-Populationen bewerten zu können. Die DNA wurde mit Hilfe des Kits FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Heidelberg) aus 0,5 g Boden nach Herstellerangaben extrahiert und mit dem GeneClean Spin Kit (MP Biomedicals) aufgereinigt. Die Boden-DNA wurde in 20 µL Reaktionen amplifiziert. Diese enthielten 2,5 µL DNA, 5 µL Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main), 0,3 µM Primer *invA*-FW (TTAACCTTGTGGAGCATATTTCG) und Primer *invA*-Rv (TCCTCAACTTCAGCAGATACC). Die *Salmonella*-spezifischen Primer, beschrieben in Zimmermann (2014), amplifizieren ein Produkt von 104 bp des *invA*-Gens. Das PCR-Temperaturprogramm war

wie folgt: 10 min bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen 15 s bei 95°C, 60 s bei 60°C, 2 min bei 72°C, 15 s bei 80°C + Schmelzkurve im CFX96 System (Bio-Rad, München, Germany). Die Quantifizierung des *Salmonella*-spezifischen *invA*-Produkts erfolgte mit Hilfe eines Quantifizierungsstandards aus einem klonierten *invA*-Fragments von *S. Typhimurium* LT2 im pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim), eingesetzt in einer Verdünnungsreihe. Um die verschiedenen Methoden vergleichen zu können, wurde der Anteil der in den Boden applizierten Zellen kultivierungs-unabhängig und –abhängig ermittelt. Dazu wurde eine bestimmte Zellzahl an Salmonellen in den Boden eingemischt ($\sim 10^8$ pro g Trockenmasse) und anschließend parallel mittels CFU-Bestimmung und DNA-Extraktion mit nachfolgender qPCR von *invA* die Menge an Salmonellen ermittelt. Aus der Differenz der mit beiden Methoden ermittelten Quantität an Salmonellen wurde ein Faktor berechnet, der später bei allen Vergleichen berücksichtigt wurde. Die Ergebnissen der kultivierungs-unabhängigen und –abhängigen Untersuchungen wurden mittels *t*-Test analysiert ($p < 0,05$).

2.1.4 Nachweis von Salmonellen in der Phyllosphäre

Zum systemischen Nachweis von Salmonellen in der Phyllosphäre (Blättern) von Kopfsalat und Feldsalat wurde eine neue Methode mit folgenden Arbeitsschritten etabliert. Zunächst erfolgte eine unspezifische Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser (37°C, 18-20h, 100 rpm), gefolgt von einer Ausplattierung auf *Salmonella*-spezifischem Medium (XLD-Agar, 37°C, 24h) sowie einer weiteren Inkubation in *Salmonella*-spezifischem RVS-Medium (41,5°C, 24h) und einer nachfolgenden Ausplattierung auf XLD-Agar-Platten. Diese Arbeitsschritte wurden an die ISO 6579-1 angeglichen. Mit großer Sorgfalt wurden dabei nur die Blätter beprobt, die nicht mit Boden in Kontakt gekommen waren. Die zum Nachweis verwendeten Blätter wurden mit einer sterilisierten Schere (70% Ethanol) zerkleinert um die Anreicherung von internalisierten Salmonellen zu verbessern. Der Anteil an *Salmonella*-positiven Pflanzen wurde in Prozent angegeben. Zur Verbesserung der Nachweisgrenze von *Salmonella*-positiven Pflanzen wurde in späteren Versuchen des Zentralversuchs (AP2) die Zahl der beprobten Pflanzen von 4 auf 20 erhöht, wobei immer zwei Pflanzen in einem Topf angezogen und zum Nachweis von Salmonellen vereint wurden (von 4 Replikaten mit je einer Pflanze auf 10 Replikate mit je zwei Pflanzen). Dieses Vorgehen resultierte in einem Prozentbereich. Die Nachweisgrenze für den skalierten Ansatz wurde zuvor experimentell bestimmt und lag bei 1-10 Salmonellen (CFU) pro Probe (nicht gezeigt).

2.1.5 Überleben von EHEC im Boden

Für eine erfolgreiche Durchführung der Inokulationsversuche war es wichtig, zunächst zu ermitteln, ob und wie lange die getesteten EHEC Stämme in den untersuchten Böden überdauern können. Das Überleben von *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai wurde in dem Lehmsandboden (DS)

und das von *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11φcu zusätzlich auch in Auenlehm Boden (AL, beschrieben in Rühlmann and Ruppel (2005)) untersucht. Dazu wurde je 1 g Boden mit jeweils 10^8 *E. coli* (CFU) gemischt. Nach einer Inokulationsdauer von 0, 2, 4, 7, und 14 Tagen wurden auf *E. coli*-spezifischen Selektivmedium die CFU/g bestimmt.

2.1.6 „Viable but non-culturable“ (VBNC) Zustand

In klassischen Nachweismethoden von Bakterien in Lebensmitteln erfolgt eine kultur-abhängige Anreicherung der nachzuweisenden Bakterien. Daher stellt der VBNC-Zustand, welcher einen Verlust an Kultivierbarkeit beschreibt, ein ernstzunehmendes Risiko für die Lebensmittelindustrie dar. Um den VBNC-Zustand zu imitieren und den Verlust der Kultivierbarkeit zu zeigen, wurden im Rahmen dieses Arbeitspakets bereits Vorversuche mit *E. coli* C600 und *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai durchgeführt. Dazu wurde eine Suspension von 10^7 CFU/ml des jeweiligen Stamms in 40 ml 0,9 % Saline hergestellt und mit 500 μ M CuSO_4 behandelt. Der Verlust an Kultivierbarkeit wurde durch einen Ausstrich auf Nutrient Agar ermittelt. Das Verhältnis von toten zu lebendigen Zellen wurde in diesem Ansatz durch eine Färbung mit dem LIVE/DEAD BacLight Bacterial Kit und anschließender Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

2.2 Aufnahme von HPB in Kulturpflanzen (AP2)

2.2.1 Zentralexperiment mit *Salmonella enterica*

Im Fokus des AP2 stand ein Zentralexperiment, in welchem der Einfluss von Faktoren wie: Bodentyp, organische Dünger, Eintragsquelle der Bakterien und deren Stamm sowie Pflanzenart auf das Überleben von *S. enterica* im Boden sowie die Besiedlung der Pflanze unter Gewächshausbedingungen untersucht wurde. Die oben bereits erwähnten Böden Lehmsand (DS) und Auenlehm (AL), sowie die ausgewählten organischen Dünger Hühnertrockenkot (HTK) und Schweinegülle wurden zur chemischen Analyse an den Landeskontrollverband Berlin Brandenburg e.V. sowie an das Institut für Düngemittel und Saatgut verschickt (Anhang, Tabellen S1 – S7). Die Einarbeitung von organischem Dünger erfolgte im Zentralexperiment nach „Guter Fachlicher Praxis“ einen Monat vor Versuchsbeginn. Die applizierte Menge Stickstoff entsprach dabei 170 kg/ha bei einer Einarbeitungstiefe von 5 cm, was der Gesamtstickstoff-Obergrenze (Düngeverordnung aus Wirtschaftsdüngern tierischer Herkunft) entspricht. In dem Zentralexperiment wurde das Überleben von drei *S. enterica*-Stämmen (Typhimurium 14028s, Typhimurium LT2 und Senftenberg) im Boden und die Besiedlung von Kopf- und Feldsalat in Abhängigkeit a) vom Bodentyp (DS, AL), b) der Zugabe von organischem Dünger in den Boden (HTK, Schweinegülle) und c) dem Zeitpunkt der Salmonellen-Applikation analysiert. Die Salmonellen wurden dabei entweder zusammen mit dem organischen Dünger einen Monat vor dem Umsetzen der Pflanzen in den Boden eingearbeitet (Behandlung 1, Simulation der Kontamination des Bodens mit Salmonellen über den organischen Dünger) oder am Pflanztag (Tag 0) in den Boden eingearbeitet (Behandlung 2, Simulation eines Eintrags von Salmonellen über Gießwasser oder Fäkalkontamination). Die Zellzahl von 10^6 CFU/g Trockenmasse im Boden wurde in beiden Fällen eingearbeitet. Es wurden min. vier und max. 20 Replikate pro Zeitpunkt und Behandlung beprobt. Aufgrund des Probenumfangs wurden die Versuche für die vier Dünger-Boden-Kombinationen getrennt durchgeführt, jeweils mit Kontrollboden ohne organische Düngung. Die Pflanzen, angezogen in DS- bzw. AL-Boden, wurden zu Versuchsbeginn (Tag 0) im 3-Blattstadium in den Boden gesetzt. Über einen Zeitraum von 49 Tagen nach der Pflanzung wurden Boden- und Blattproben entnommen und in diesen die Salmonellen quantifiziert bzw. das Vorkommen von Salmonellen geprüft. Parallel zu allen Varianten wurden Kontrollen ohne Salmonellen durchgeführt.

2.2.2 Inokulationsexperimente mit *Escherichia coli* und Deletionsmutagenese

Um die Rolle der Adhärenz-assoziierten Gene *fliC*, *hcpA* und *iha* bei der Adhärenz bzw. Internalisierung von *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai in Feldsalatwurzeln zu untersuchen, wurden zunächst isogene Deletionsmutanten mit der Methode zur Deletionsmutagenese nach Datsenko

and Wanner (2000) hergestellt. Mit den gewonnenen Mutanten wurden unterschiedliche Inokulationsversuche durchgeführt, um a) die Rolle der Adhärenz-assoziierten Gene *fliC*, *hcpA* und *iha* bei der Adhärenz bzw. Internalisierung von *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai in Feldsalatwurzeln zu untersuchen und b) den Einfluss von Boden – Lehmsand (DS) und Auenlehm (AL) – und Pflanzenart – Feldsalat und Kopfsalat – auf die Adhärenz bzw. Internalisierung von *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11φcu in den Wurzeln zu analysieren. Die dazu verwendeten Bakterienstämme wurden mittels eines Plasmides fluoreszenz-markiert, um sie mittels Fluoreszenzmikroskopie im Wurzelgewebe zu detektieren (siehe auch 3.5). Der Versuchsablauf war für alle Inokulationsversuche gleich und kann Abbildung 1 entnommen werden. Die Inokulationsversuche wurden im Gewächshaus der Biosicherheitsstufe 3 bzw. Labor der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft (WSL) in Birmensdorf und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. David Drissner von der Eidgenössischen Forschungsanstalt Agroscope in Wädenswil, Schweiz, durchgeführt.

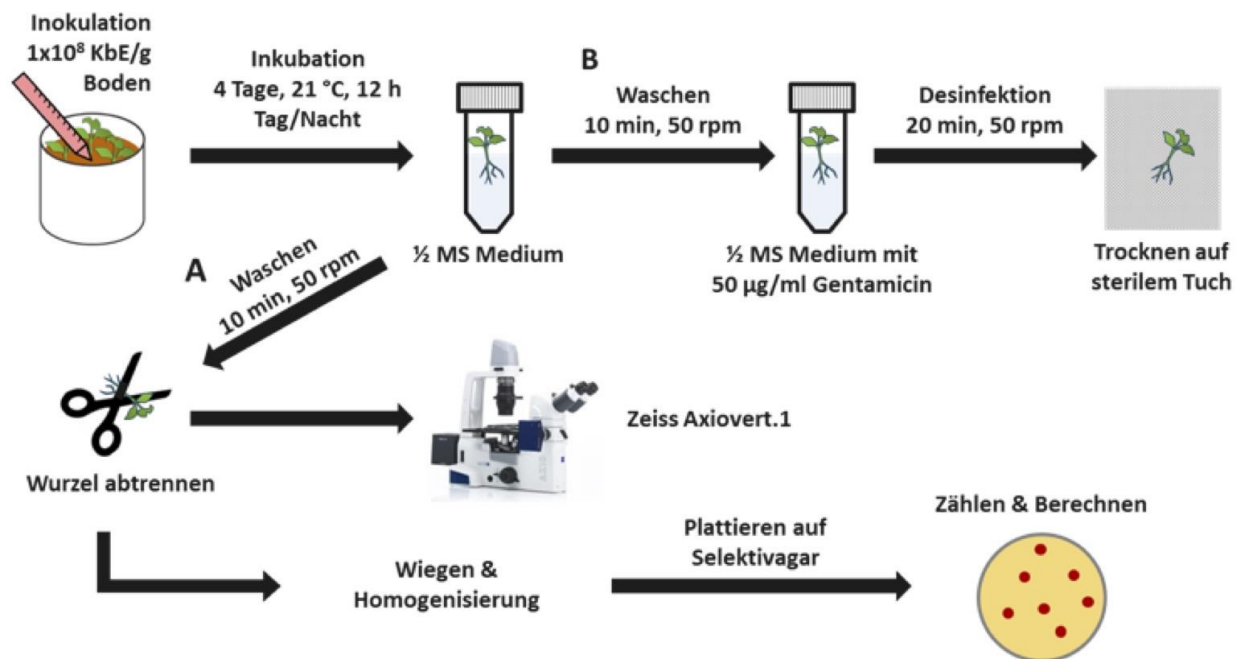


Abbildung 1: Ablaufplan der Inokulationsversuche. Die Pflanzen wurden mit jeweils 20 ml Bakteriensuspension inokuliert und anschließend inkubiert. Nach Entnahme der Wurzeln aus dem Boden wurden diese gewaschen und (A) bezüglich der Adhärenz oder (B) bezüglich der Internalisierung der getesteten EHEC Stämme qualitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie und quantitativ mittels KbE-Analyse untersucht.

2.2.3 Inokulation von verschiedenen Pflanzenarten

Feldsalatsamen wurden mit 70% EtOH für 1 min sterilisiert, gefolgt von 3% NaClO für 2 Minuten. Die Samen wurden 3x mit sterilem H₂O_{dd} gewaschen und 30 min lang getrocknet. Die Samen wurden auf Murashige-Skoog (MS-) Agar (1,1 g Murashige&Skoog Medium inklusive Vitamine, Duchefa Biochemie #M0222; 1 g Agar; 0,5 g MES pro Liter; pH 5,4) in sterilen Kunststoffbehältern

mit Luftfilter (runde Ausführung 140 mm; Duchefa Biochemie #E1674) bei 20°C mit 12 h/12 h Tag-Nacht-Rhythmus für 8 Wochen gepflanzt.

Kopfsalatsamen wurden mit 3% NaClO für 4 min sterilisiert und anschließend 4-mal für 1 min in sterilem H₂O_{dd} gewaschen. Die Aussaat auf Murashige-Skoog (MS-) Agar (0,55 g Murashige&Skoog Medium inklusive Vitamine, Duchefa Biochemie #M0222; 1 g Agar; 5 g Sucrose pro Liter in sterilen Kunststoffbehältern mit Luftfilter (runde Ausführung 140 mm; Duchefa Biochemie #E1674) erfolgte direkt. Die Pflanzen wurden für 4-5 Wochen bei 20 °C mit 12 h/12 h Tag-Nacht-Rhythmus angezogen.

Für die Inokulation von Salat bzw. von ausgestanzten definierten Blattbereichen (Ø 8 mm) wurden 8 Wochen alte Feldsalatpflanzen, bzw. 4-5 Wochen alte Kopfsalatpflanzen verwendet. Es wurden 48-Well-Platten mit je einer Blattscheibe pro Well bestückt, die durch sterile Edelstahleinlagen (*Inlays*) mechanisch fixiert wurden. Für jede Probe wurden 3 Blattscheiben inokuliert. Zur Inokulation wurden O/N-Kulturen von den Bakterienstämmen 1:31 in LB verdünnt (ggf. mit Antibiotika) und für 3,5 h in Reagenzgläsern mit Belüftung in einem Rollerdrum kultiviert. Die Kulturen wurden in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt, um etwa $5,6 \times 10^7$ Bakterien/ml zu erhalten, 50 µl dieses Inokulums wurden auf jeweils eine Blattscheibe gegeben. Die Infektion erfolgte entweder für 1 h, RT unter statischen Bedingungen oder für 55 min, RT nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 500 x g. Nach der Inokulation wurden die Blattscheiben einmalig mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Bakterien zu entfernen. Drei Blattscheiben wurden in Reaktionsgefäße übertragen und zwei weitere Male mit PBS durch kurzes Mischen (Vortex) gewaschen. Pflanzengewebe wurde mit einem Pellet Pestle Motor in 600 µl 1% Desoxycholat in PBS homogenisiert und koloniebildende Einheiten wurden durch Plattieren von seriellen Verdünnungen der Lysate auf MH-Agarplatten (Müller-Hinton-Agarplatten) bei 37°C inkubiert O/N und bestimmt. Jedes der durchgeführten Experimente umfasste auch eine nicht inokulierte Variante bzw. Probe, um die Sterilität des Feldsalates, bzw. des Kopfsalates zu prüfen. Bei Verwendung von kommerziell erhältlichem Spinat wurde dieser vor dem Ausstanzen der Blattscheiben 3-mal mit sterilem Reinstwasser (MilliQ) gewaschen.

2.2.4 Konstruktion von Stämmen und Plasmiden

Für die Einführung der Gene *sadBA* unter dem Tet-on-System, die für einen Autotransporter kodieren, wurde der Template-Vektor p4392 verwendet, der *tetR PtetA::fimAICDHF* enthält. Die Amplifikation von *sadBA* aus dem Genom von *S. Typhimurium* NCTC 12023 und dem Tet-On System *aph tetR PtetA* auf p4392 kodiert, erfolgte unter Verwendung von Oligonukleotiden, wie in Tabelle 5 aufgeführt und durch PCR-Aufreinigung (Monarch). Die PCR-Produktkodierung für *sadBA* und das PCR-Produkt aus dem Vektor p4392 wurden von ‚Gibson Assembly‘ nach dem Protokoll des Herstellers (NEB) zusammengestellt. Für die Überexpression von SPI4, die für ein T1SS kodiert, welches das nicht-fimbrielle große Adhäsिन SiiE sekretiert, wurde ein Plasmid mit

SPI4-Regulationsfaktor *hilD* unter dem Tet-on-System erstellt. Die Amplifikation von *hilD* aus dem Genom von *S. Typhimurium* NCTC 12023 und dem auf p4392 kodierten Vektor einschließlich *aph tetR PtetA* erfolgte unter Verwendung von Oligonukleotiden, wie in Tabelle 5 aufgeführt und weiter wie zuvor beschrieben.

Die Deletion von *csgBAC* wurde durch λ Red Rekombination in *S. Typhimurium* mit pWRG730 in Datsenko and Wanner (2000) beschrieben und mit Oligonukleotiden durchgeführt, die in Tabelle 5 aufgeführt sind. Die Deletion wurde mittels Kolonie-PCR mit Oligonukleotiden gemäß Tabelle 5 überprüft. Die weitere Entfernung der *aph*-Kassette erfolgte mittels pE-FLP kodierend für die FLP-Rekombinase wie in Datsenko and Wanner (2000) beschrieben.

Die Erzeugung von Stämmen ohne fimbrielle Operone (SR11 Δ 12) und eine weitere adhäsive Struktur wurde durch Übertragung der Deletion durch P22-Phagentransduktion unter Verwendung der in Tabelle 4 aufgeführten P22-Phagenlysate erzeugt.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Oberflächenexpression von SadA mittels Durchflusszytometrie wurden 6×10^8 *Salmonella*-Zellen in PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 3% Paraformaldehyd/PBS fixiert. Die Salmonellen wurden mit 2% Ziegen Serum in PBS für 30 min blockiert und anschließend mit dem spezifischen Antiserum Kaninchen α SadA 1:1000 in 2% Ziegen Serum/PBS verdünnt, für 2 h inkubiert, so dass Ziegen Serum α Kaninchen IgG Antikörper aneinander binden und mit Alexa-Fluor488 1:2000 verdünnt in 2% Ziegen Serum/PBS für 1 h. Zur Analyse der Oberflächenexpression von SiiE mittels Durchflusszytometrie wurden 3×10^8 Salmonellen in 3% Paraformaldehyd/PBS für 20 min fixiert. Bakterien wurden mit einer Lösung (2% Ziegen Serum und 2% Rinderserumalbumin in PBS) für 30 min blockiert und anschließend mit dem spezifischen Antiserum α -SiiE-C-Terminal gekoppelt mit Alexa-Fluor488 (1:100) für 1 h gefärbt. Die Salmonellen wurden mit einem Attune NxT Flow Zytometer (Thermo Fisher) gemessen und mit der Attune NxT Software Version 2.5 analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein Mutantenstamm ohne die entsprechende Adhäsionsstruktur verwendet.

2.3 Verteilung der Bakterien an/in der Pflanze (AP3)

2.3.1 Visualisierung der Pflanzenbesiedlung durch *Salmonella*

Zur Visualisierung der Kolonisierungsmuster von *S. enterica* auf Kopf- und Feldsalat wurde zunächst der Stamm *S. Typhimurium* 14028s mittels des Plasmids pSM1890 mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) markiert. Dazu wurde ein triparentales Mating durchgeführt zwischen, *S. Typhimurium* 14028s, *E. coli* als Träger des IncQ-Plasmids pSM1890 (Richter & Smalla, 2007) und *E. coli* mit dem Helferplasmid R751 (Thorsted, *et al.*, 1998). Dazu wurden die Zellen gemischt und zentrifugiert (4000 *g*, 3 min), das in einem geringeren Volumen resuspendierte Pellet auf eine Filterscheibe (0,22 μm , Durapore Membranfilter, Merck, Darmstadt) aufgetropft und diese auf LB-Agar über Nacht bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml 10 mM MgCl₂ resuspendiert und plattiert auf LB-Agar mit 50 mg/l Rifampicin, 10 mg/l Gentamicin und 50 mg/l Streptomycin. Nach Inkubation bei 28°C über Nacht wurden grün fluoreszierende Transkonjuganten gepickt und die Identität von *S. Typhimurium* 14028s durch Plattierung auf XLD-Agar bestätigt.

Um die Besiedlung der Kopf- und Feldsalatpflanzen zu visualisieren, wurden sterilisierte Samen, wie in 2.4.1 beschrieben, angezogen und in 6-Kammer-Mikrotiterplatten mit 10⁸ CFU/ml des Stammes *S. Typhimurium* 14028s inokuliert. Nach 1, 3 und 5 Tagen wurden Blätter und Wurzeln beprobt und mit Propidiumiodidlösung (1 $\mu\text{g/ml}$) für 5 min gefärbt und anschließend auf einem Objektträger in DAPI-Lösung (10 $\mu\text{g/ml}$) eingebettet.

Um die Kontamination der Blätter durch Beregnungs- oder Spritzwasser zu simulieren, wurden in Substrat gewachsene Kopf- und Feldsalatpflanzen im 5-10-Blattstadium mit *S. 14028s* Inokulum besprüht. Die *Salmonella*-Zellen (10⁸ CFU/ml) wurden zur Herstellung des Inokulums in 10 mM MgCl₂-Lösung, versetzt mit 0.05% Tween 20, aufgenommen. Nach der Inokulation der Pflanzen mit *Salmonella* wurden diese 6 Tage im S2-Gewächshaus bei 20°C inkubiert. Zum Nachweis der Besiedlung wurden kleine Flächen aus den Blättern herauspräpariert und wie oben beschrieben gefärbt.

Die Proben wurden mit einem SP8 Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar) bei folgenden Wellenlängen mikroskopiert: 505 nm Excitation und 430-380 nm Emission (blau), 488 nm Excitation und 500-550 nm Emission (grün) und 561 nm Excitation und 600-680 nm Emission (rot), was die Autofluoreszenz von Chloroplasten mit einschließt.

2.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Analyse der Oberflächenexpression der adhäsiven Strukturen aus pathogenen *E. coli* Stämmen und *Salmonella* wurden Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erstellt. Die Anzucht der jeweiligen Kulturen wurde wie in 2.1.1 beschrieben, durchgeführt.

250 µl Kultur wurden mit 250 µl 3% Paraformaldehyd (PFA)/PBS für 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Bakterien schonend bei 1000 x *g* für 5 min pelletiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 50-100 µl Reinstwasser (MilliQ) aufgenommen. 8 µl der Bakterienlösung wurden jeweils auf ein Formvar/Carbon Netzchen (100 Mesh, Cu beschichtet) aufgetragen, welches kurz zuvor mittels eines *glow discharge*-Geräts (EasiGlow) hinsichtlich der Oberflächenladung vorbehandelt wurde. Nicht gebundene Bakterien wurden mit Filterpapier abgezogen und das Netzchen für die Mikroskopie verwendet oder für 1 min in 1% PTA gefärbt und anschließend mit Reinstwasser gewaschen. Die Aufnahmen wurden an einem Zeiss LEO 912 TEM angefertigt bei 80 kV. Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels ImageSP.

2.4 Analyse der transkriptionellen Antworten

2.4.1 Transkriptom von Kopfsalat in Reaktion auf *S. Typhimurium* 14028s

Um den Einfluss der *Salmonella*-Stämme auf die Immunantwort der Pflanzen zu untersuchen, wurde ein Versuch unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden zunächst sterilisierte Kopfsalatsamen auf 0,5 x Murashige & Skoog-Medium (MS)-Agar ausgekeimt und anschließend in sterile Weck-Gläser mit 0,5 x MS-Agar umgesetzt. Nach ca. 2 Wochen wurden die drei *Salmonella*-Stämme in einer Dichte von OD₆₀₀ 0,1 (10⁸ CFU/ml) auf die Blätter gesprüht. Die Kontrollvariante wurde vergleichbar nur mit MgCl₂-Lösung behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 0, 2, 6, 12 und 24 h wurden die Pflanzen beprobt, wobei die Blätter von je zwei Pflanzen vereint und mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet wurden, um anschließend die RNA zu extrahieren. Diese wurde zu cDNA umgeschrieben und mit dieser die Änderung der Transkription ausgewählter Markergene relativ zu einem Housekeeping-Gen (*actin*) quantifiziert. Der Versuch wurde insgesamt 3 Mal durchgeführt und die Mittelwerte berechnet. Dieser Versuch wurde nur für Kopfsalat durchgeführt, da für Feldsalat das Genom und somit auch die Primer für die Markergene noch nicht zur Verfügung stehen. Dabei gaben die Ergebnisse Hinweise auf ein heterogenes Expressionsmuster und eine spezifische Antwort der Pflanze auf bestimmte *Salmonella*-Stämme (nicht gezeigt). Zur weiteren Analyse sollte daher durch Sequenzierung des Transkriptoms des Salats ein weitaus vollständigeres Bild der Pflanzenantwort auf die Kolonisierung durch *Salmonella* erhalten werden. Diese Ergebnisse sollten zur Identifizierung alternativer und spezifischer Gene, die für die Charakterisierung der Pflanzenantwort auf *Salmonella* hilfreicher sind, genutzt werden.

Um das vollständige Transkriptom der Pflanze in Reaktion auf eine Besiedlung durch *Salmonella* zu untersuchen wurden Kopfsalatpflanzen mit *S. Typhimurium* 14028s inokuliert und das Transkriptom im Vergleich zu Kontrollpflanzen untersucht. Da das Genom von Feldsalat zu der Projektzeit nicht zur Verfügung stand, wurde nur das Transkriptom von Kopfsalat in Konfrontation mit *Salmonella* untersucht. Dazu wurden Kopfsalatsamen wie folgt oberflächensterilisiert: fünfmaliges Waschen für 1 min mit sterilem Leitungswasser, gefolgt von einem Sterilisationsschritt mit 3% NaClO für 4 min und anschließendem erneutem viermaligen Waschen mit sterilem Leitungswasser. Die sterilisierten Samen wurden zur Keimung auf ¼ Murashige Skoog (MS)-Agar pH 5,6, Vitaminen und 5 g/l Sucrose ausgelegt und nach der Keimung für weitere 4 Tage in einer Klimakammer kultiviert. Im 1-Blattstadium wurden die Pflanzen in 5 ml ¼ MS-Medium (flüssig) in 6-Kammer-Mikrotiterplatten transferiert (3 Pflanzen pro Kammer, 3 Replikate bzw. 3 Kammern). Nach 24 h Adaptation der Pflanzen wurde das MS-Medium mit *S. 14028s* (10⁸ CFU/ml) inokuliert bzw. mit 10 mM MgCl₂ (Kontrolle). Nach 24 h wurden die Pflanzen beprobt, sofort in flüssigem

Stickstoff eingefroren, unter sterilen Bedingungen gemörsert und bei -80°C bis zur RNA-Extraktion gelagert.

Die RNA wurde mit Hilfe des Kits RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Der DNA-Verdau erfolgte mit dem Kit PerfeCTa DNase I (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA). Die RNA wurde mit Hilfe des qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta BioSciences) zu cDNA umgeschrieben. Die Präparation der Library und die Illumina HiSeq-Sequenzierung wurden extern an der IIT GmbH Bielefeld durchgeführt.

2.4.2 Transkriptom von *S. Typhimurium* 14028s in Reaktion auf Boden, Salat-Wurzelexudate und Salatmedium

Eine eventuelle Anpassung der Salmonellen an die Boden- und Pflanzenumgebung wurde auf transkriptioneller Ebene in einem hierfür speziell entwickelten Versuchsdesign untersucht. *S. 14028s* wurde zunächst auf LB-Agar bei 37°C über Nacht angezogen. Die geernteten Zellen wurden gewaschen und in MgCl₂ auf eine OD₆₀₀ von 0,1 (für Salatmedium-Behandlung) bzw. 1 (Boden, Minimal-Medium, Exudate) eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde in ca. 7 cm lange Dialyseschläuche mit einer Porengröße von 100 kD pipettiert, welche an beiden Seiten verschlossen wurden. Die mit *S. 14028s* inokulierten Dialyseschläuche wurden in Medien bestehend aus Salatwurzelexsudaten (re-suspendiert in 10 mM MgCl₂), Salatmedium (Fornefeld, *et al.*, 2017), Bodensuspensionen mit autoklaviertem und natürlichem Boden (re-suspendiert in 10 mM MgCl₂; 1:2 vol/vol) und einem Minimal-Medium über Nacht bei 180 rpm und 28°C inkubiert. Das Minimal-Medium bestand aus 20% M9 Salzen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; 5x concentrated), 2 mM MgSO₄ und 1,23 mM Glucose in sterilem de-ionisiertem Wasser. Nach der Inkubation wurden die *Salmonella*-Suspensionen in RNAprotect (QIAGEN, Hilden) überführt und die RNA mittels RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) extrahiert. Die rRNA wurde mit modifiziertem Ribominus Kit (Thermo Fisher, Braunschweig) aus den Proben entfernt. Mit Hilfe eines Covaris S220 Focused-ultrasonicator wurden die übrig gebliebenen RNAs fragmentiert. Für ein späteres Label an den 5'- und 3'-Enden wurden die Fragmente mit der antarctic phosphatase dephosphoriliert (NEB, Frankfurt) und mit der SUPERase• In™ and T4PNK (Thermo Fisher, Braunschweig) wieder phosphoriliert. Die Erstellung der Library erfolgte mit dem TruSeq Small RNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) und dem qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta BioSciences). Die Illumina HiSeq-Sequenzierung wurden extern an der Technische Universität München (TUM) in Kooperation mit Prof. Klaus Neuhaus durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Bowtie2 (Version 0.6), cufflinks (Version 2.2.1.0), cuffmerge (Version 2.2.1.0), cuffquant (Version 2.2.1.1) and cuffdiff (Version 2.2.1.5) auf dem JKI Galaxy Server. Aus den Sequenzen wurden dabei FPKM (Fragments Per Kilobase Million) Werte errechnet, was einen Vergleich und eine Umrechnung in Genexpressions-Level erlaubt. Die so

errechneten Unterschiede zwischen den Behandlungen wurden auf funktioneller Ebene mit Hilfe des Web-basierten Tools PANTHER weiter untersucht.

2.4.3 Extraktion von Wurzelexsudaten

Die Extraktion der Exsudate erfolgte wie in Witzel, *et al.*, (2017) beschrieben. Die Wurzeln von Salatpflanzen wurden vor der Sammlung der Exsudate zum Entfernen von anhaftendem Boden gewaschen und in steriles destilliertes Wasser eingetaucht. Nach 1 h wurden die Wurzeln in frisches steriles destilliertes Wasser überführt und zur Exsudation 4 h lang inkubiert. Die Wurzelexsudat-enthaltende Suspension wurde zum Entfernen vorkommender Bakterien mittels Cellulosemischester-Membranfilter (Porengröße 0,22 µm, Carl Roth, Germany) sterilfiltriert und anschließend durch Gefriertrocknung zehnfach aufkonzentriert. Die Exsudate von ungefähr 25 Pflanzen wurden zu je einer Probe vereint.

2.4.4 Transkriptom von EHEC-Stämmen in Reaktion auf Salatmedium

Um die genotypische Anpassung verschiedener EHEC und EHEC/EAEC Stämme in Konfrontation mit Komponenten der Pflanze zu untersuchen, wurde ebenfalls eine vergleichende Transkriptomanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Stämme *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai, *E. coli* O157:H7 Stamm 3072/96 und *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11φcu aufgrund ihrer unterschiedlichen Ausbruch-Historie, Virulenz-Charakteristika und Plasmid-Zusammensetzung als Prototypen ausgewählt, um deren genetische Reaktion bzw. Genexpression nach Konfrontation mit Pflanzenbestandteilen auf molekularer Ebene zu studieren. Die Stämme wurden dazu in einem Salat-Flüssigmedium als Modellsystem kultiviert (Fornefeld, *et al.*, 2017) und die differentielle Genexpression im Vergleich zur Kultivierung in M9-Minimal-Medium mit 0,4% Glukose analysiert. Die Zellen wurden nach 4,5 h in der exponentiellen Phase geerntet und normiert. Anschließend wurde die RNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und eine cDNA-Bibliothek mittels NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit erstellt. Die cDNA Bibliothek wurde mit der NextSeq500 (Illumina) sequenziert. Differentiell regulierte Gene wurde mittels Bioconductor R Paket DESeq2 bestimmt. Die differentiell signifikant hoch- bzw. herunterregulierten Gene geben Aufschluss über die Reaktion der einzelnen Stämme in Konfrontation mit pflanzlichen Bestandteilen.

2.5 Ermittlung der Überlebensfähigkeit von *S. enterica* in Abhängigkeit von mikrobiellen Bodengemeinschaften

Das Überleben von *S. enterica* im Boden ist Voraussetzung für die Besiedelung von Kulturpflanzen über das Wurzelsystem. Die vorherrschenden biotischen und abiotischen Umweltfaktoren können das Überleben im Boden beeinflussen. Da HPB mit der gegebenen mikrobiellen Gemeinschaft im Boden konkurrieren müssen, wurde im Rahmen des Projektes deren Einfluss auf das Überleben von *Salmonella* untersucht. Dazu wurden Rifampicin-resistente *S. enterica*-Stämme (Typhimurium 14028s, Typhimurium LT2 und Senftenberg) über Nacht in LB-Medium angezogen und in Böden inokuliert. In einem Ansatz wurde DS-Boden autoklaviert, um die Diversität der mikrobiellen Bodengemeinschaft zu reduzieren und das Überleben im Vergleich zum nicht autoklavierten DS-Boden (im Folgenden „natürlicher Boden“ genannt) zu untersuchen. Die Bakterien wurden in einer Zellzahl von 10^6 CFU/g Boden in den autoklavierten- und den natürlichen Boden eingearbeitet und die Böden auf eine Wasserhaltekapazität von 50% eingestellt. Jede Variante umfasste 4 Wiederholungen mit jeweils 33,33 ml Bodenvolumen (± 50 g), die in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 20°C inkubiert wurden. Probenahmen erfolgten in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 7 Monaten. Die Salmonellenzahlen wurden, wie zuvor beschrieben, kultivierungs-abhängig mittels Plattierung auf Spezialmedium sowie kultivierungs-unabhängig mittels qPCR ermittelt. Die DNA-Proben wurden des Weiteren genutzt, um die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft im Boden zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen. Dazu wurde in einer PCR die V3 - V4 Region des 16S rRNA-Gens amplifiziert und anschließend sequenziert. In den 25 μ l PCR-Ansätzen waren 1 μ l 1:5 verdünnte und aufgereinigte DNA, 0,625 U TrueStart Taq DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), TrueStart Puffer, 0.2 mM je Didesoxyribonukleosid-Triphosphat, 2,5 mM $MgCl_2$, je 0,3 μ M Primer 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) und Primer 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) enthalten (Caporaso, *et al.*, 2011, Sundberg, *et al.*, 2013). Der Versuch wurde in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt.

2.6 Übersicht über verwendete Materialien

Tabelle 2: **Verwendete Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> NEB5 α	Cloning strain	New England Biolabs
<i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium NCTC12023	Wildtyp	NCTC, lab stock
S. Typhimurium SR11	Wildtyp	Schneider and Zinder (1956)
S. Typhimurium 14028s	Wildtyp	Dr. Isabelle Virlogeux-Payant, INRA Tours, France
S. Typhimurium LT2 DSM 18522	Wildtyp	DSMZ Braunschweig
S. enterica Senftenberg	Wildtyp	Dr. Nicola Holden, The James Hutton Institute, Dundee, Scotland, UK
SR11 Δ 12	Δ <i>fimAICDHF</i> Δ <i>stbABCD</i> Δ <i>sthABCDE</i> Δ <i>stfACDEFG</i> Δ <i>stiABCH</i> Δ <i>bcfABCDEFGH</i> Δ <i>safABCD</i> Δ <i>pefACDorf5orf6</i> Δ <i>stcABCD</i> Δ <i>stjEDCBA</i> Δ <i>stdAB</i> Δ <i>lpfABCDE::KSac</i>	Sean Nuccio, unpublished
MvP2447	Δ 12 <i>misL::FRT</i>	This study
MvP2622	Δ 12 <i>shdA::aph</i>	This study
MvP2623	Δ 12 <i>sadA::aph</i>	This study
MvP2625	Δ 12 <i>bapABCD::aph</i>	This study
MvP2701	<i>csgBAC::aph</i>	This study
MvP2703	Δ 12 <i>csgBAC::aph</i>	This study
MvP2624	Δ 12 <i>SPI4::aph</i>	This study
MvP2507	Δ 12 <i>pagN::aph</i> -I-Scel	This study
MvP2506	Δ 12 <i>rck::aph</i> -I-Scel	This study
MvP702	<i>wzz::aph</i>	Hölzer <i>et al.</i> (2009)
MvP703	<i>fepE::aph</i>	Hölzer <i>et al.</i> (2009)
MvP711	<i>wzz::aph fepE::FRT</i>	Hölzer <i>et al.</i> (2009)
MvP886	<i>rfaL::aph</i>	Duerr <i>et al.</i> (2009)
MvP1527	<i>cheZ::aph</i>	Lorkowski <i>et al.</i> (2014)
MvP1209	<i>cheY::aph</i>	Lorkowski <i>et al.</i> (2014)
MvP2050	<i>motAB::aph</i>	Wille <i>et al.</i> (2014)
MvP1760	<i>fliC::FRT fljB::aph</i>	Fulde <i>et al.</i> (2018)
<i>E. coli</i> ORN172	Δ <i>fimBEACDFGH</i>	Woodall, <i>et al.</i> (1993)

Tabelle 3: **Verwendete Plasmide**

Plasmid	Genotyp	Referenz
pWRG730	Plasmid encoding Red $\alpha\beta\gamma$	Hoffmann <i>et al.</i> (2017)
pE-FLP	Flp-recombinase	St-Pierre <i>et al.</i> (2013)
pWSK29	Low copy number cloning vector	Wang & Kushner (1991)
p4253	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>bapABCD</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4380	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>csgBACEFG</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4389	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>stiABCD</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4390	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>stfACDEFG</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4391	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>stbACDEFG</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4392	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>fimAICDHF</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4393	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>safABCD</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4394	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>stdABCD</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4395	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>stjABCDE</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4396	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>pefACDEF</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4397	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>bcfACDEFG</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4399	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>stcABC</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4400	<i>tetR</i> P _{<i>tetA</i>} <i>sthABCDE</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)

p4401	<i>tetR</i> P _{tetA} <i>pagN</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4402	<i>tetR</i> P _{tetA} <i>rck</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4403	<i>tetR</i> P _{tetA} <i>misL</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4519	<i>tetR</i> P _{tetA} <i>lpfABCDE</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4520	<i>tetR</i> P _{tetA} <i>shdA</i> in pWSK29	Hansmeier, <i>et al.</i> (2017)
p4629	<i>tetR</i> P _{tetA} <i>ecpRABCDE-Sakai</i> in pWSK29	This study
P4759	<i>tetR</i> P _{tetA} <i>ecpRABCDE-C227</i> in pWSK29	This study
p4904	<i>tetR</i> P _{tetA} <i>hilD</i> in pWSK29	This study
p5035	<i>tetR</i> P _{tetA} <i>sadBA</i> in pWSK29	This study

Tabelle 4: **Verwendete P22-Phagenlysate**

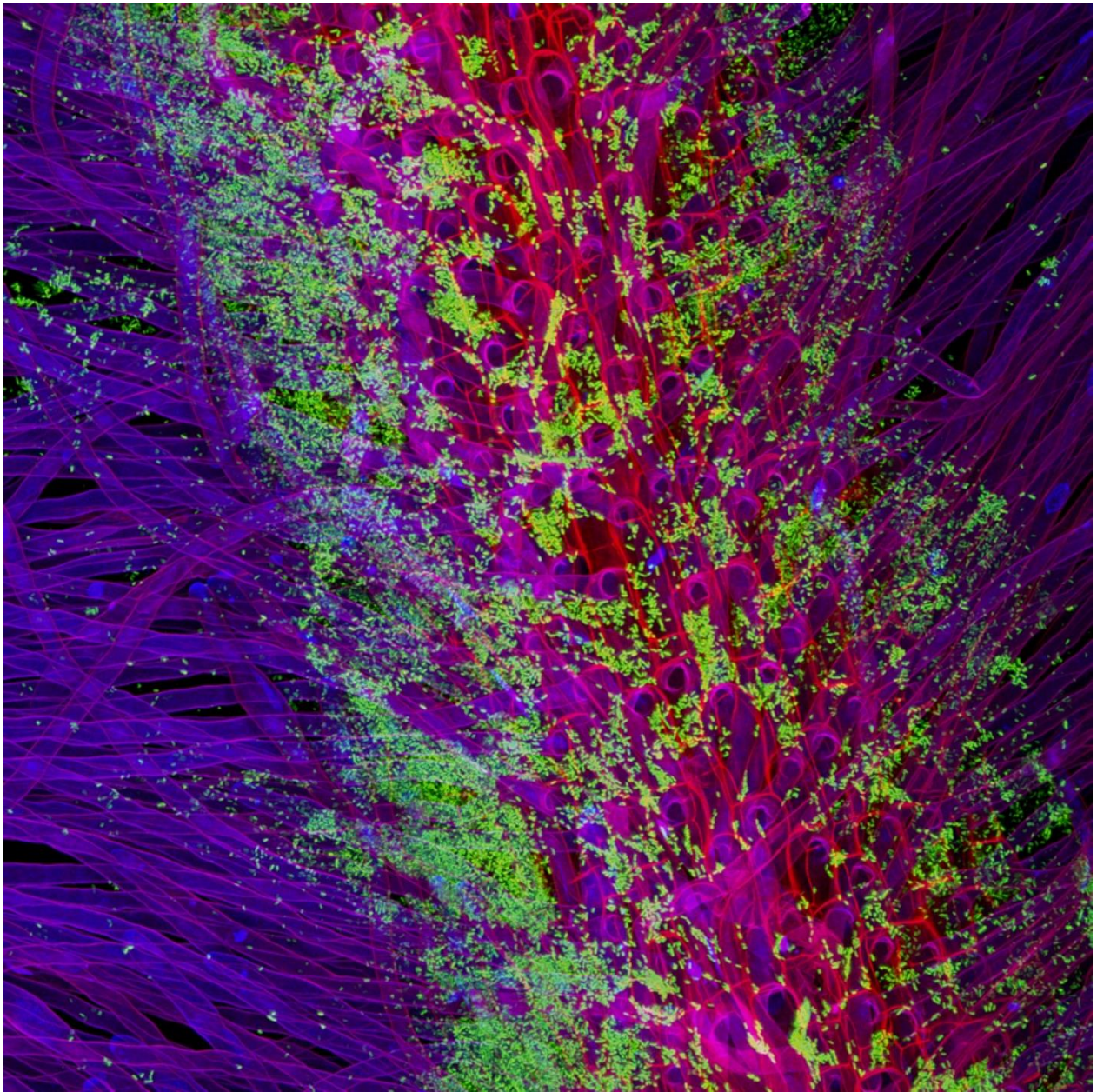
Stamm	P22 Lysat	Resistenz	Referenz
MvP1827	<i>misL::aph</i>	Km50	Lab stock AG Hensel
MvP1825	<i>shdA::aph</i>	Km50	Lab stock AG Hensel
MvP1663	<i>sadA::aph</i>	Km50	Lab stock AG Hensel
MvP1611	<i>bapABCD::aph</i>	Km50	Lab stock AG Hensel
MvP493	<i>SPI4::aph</i>	Km50	Lab stock AG Hensel
MvP2509	<i>pagN::aph-I-Scel</i>	Km50	Lab stock AG Hensel
MvP2508	<i>rck::aph-I-Scel</i>	Km50	Lab stock AG Hensel

Tabelle 5: **Verwendete Primer**

Name	Sequenz	Verwendung
1r-ST-Ptet-sadA-pWSK29	CCGGGCTGCAGGAATTCATGGCATTATGCCATTGC	<i>sadBA</i>
1f-ST_Ptet-fim-pWSK29	TCGACGGTATCGATAAGCTTAGGGAAAAAGGTTATGCTGCT	<i>sadBA</i>
Vf-pWSK29	GAATTCCTGCAGCCCGGGG	Vector p4392
Vr-pWSK29	AAGCTTATCGATACCGTCGACCTC	Vector p4392
CsgB-Del-For	GATAATTTTCGCTATGTACGACCAGGTCCAGGGTGACAGCATTCCGGGGATCCGTCGACC	<i>csgBAC</i> deletion
CsgC-Red-del-rev	CCGCCACCATCAAAAACTACTGTGCAGAAGGCGGCCATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	<i>csgBAC</i> deletion
K1-Red-Del	cagtcataagccgaatagcct	Check <i>csgBAC</i> deletion
K2-Red-Del	cggtgccctgaatgaactgc	Check <i>cgsBAC</i> deletion
CsgC-Check-rev	TGTTGCCCTACCGCAGAATG	Check <i>csgBAC</i> deletion
csgB-Check-Rev	ctgccagaaactacgattgc	Check <i>cgsBAC</i> deletion
EC-Sakai-ecp-GA-for	CCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAGTGACATGGCAAAATGATTACAGCAGGGACTATG	GA Ecp-Sakai
EC-Sakai-ecp-GA-rev	ACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAAATCTCAGTCCGCCGAAGGGGGCTTAG	GA Ecp-Sakai
C227-GA-pWSK29-Ecp_2_for	CCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAATGGAATGTCAAAACCGTTCTG	GA Ecp-C227
C227-GA-pWSK29-Ecp_2_rev	CCGGGCTGCAGGAATTCCTAGTCCGCCGAAGGGGG	GA Ecp-C227

Tabelle 6: **Verwendete Salatsorten**

Salatsorte	Spezies	Herkunft
Feldsalat	<i>Valerianella locusta</i>	Kommerziell erworben (N.L. Chrestensen Erfurter Samen- und Pflanzenzucht)
Kopfsalat	<i>Lactuca sativa L. cv Tizian</i>	Kommerziell erworben (Syngenta Agro GmbH)
Spinat	<i>Spinacia oleracea</i>	Kommerziell erworben (Edeka Bio Blattspinat)



(*S. enterica* GFP, grün dargestellt, an einer Salatwurzel mit Wurzelhaaren)

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Spezifische Nachweisverfahren für HPB in Pflanzen und Boden (AP1)

3.1.1 Nachweis und Extraktionseffizienz von *S. enterica* aus DS- und AL-Böden

Um die Extraktionseffizienz der Salmonellen aus den beiden Böden errechnen zu können, wurde eine definierte Zellzahl an Salmonellen in 10 mM MgCl₂ resuspendiert und dem DS und AL Boden zugemischt (Zellzahl 10⁶ CFU / g Trockenmasse). Um die zugegebene Anzahl an Salmonellen zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe des Inokulums ausplattiert und die CFU / g Boden Trockenmasse bestimmt. Unmittelbar nach Inokulation, 0 hours post inoculation (hpi) der Böden und zusätzlich nach 1 und 24 hpi wurde die CFU der Salmonellen in den Böden bestimmt. Zwei Reisolationsmethoden wurden dabei getestet, eine „sanfte“ Isolation mittels Über-Kopf-Schütteln sowie Vortexen der Proben für 1 min auf höchster Stufe. In beiden Böden (DS, AL) war direkt nach der Inokulation der Salmonellen (0 hpi) kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der reisolierten Salmonellen bei Vergleich der „sanften“ und der gevortexten Proben zu beobachten (*t*-Test, *p* > 0,05) (Tabelle 7). Dies traf für den DS-Boden auch für die Zeitpunkte 1 und 24 hpi zu, während aus dem AL-Boden nach 1 und 24 hpi eine signifikant höhere Anzahl an Salmonellen nach vortexen der Proben reisolieren konnte. Dies deutet darauf hin, dass die Salmonellen im AL-Boden an nichtlösliche Bodenpartikeln binden und daher mit der „sanften“ Isolationsmethode schlechter zu reisolieren sind. Für Quantifizierungen von Salmonellen in Böden wurde daher die Vortex-Methode ausgewählt.

Tabelle 7: Extraktionseffizienz von *S. Typhimurium* 14028s aus DS- und AL-Böden. Verglichen sind: „sanftes“ Schütteln (s) und Vortexen (v) für 1 min bei höchster Stufe. Die log Salmonellen-CFU/g Boden Trockenmasse wurden nach 0, 1 und 24 Stunden nach der Inokulation (hpi) des Bodens bestimmt. *Signifikanter Unterschied im Vergleich zur „sanften“ Reisolation ermittelt mittels Student's *t*-Test, *p* < 0,05, Standardabweichung (SD).

Boden	Zeitpunkt	Methode	CFU	SD	% Inokulum (log CFU)	
DS	Inokulum		5,93	0,16		
		0 hpi	s	5,98	0,14	101
	1 hpi	v	6,08	0,13	103	
		s	5,92	0,11	100	
	24 hpi	v	5,90	0,06	99	
		s	5,78	0,08	97	
	AL	Inokulum		5,88	0,06	
			0 hpi	s	5,65	0,19
1 hpi		v	5,67	0,09	96	
		s	5,21	0,25	89	
24 hpi		v	5,75*	0,09	98	
		s	5,29	0,12	90	
		v	6,16*	0,11	105	

3.1.2 Quantifizierung der Zellzahl von *S. enterica* mittels kultivierungs-abhängiger und –unabhängiger Methoden

Ein Vorteil der Bestimmung von *Salmonella*-Zellzahlen im Boden durch Kultivierung ist die niedrigere Nachweisgrenze. Um die Genauigkeit der Quantifizierung mittels kultivierungs- und kultivierungs-unabhängiger Methoden zu bestimmen und einen eventuellen VBNC-Zustand der Salmonellen auszuschließen, wurden Bodenproben zusätzlich zur kultivierungs-abhängigen Methode mittels qPCR untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei wurde zunächst die Anzahl an Salmonellen im Boden zum Zeitpunkt 0 Tage nach der Inokulation (dpi) mit beiden Methoden bestimmt. Es zeigte sich, dass die Zahl der Genkopien im Vergleich zur CFU-Zahl, ermittelt mittels kultivierungs-abhängiger Methode, geringer war. Um dies in den weiteren Untersuchungen zu berücksichtigen, wurde auf der Basis dieser Ergebnisse ein Umrechnungsfaktor errechnet. Ursache für die niedrigeren Werte der qPCR könnten Verluste bei der DNA-Extraktion aus dem Boden sein. Unter Benutzung dieses Korrekturfaktors wurden zu den Zeitpunkten 7 und 91 dpi keine Unterschiede in der reisolierten Zellzahl an Salmonellen bei Vergleich der beiden Methoden festgestellt (Tabelle 8). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Salmonellen im Boden nicht in den VBNC-Zustand übergehen. Eine Ausnahme bildet *Salmonella* Senftenberg, für den 7 und 91 dpi eine um 0,7 und 1,4 log signifikant höhere Genkopienzahl im Vergleich zur CFU-Zahl ermittelt wurde ($p < 0,05$). Daher kann bei diesem Stamm ein VBNC-Zustand nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 8: Bestimmung der CFUs von verschiedenen *Salmonella enterica* Stämmen in autoklaviertem DS Boden. Vergleichend dargestellt sind die CFUs jeweils zu den Zeitpunkten 7 und 91 Tage nach der Inokulation des Bodens (dpi) und die Genkopien (*invA*-Gen) ermittelt mittels qPCR mit *Salmonella*-spezifischen Primern für das *invA*-Gen. *Signifikante Unterschiede bei Vergleich der Methoden ermittelt mittels Student's *t*-Test ($p < 0,05$).

Zeitpunkt	Stamm	qPCR		Plattierung		<i>p</i> -Wert
		Genkopien	SD	CFU	SD	
7 dpi	14028s	8,3	0,9	8,2	1,15	0.96
	LT2	8,4	0,1	8,5	0,06	0.06
	Senftenberg	9,1*	0,1	8,4	0,37	0.01
91 dpi	14028s	6,9	1,4	7,0	0,55	0.92
	LT2	6,7	0,9	6,3	1,14	0.54
	Senftenberg	7,1*	0,4	5,7	0,71	0.02

3.1.3 Nachweisgrenze von *S. enterica* in Blattproben

Um die Nachweisgrenze der Salmonellen-Stämme in Blattproben von Kopfsalat und Feldsalat während der Probenahme des Zentralexperimentes zu bestimmen, wurden 0,25 g Blattmaterial mit bestimmten Zellzahlen an Salmonellen (von 10^0 bis 10^3) in 10 mM $MgCl_2$ 30 min lang inkubiert. Danach wurde, wie oben beschrieben, die Anwesenheit von Salmonellen durch Anreicherung ermittelt und parallel die Anzahl an Salmonellen auf den Blättern und im Inokulum kultivierungs-

abhängig quantifiziert. Die Nachweisgrenze der Salmonellen lag dabei zwischen 1 und 10 Zellen pro 0,25 g Blattmaterial (nicht gezeigt).

3.2 Der Verlust an Kultivierbarkeit von *E. coli* bei Kupferstress

Es konnte gezeigt werden, dass *E. coli* C600 bei Stress durch Kupfer-Ionen schneller in den VBNC-Zustand übergeht als *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai. Bei *E. coli* C600 war nach 4 Tagen ein kompletter Verlust an Kultivierbarkeit zu verzeichnen, während dies bei *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai erst nach 8 Tagen zu beobachten war (Abbildung 2). Zu diesem Zeitpunkt war für den pathogenen *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai ein Verhältnis an toten zu lebendigen, aber im VBNC-Zustand, Zellen im Verhältnis 20:80 % gegeben (Abbildung 3).

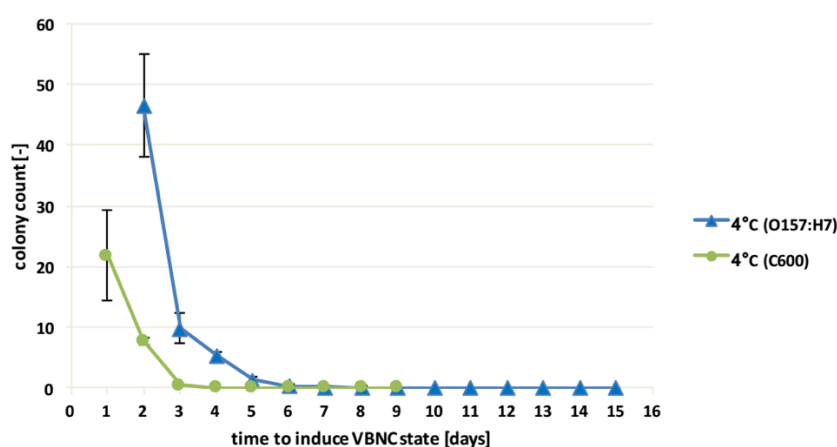


Abbildung 2: Vergleich der Kultivierbarkeit von *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai (Δ) und *E. coli* C600 (\bullet) ermittelt auf NA-Agar. Bakterien mit einer Zellzahl von 10^7 Zellen/ml befinden sich in 0,9 % NaCl + 500 μ M CuSO₄ und wurden bei 4°C inkubiert. Bei Tag 1 konnten für O157:H7 Stamm Sakai keine Kolonien ermittelt werden, da die untersuchten 10 μ l auf NA-Agar über den quantifizierbaren Bereich lagen. Standardabweichungen resultieren aus drei biologischen Replikaten.

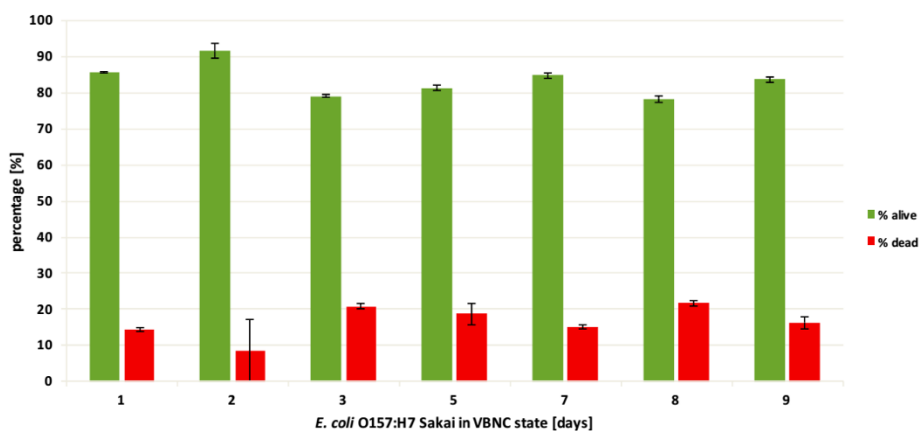


Abbildung 3: Verhältnis zwischen toten und lebendigen VBNC Zellen von *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zellen wurden mit dem LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit angefärbt. Gefärbte Bakterien wurden mittels Fluoreszenzmikroskop und 1000-facher Vergrößerung visualisiert und ausgezählt. Standardabweichungen resultieren aus dem Auszählen von 197 bis 291 Zellen.

3.3 Faktoren die das Überleben von HPB im Boden beeinflussen (AP2)

3.3.1 Überleben der Salmonellen im Boden in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren

Im Zentralexperiment von AP2 wurde der Einfluss der Faktoren: Bodentyp (DS, AL), organischer Dünger (Schweinegülle, HTK), Eintragsquelle (Dünger, Wasser) und Pflanzenart (Kopfsalat, Feldsalat) auf das Überleben von *S. enterica* im Boden sowie die Besiedlung der Pflanze in einem Gewächshausexperiment untersucht. Der organische Dünger wurde in den entsprechenden Varianten einen Monat vor der Pflanzung in den Boden eingearbeitet. Die Salmonellen ($\sim 10^6$ CFU/g Trockenmasse Boden) wurden dabei entweder zusammen mit dem organischen Dünger einen Monat vor der Pflanzung in den Boden eingearbeitet (Behandlung 1, Simulation der Kontamination des Bodens mit Salmonellen über den organischen Dünger) oder am Pflanztag (Tag 0, Behandlung 2, Simulation eines Eintrags von Salmonellen über Gießwasser oder Fäkalkontamination). Zum Vergleich der Behandlungen wurden Abnahmeraten der Salmonellen im Boden [$\log(\text{CFU})$ pro g Boden Trockenmasse und Tag] bestimmt. Die statistische Auswertung der Daten mittels eines generalisierten linearen Modells (Prozedur mixed, SAS 9.4) zeigt, dass die Faktoren Bodentyp, organische Düngerart sowie Zeitpunkt der Salmonellen-Applikation die Überlebensrate der Salmonellen im Boden signifikant beeinflussen (Tabelle 9). Des Weiteren war eine signifikante Interaktion zwischen organischer Düngerapplikation und dem Zeitpunkt der Salmonellenzugabe (Behandlung) gegeben.

Tabelle 9: Faktoren die Abnahme der Salmonellen-CFU im Boden beeinflussen, bestimmt durch die Anwendung eines generalisierten linearen Modells basierend auf den Abnahmeraten aus Tabelle 1. Sterne zeigen Signifikanz im Student's *t*-Test ($p < 0,05$).

Faktor	<i>p</i> -Werte
Bodentyp (DS, AL)	< 0,0001*
Organische Düngerart (Kontrolle, Schweinegülle, Hühnertrockenkot)	0,0155*
Zeitpunkt der <i>Salmonella</i> -Applikation (Behandlung 1 und 2)	0,0039*
Düngerapplikation x Zeitpunkt <i>Salmonella</i> -Applikation	0,0102*

Wird die in Tabelle 9 genannte Interaktion genauer aufgeschlüsselt, zeigt sich, dass die organischen Dünger nur bei Behandlung 1 (Simulation der Kontamination des Bodens mit Salmonellen über den organischen Dünger) einen positiven Effekt auf das Überleben der Salmonellen hatten. Bei der späteren Applikation der Salmonellen in Behandlung 2 (Simulation eines Eintrags von Salmonellen über Gießwasser oder Fäkalkontamination) zeigte sich kein deutlicher Einfluss der organischen Düngung (Abbildung 4). Eine Erklärung dafür könnten die mit den organischen Düngern zugefügten Nährstoffe sein, die eine Etablierung der Salmonellen im

Boden förderten. Bei späterer Zugabe der Salmonellen (Behandlung 2) zum Boden, versetzt mit organischem Dünger einen Monat zuvor, waren diese Nährstoffe vermutlich schon in Teilen durch das natürliche Bodenmikrobiom abgebaut.

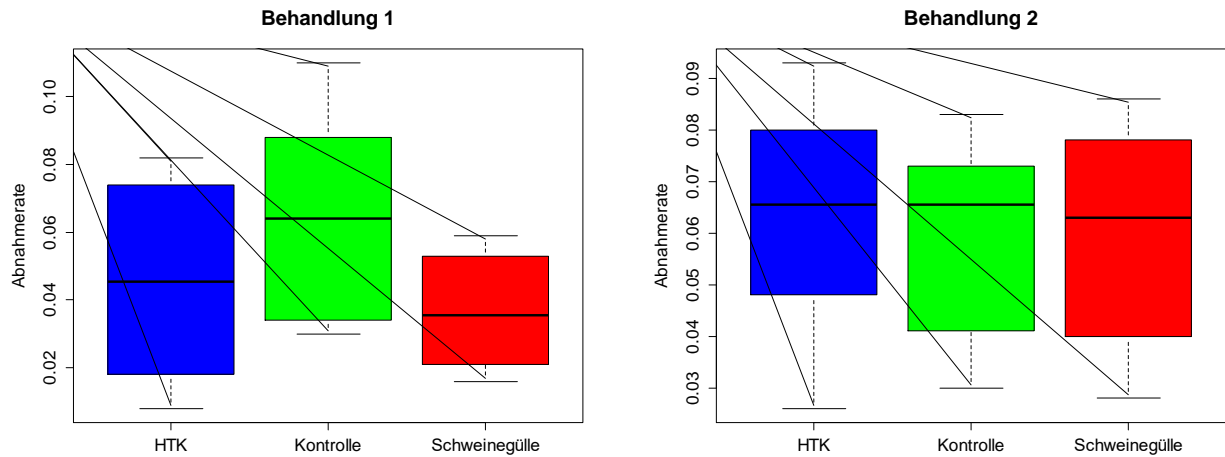


Abbildung 4: Einfluss der Düngerapplikation auf die Abnahmeraten (log(CFU) pro Tag) von Salmonellen im Boden, abhängig vom Zeitpunkt der Salmonellenapplikation (Behandlung 1: Zugabe der Salmonellen über organischen Dünger; Behandlung 2: Simulation eines Eintrags von Salmonellen über Gießwasser oder Fäkalkontamination). Eine geringere Abnahmerate ist ein Hinweis auf ein besseres Überleben der Salmonellen im Boden.

Betrachtet man die Abnahmeraten der einzelnen *Salmonella*-Stämme (Abbildung 5) zeigt der Stamm 14028s die geringste Abnahmerate gefolgt von Senftenberg und LT2 mit der größten Abnahmerate, wobei keine signifikanten Unterschiede bei Vergleich der Abnahmerate der einzelnen Stämme gegeben waren (Tukey HSD, $p > 0,05$).

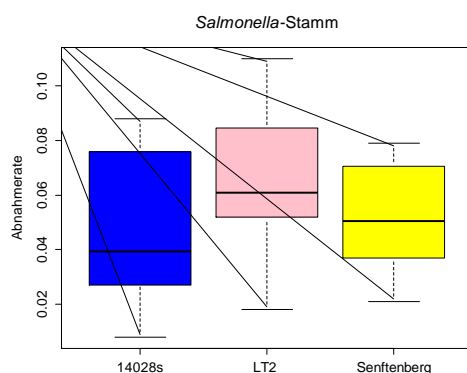


Abbildung 5: Abnahmeraten der untersuchten *Salmonella*-Stämme [log(CFU) pro Tag].

Die durchschnittlichen Abnahmeraten für die einzelnen Varianten auf der Basis der Koloniebildenden Einheiten (log CFU) pro g Boden (Trockenmasse) und Tag sind in Tabelle 10 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist eine geringere Abnahme der Salmonellen im AL- im Vergleich zum DS-Boden. Insgesamt lag die Abnahme der Salmonellen-Zahlen im Boden im Bereich zwischen 0,008 und 0,11 log CFU pro Tag. Pflanzenart hatte keinen Einfluss auf das Überleben von Salmonellen im Boden (nicht gezeigt).

Tabelle 10: Abnahmeraten der log CFU in Abhängigkeit vom Bodentyp (AL, DS), Zeitpunkt der Salmonellenzugabe (Behandlung 1: Zugabe der Salmonellen über organischen Dünger; Behandlung 2: Simulation eines Eintrags von Salmonellen über Gießwasser oder Fäkalkontamination), organische Düngerart und *Salmonella*-Stamm. Geringste Abnahmeraten sind in grün und höchste Abnahmeraten in rot dargestellt, dazwischenliegende Werte in farblicher Abstufung. Höhere Werte zeigen hier eine hohe Abnahmerate und somit ein schlechteres Überleben der *Salmonella*-Stämme im Boden.

Boden	<i>Salmonella</i>	Dünger	<i>Salmonella</i>		
			14028s	Senftenberg	LT2
AL	Behandlung 1 (via Dünger)	Kontrolle	0,030	0,034	0,052
		Schweinegülle	0,016	0,021	0,022
		HTK	0,008	0,024	0,018
	Behandlung 2 (via Wasser)	Kontrolle	0,030	0,041	0,063
		Schweinegülle	0,028	0,040	0,053
		HTK	0,026	0,048	0,052
DS	Behandlung 1 (via Dünger)	Kontrolle	0,088	0,076	0,110
		Schweinegülle	0,049	0,053	0,059
		HTK	0,074	0,067	0,082
	Behandlung 2 (via Wasser)	Kontrolle	0,073	0,068	0,083
		Schweinegülle	0,078	0,073	0,086
		HTK	0,080	0,079	0,093

3.3.2 Überleben von *S. enterica* in Boden mit reduzierter mikrobieller Gemeinschaft

Um das Überleben von *S. enterica* im Boden in Abhängigkeit von der mikrobiellen Gemeinschaft zu beurteilen, wurde die Überlebensrate in autoklaviertem DS-Boden (reduzierte mikrobielle Diversität) mit dem in natürlichen DS-Boden (hohe mikrobielle Diversität) verglichen. Dazu wurde zunächst die Veränderung der mikrobiellen Bodengemeinschaft nach autoklavieren untersucht. Die Sequenzierung von 16S rRNA-Genfragmenten hat gezeigt, dass die prokaryotische Diversität (Shannon index, nicht gezeigt) wenige Tage (7 dpi) nach dem Autoklavieren des Bodens, im Vergleich zum natürlichen Boden deutlich reduziert war ($p < 0,05$, Abbildung 6). Nach 91 Tagen war ein Angleich in der Diversität zum natürlichen Boden zu beobachten, allerdings war der Unterschied noch immer signifikant. Einige Phyla wie Crenarchaeota (Archaea), Acidobacteria und Chloroflexi (Bakterien) waren nur in den DNA-Proben aus natürlichem Boden zu finden. In autoklaviertem Boden waren diese Phyla auch 91 Tage nach dem Autoklavieren nur zu einem sehr geringen Anteil nachweisbar.

Die drei eingesetzten *Salmonella*-Stämme waren sowohl in natürlichem als auch autoklaviertem Boden über einen Zeitraum von 160 Tagen nachweisbar. Während im natürlichen Boden die CFU aller drei Stämme deutlich und stetig abnahm, war im autoklavierten Boden nur eine geringe Abnahme der CFU zu verzeichnen (Abbildung 7). In autoklaviertem Boden war die Gesamtanzahl der (mittels R2A-Medium über Nacht) kultivierbaren Bakterien zu Beginn wesentlich geringer im

Vergleich zum natürlichen Boden. Nach einer Inkubationsdauer von 14 Tagen waren jedoch vergleichbare Bakterienzahlen ($10^7/g$ Boden) bzw. CFU im autoklavierten und natürlichen Boden gegeben. Die Ergebnisse konnten kultivierungs-unabhängig mittels qPCR bestätigt werden. Es ist anzunehmen, dass sich die applizierten *Salmonella*-Stämme im autoklavierten Boden aufgrund der freien ökologischen Nischen besser etablieren konnten und die nachfolgend den Boden re-besiedelnden bakteriellen Populationen mit den Salmonellen konkurrieren mussten. Diese etablieren sich entsprechend in geringerer Abundanz bzw. Diversität. Die durch das Autoklavieren abgetöteten Mikroorganismen und Protozoen könnten einerseits eine Nahrungsquelle für die applizierten Salmonellen darstellen aber andererseits auch eine Eliminierung von Konkurrenten bedeuten. Diese Bedingungen tragen vermutlich zu der höheren Überlebensfähigkeit der Salmonellen im autoklavierten Boden im Vergleich zum natürlichen Boden bei.

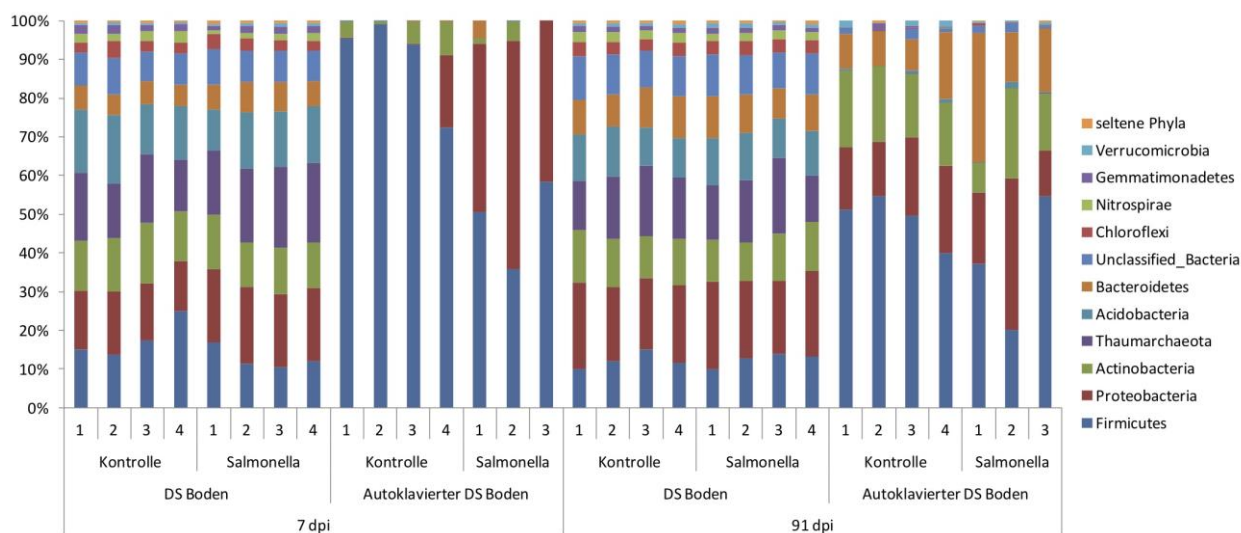


Abbildung 6: Relative Abundanz an Phyla der Prokaryoten in autoklaviertem und natürlichem DS-Boden. Gezeigt sind die Varianten mit und ohne *Salmonella* Typhimurium 14028s zu den Zeitpunkten 7 und 91 Tagen nach der Inokulation (dpi) bei 20°C. Zur besseren Übersicht sind Phyla mit weniger als 0,5% unter „seltene Phyla“ zusammengefasst.

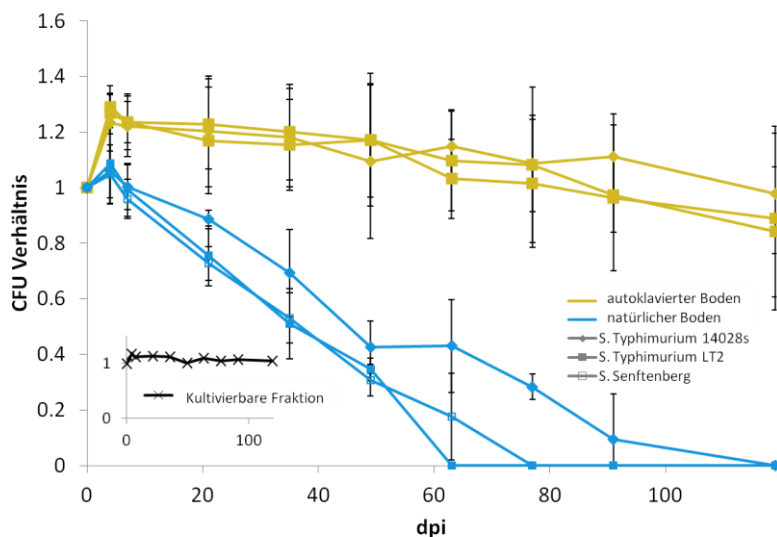


Abbildung 7: Abnahme der Zellzahlen [CFU] verschiedener *Salmonella enterica* Stämme in autoklaviertem und natürlichem Boden (DS). Gezeigt ist der Verlauf der CFU in drei biologisch unabhängigen Wiederholungen in Bezug zur applizierten Zellzahl (Zeitpunkt 0 dpi).

3.3.3 Überleben von *E. coli* (EHEC) in DS- und AL-Böden

Generell nahmen die *E. coli* Populationen unabhängig von Stamm und Bodentyp über die Versuchszeit deutlich ab. Deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen und den getesteten Bodentypen waren nicht zu beobachten (Abbildung 8). Allerdings fällt hierbei auf, dass der Bodentyp signifikant die Überlebensrate von *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11φcu beeinflusst. Eine signifikant höhere Zellzahl bzw. CFU/g war in AL-Böden im Vergleich zu DS-Böden nach 7 und 14 Tage nach der Inokulation zu verzeichnen. Das Überleben von *E. coli* scheint wie bei *S. enterica* im nährstoffhaltigeren AL mit höherem Tonanteil begünstigt.

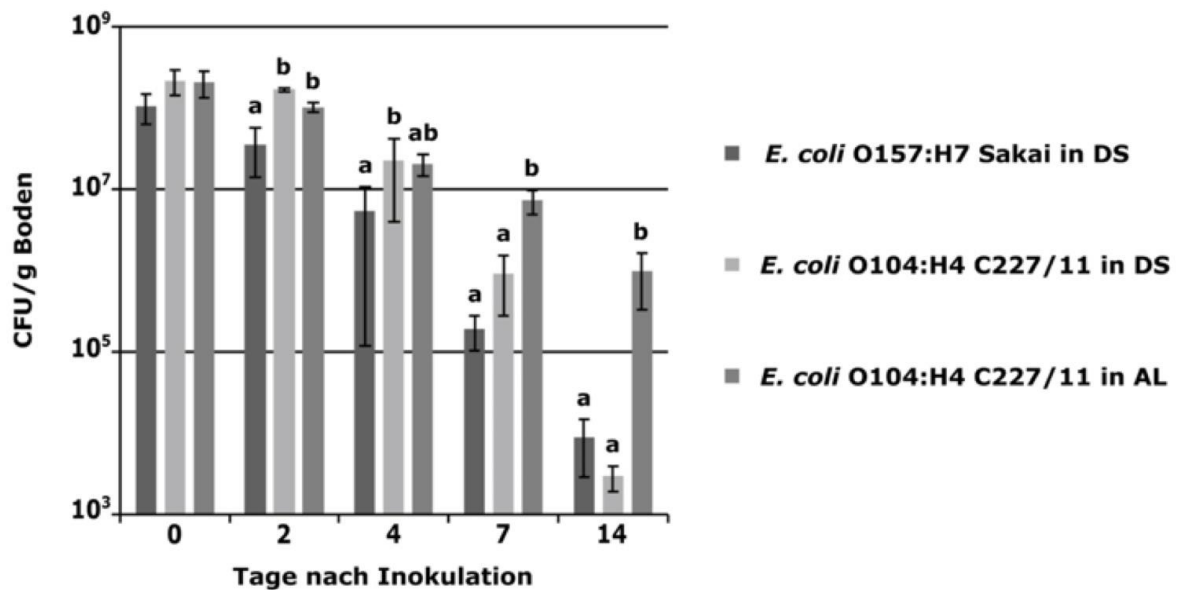


Abbildung 8: Überleben von EHEC-Stämmen in DS- und AL-Böden. 1 g Boden wurde mit 10⁸ CFU/g inokuliert und für 14 Tage inkubiert. Die Anzahl der kolonienbildenden Einheiten pro Gramm Boden wurde nach 0, 2, 4, 7, und 14 Tagen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Unterschiedliche Buchstaben weisen Signifikanzen zwischen den Varianten der jeweiligen Tage aus ($p < 0,05$).

3.4 Besiedlung von Kopf- und Feldsalat durch *S. enterica* (AP3)

Im Zentralexperiment, Beschrieben in 2.2.1 und 3.3.1, wurde neben dem Überleben der Salmonellen im Boden die Kolonisierungsrate der Phyllosphäre von Kopf- und Feldsalat über die Wurzel in Abhängigkeit der Faktoren Bodentyp, organische Düngerart sowie Zeitpunkt der Salmonellen-Applikation über einen Zeitraum von 49 Tagen untersucht.

Um die Kolonisierung der Phyllosphäre von Kopf- und Feldsalat durch *S. enterica* zu untersuchen, wurde, angelehnt an die ISO 6579 Norm, eine zweistufige Anreicherung von Blättern der in *Salmonella*-inokuliertem Boden gewachsenen Pflanzen mit Buffered-Pepton-Water (BPW) und Rappaport-Vassiliadis Medium (RVS) mit Ausplattierung auf XLD-Platten kombiniert (siehe Material und Methoden 2.1.4). Insgesamt wurde die Kolonisierungsrate von 3024 Pflanzen (1512 Kopfsalat-, 1512 Feldsalatpflanzen) zuzüglich Kontrollen getestet. Da zum Teil mehrere Pflanzen vereint wurden um den Probenumfang zu reduzieren werden Anteile *Salmonella*-positiver Pflanzen als Prozentbereiche angegeben (min-max).

Insgesamt waren im Mittel 0,5 bis 0,9% der Pflanzen mit Salmonellen besiedelt. Deutliche Unterschiede zeigten sich bei Vergleich der Varianten (Tabelle 11). Die Pflanzen im DS-Boden waren deutlich häufiger kolonisiert im Vergleich zu Pflanzen kultiviert in mit Salmonellen inokulierten AL-Boden. Die Zugabe von organischem Dünger schien insgesamt keinen fördernden Einfluss auf die Kolonisierung durch Salmonellen gehabt zu haben. Allerdings hatte die Zugabe der Salmonellen zu organischem Dünger etwa einen Monat vor dem Umsetzen der Pflanzen (Behandlung 1) einen leicht positiven Effekt auf die Kolonisierungsrate im Vergleich zu Behandlung 2 (Simulation eines Eintrags von Salmonellen über Gießwasser oder Fäkalkontamination einen Monat nach Düngerzugabe), was möglicherweise auf die bessere Überlebensrate der Salmonellen im Boden dieser Behandlungsvariante (1) verbunden ist (Tabelle 9). Kopfsalat war deutlich anfälliger für die Kolonisierung durch Salmonellen als Feldsalat, wobei Kopfsalat klare Unterschiede zwischen den Salmonellen-Stämmen zeigte und am häufigsten durch 14028s (1,6 - 3,0%) gefolgt von Senftenberg (0,4 - 0,8%) und LT2 (0,2 – 0,4%) kolonisiert wurde.

Über die Zeit von 49 Tagen sank zwar tendenziell der Anteil der Pflanzen bei denen Salmonellen in den Blattproben über Anreicherung nachgewiesen werden konnte, doch war die Abnahme aufgrund der starken Variabilität der Ergebnisse zwischen den einzelnen Probenahmezeitpunkten (4, 7, 21, 35 und 49 Tage) nicht signifikant (Analyse über lineares Modell, Prozedur lm, R Version 3.2.1, $p > 0.05$). Ein Zusammenhang des Anteils kontaminierter Pflanzen und der Abnahme der Zellzahl der Salmonellen im Boden ist jedoch nicht ausgeschlossen und sollte nachfolgend untersucht werden.

Tabelle 11: Prozentualer Anteil (%) an Pflanzen, bei denen eine Besiedlung durch Salmonellen in den Blattproben nachgewiesen wurde. Da zum Teil mehrere Pflanzen gepoolt wurden um den Probenumfang zu reduzieren werden Anteile *Salmonella*-positiver Pflanzen als Prozentbereiche angegeben (min-max). Zur besseren Übersicht wurden hier bestimmte Vergleiche (Varianten) zusammengefasst und der Anteil der kolonisierten Pflanzen (%) farblich hervorgehoben (von gelb nach rot). Behandlung 1: Zugabe der Salmonellen über organischen Dünger; Behandlung 2: Simulation eines Eintrags von Salmonellen über Gießwasser oder Fäkalkontamination.

Zusammengefasste Varianten	Zahl der Pflanzen	positiv (min)	positiv (max)	% min	% max	
DS	alle	1104	10	17	0.91	1.54
	Behandlung 1	552	5	10	0.91	1.81
	Behandlung 2	552	5	7	0.91	1.27
AL	alle	1920	5	10	0.26	0.52
	Behandlung 1	960	3	6	0.31	0.63
	Behandlung 2	960	2	4	0.21	0.42
Kopfsalat	alle	1512	11	21	0.73	1.39
	14028s	504	8	15	1.59	2.98
	LT2	504	1	2	0.20	0.40
	Senftenberg	504	2	4	0.40	0.79
Feldsalat	alle	1512	4	6	0.26	0.40
	14028s	504	1	1	0.20	0.20
	LT2	504	1	2	0.20	0.40
	Senftenberg	504	2	3	0.40	0.60
Organische Düngerzugabe	Schweinegülle	840	4	8	0.48	0.95
	HTK	672	2	2	0.30	0.30
	Kontrolle	1512	9	17	0.60	1.12
Insgesamt	3024	15	27	0.50	0.89	

3.4.1 Überleben von *S. enterica* auf den Blättern von Kopf- und Feldsalat

Im Zentralexperiment zeigte sich, dass Kopfsalat bzw. dessen Blätter häufiger mit Salmonellen besiedelt waren als die Blätter von Feldsalat. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die unterschiedliche Konfrontation der Pflanzen mit Zellzahlen von Salmonellen bzw. unterschiedliche Überlebensbedingungen auf/in den Blättern sein. Um dies zu testen, wurden Kopf- und Feldsalatblätter mit verschiedenen Zellzahlen von *S. enterica* 14028s besprüht und die Häufigkeit bzw. das Vorhandensein der Salmonellen über die Zeit durch kultivierungs-abhängige Anreicherung bestimmt (Tabelle 12).

Tabelle 12 zeigt eine Abnahme der Zellzahlen an Salmonellen auf den Blättern unter Gewächshausbedingungen über die Zeit. Auf den Blättern von Kopfsalat wurden Salmonellen bis 35 Tage nach der Inokulation der Blättern in den Varianten, besprüht mit den höchsten Zellzahlen (10^7 , 10^6 , 10^5), detektiert, während ein Nachweis an Feldsalat bis 35 Tage nach der Inokulation nur bei der höchsten Zellzahl (10^7) möglich war. Auch im Zentralexperiment war eine geringere Besiedlungsrate der Feldsalatpflanzen gegeben. Eine unterschiedliche Blattbeschaffenheit bzw.

Mikroklima (z.B. Blattfeuchte) auf den Blättern von Feldsalat im Vergleich zu Kopfsalat könnte eine Ursache für die geringere Besiedlungs- und Überlebensrate der Salmonellen an Feldsalat sein. Dies wäre jedoch im Weiteren zu prüfen.

Tabelle 12: Zellzahl und Persistenz [Tage nach der Inokulation (dpi)] von *S. enterica* 14028s auf Kopf- und Feldsalatblättern [log Salmonellen-CFU pro g Blattfrischmasse (BFM)] in Abhängigkeit von dem applizierten Inokulum. Ein positiver Salmonellen-Nachweis nach Anreicherung (n.A.) mittels BPW und RVS bzw. ein negativer Befund nach Anreicherung (-) sind gekennzeichnet. Das Inokulum entspricht den applizierten Zellzahlen an Salmonellen, die auf die Blätter gesprüht wurden (CFU pro ml).

		Log CFU/g BFM			
	Inokulum	0 dpi	7 dpi	21 dpi	35 dpi
Kopfsalat	1x10 ⁷	5,9 ± 0,6	3,0	1,3 ± 0,1	1,2
	1x10 ⁶	5,0 ± 0,5	n.A.	0,6 ± 0,1	0,9
	1x10 ⁵	3,9 ± 0,9	0,8	n.A.	n.A.
	1x10 ⁴	2,5 ± 1,0	-	n.A.	-
	1x10 ³	1,7	-	-	-
	1x10 ²	1,7	-	-	-
Feldsalat	1x10 ⁷	5,4 ± 0,1	2,5	n.A.	n.A.
	1x10 ⁶	4,0 ± 0,5	-	n.A.	-
	1x10 ⁵	2,8 ± 0,1	-	-	-
	1x10 ⁴	2,3 ± 0,3	-	-	-
	1x10 ³	-	-	-	-
	1x10 ²	-	-	-	-

3.4.2 Visualisierung der Besiedlung von Kopf- und Feldsalatpflanzen durch *S. Typhimurium* 14028s

Um die Besiedlung von Kopf- und Feldsalatpflanzen durch Salmonellen mikroskopisch zu untersuchen, wurden die Pflanzen mit GFP-markierten *S. enterica* 14028s Stämmen inokuliert. Die Besiedlung der Pflanzen mit Salmonellen wurde in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen der Pflanzen (steril und unsteril, siehe Punkt 2.3.1) und des Inokulationszeitpunktes mit *S. enterica* 14028 GFP mittels Konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM, SP8, Leica) bzw. mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Gefärbt wurden die CLSM-Präparate mit Propidiumiodid (Zellwand der Pflanzen und DNA in toten Bakterienzellen) und DAPI (DNA, Kutikula der Blätter). Die CLSM und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass Salmonella die Kopfsalat- und Feldsalatpflanzen besiedeln kann. Mögliche Internalisierungswege über die Wurzel sind Rhizodermis und Wurzelhaarzellen (Abbildung 9) sowie die Austrittsstellen von Sekundärwurzeln (nicht gezeigt). Des Weiteren wurde deutlich, dass Salmonellen über Hydathoden (Abbildung 10) und Spaltöffnungen in die Blätter eindringen und dort für mehrere Wochen überleben können (nicht gezeigt).

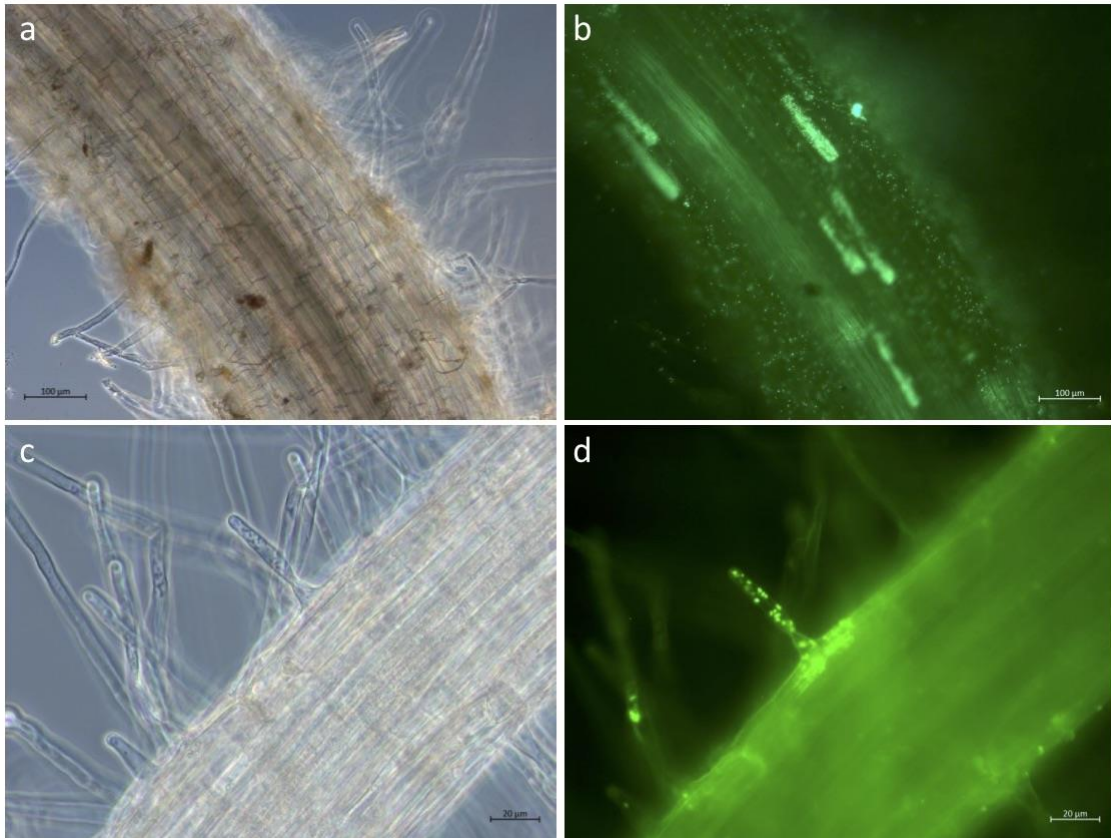


Abbildung 9: Phasenkontrast (a, c) bzw. fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (b, d) der Wurzeln von Kopfsalat (a, b) und Feldsalat (c, d) nach 24 h Inkubation mit *S. enterica* 14028s GFP. Kolonisierung von Rhizodermiszellen (b) und Wurzelhaarzellen (d) mit *S. enterica* 14028s GFP.

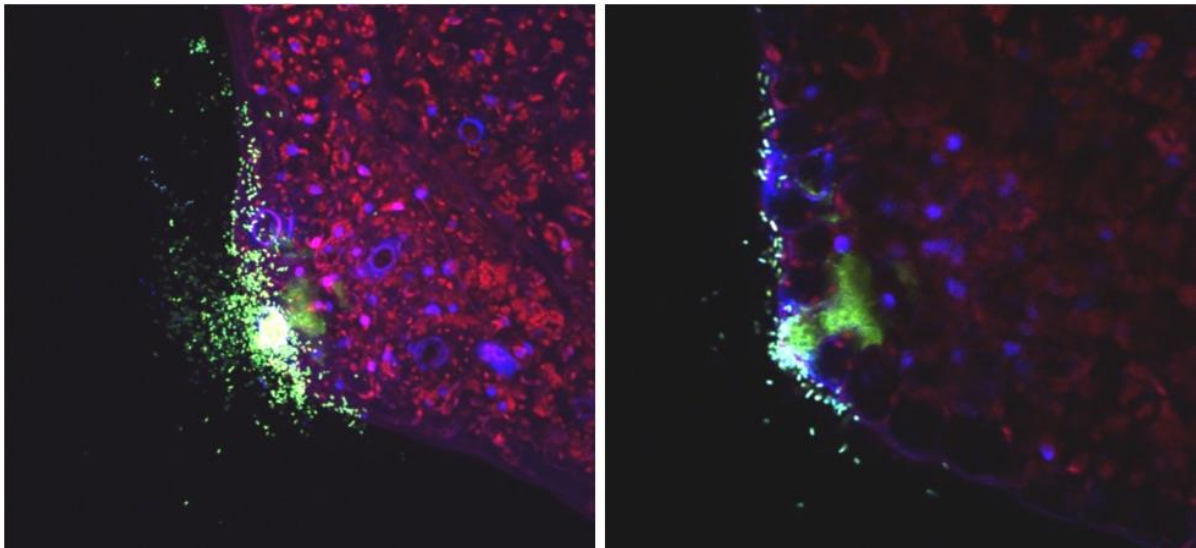


Abbildung 10: CLSM Bilder von Kopfsalat-Blattbereiche mit Hydathoden, inokuliert mit *S. enterica* 14028s GFP für 24 h in *Salmonella*-Suspension (in 10mM MgCl₂). Maximale Projektion (links) und Darstellung einer tieferen Ebene (rechts) zeigen Hydathodenöffnungen, Nukleus und Kutikula in blau, Autofluoreszenz von Chloroplasten in rot und GFP markierte Salmonellen in grün. Deutlich zu sehen sind *S. enterica* 14028s GFP im inneren der Hydathoden.

3.5 Besiedlung von Salatwurzeln und der Einfluss der genetischen Ausstattung der EHEC-Bakterien auf die Infektion (AP3)

EHEC verfügen über eine umfangreiche Ausstattung an Virulenz- und Adhärenzfaktoren. Für Pili, Flagellen und das Typ III Sekretionssystem (T3SS) wurde bereits gezeigt, dass sie unter Laborbedingungen für die Adhärenz an Blattgemüse wichtig sind (Saldana, *et al.*, 2011, Macarisin, *et al.*, 2012, Nübling, *et al.*, 2017). Es ist jedoch wenig darüber bekannt, welche Faktoren für die Kolonisierung von Pflanzenwurzeln wichtig sind. Daher wurde in diesem Projekt untersucht, welchen Einfluss die Adhärenz-assoziierten Gene *fliC*, *hcpA* und *iha* auf die Adhärenz bzw. Internalisierung von *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai an bzw. in Feldsalatwurzeln hat. Darüber hinaus wurde analysiert, ob unterschiedliche EHEC Stämme im unterschiedlichen Ausmaß Pflanzenwurzeln kolonisieren.

Betreffend der Versuche mit *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai und den genannten Mutanten wurden folgende Ergebnisse erzielt: Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten in allen Fällen EHECs im Wurzelgewebe detektiert werden (Abbildung 11). Jedoch konnte mit dieser Methode nicht bestimmt werden, ob Unterschiede zwischen *E. coli* Stamm Sakai Wildtyp und den Mutanten oder zwischen adhärennten und internalisierten Bakterien bestehen. Deswegen wurde zusätzlich eine CFU-Analyse durchgeführt, d.h. Homogenisieren der Wurzeln und anschließender kulturabhängiger Nachweis von *E. coli* im Homogenat auf Selektivmedium. Interessanterweise waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten bezüglich der Adhärenz zu beobachten (Abbildung 12). Die Zahl der in die Wurzeln internalisierten Bakterien lag zwischen $1,1 \times 10^1$ und $2,8 \times 10^2$ CFU/g Wurzel und lag damit im Bereich der für Hackfleisch beschriebenen infektiösen Dosis. Die Unterschiede in der Internalisierung, die bereits in Vorversuchen gezeigt wurden, konnten bestätigt werden. Die Deletion von *hcpA* und *iha* bzw. die Deletion beider Gene führte zu einer signifikanten Reduktion der Internalisierung. In besagten Vorversuchen wurde ebenfalls die Rolle von *fliC* bei der Internalisierung von *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai in Feldsalatwurzeln untersucht. Da diese Analyse ergab, dass *fliC* keinen Einfluss auf die Internalisierung hat, wurde diese Deletionsmutante nicht in die Hauptversuche einbezogen. Internalisierung von EHEC scheint nicht ausschließlich von den beiden Genen *hcpA* und *iha* reguliert zu sein, da die *hcpA*- und *iha*-negative Doppelmutante noch in der Lage ist, in Wurzeln einzudringen. Die Adhärenz-assoziierten Gene *hcpA* und *iha* scheinen in der Kolonisierung von Salatwurzeln eher Internalisierungsfaktoren als Adhärenzfaktoren zu sein.

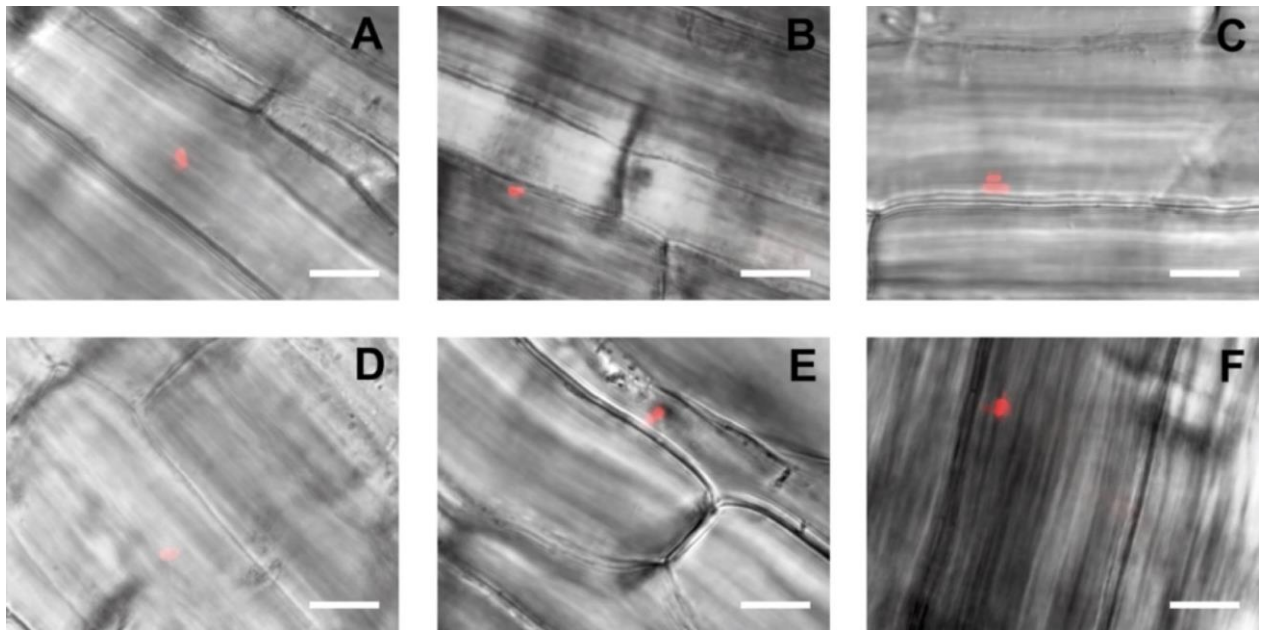


Abbildung 11: Mikroskopische Analyse fluoreszierender Bakterien in den Wurzeln von Feldsalat nach 4 Tagen Inkubation. Fluoreszenzmikroskopie wurde nach Waschen und Desinfektion der Wurzeln durchgeführt. Abgebildet sind der *E. coli* O157:H7 Wildtyp (A), die *iha*-negative Mutante (B), die komplementierte *iha* Deletionsmutante (C), die *hcpA*-negative Mutante (D), die komplementierte *hcpA* Deletionsmutante (E) und die *iha*- und *hcpA*-negative Doppelmutante (F). Die Skala gibt 10 μ m an. Gesamtvergrößerung war 100-fach.

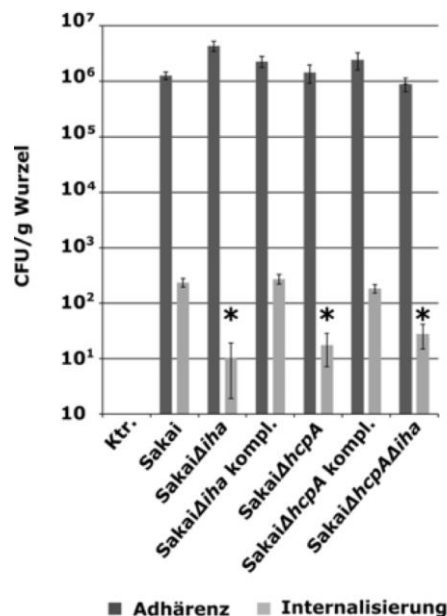


Abbildung 12: Anzahl der adhärennten und der in Wurzel von Feldsalat internalisierten Bakterien in CFU/g Wurzel. Feldsalatpflanzen wurden in DS angezogen und die Pflanztpöfe wurden mit $5,0 \times 10^8$ CFU/ml der angegebenen Stämme inokuliert und für 4 Tage inkubiert. An bzw. in den nicht kontaminierten Kontrollwurzeln (Ktr.) konnten wie erwartet keine Bakterien detektiert werden. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten an, die in Triplikaten durchgeführt wurden. *Gibt Signifikanz gegenüber der Internalisierung von Wildtyp und den komplementierten (kompl.) Deletionsmutanten an, $p < 0,05$.

Zusätzlich wurde analysiert, ob sich die EHEC Stämme O157:H7 Stamm Sakai und O104:H4 Stamm C227/11φcu in ihrer Fähigkeit zur Adhärenz an bzw. Internalisierung in Feldsalatwurzeln unterscheiden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass beide Stämme im ähnlichen Maße an die Wurzeln von Feldsalat adhären und in diese internalisieren (Abbildung 13). Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zu beobachten. Unter den getesteten Bedingungen weisen unterschiedliche pathogene *E. coli* ähnliche Fähigkeiten zur Adhärenz an bzw. Internalisierung in Feldsalatwurzeln auf.

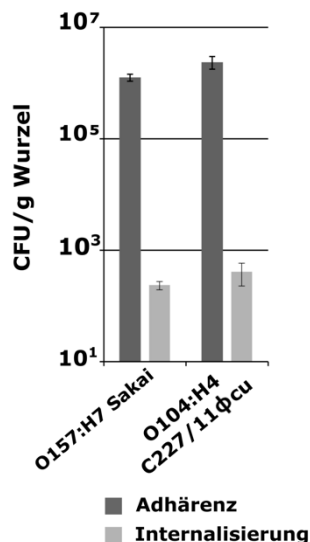


Abbildung 13: Anzahl der adhären und der in Wurzel von Feldsalat internalisierten Bakterien in CFU/g Wurzel. Feldsalatpflanzen wurden in DS angezogen und die Pflanzen wurden mit $5,0 \times 10^8$ CFU/ml der angegebenen Stämme inokuliert und für 4 Tage inkubiert. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardfehler von drei unterabhängigen Experimenten an, die in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.5.1 Einfluss von Bodentyp und Pflanzenart auf Adhärenz und Internalisierung von EHEC in den Wurzeln

Im Weiteren wurde untersucht, ob Bodentyp und Pflanzenart einen Einfluss auf die Kolonisierung von EHEC haben. Dazu wurden Feld- und Kopfsalatpflanzen jeweils in DS und AL angezogen. Wie bereits in den Versuchen mit *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai konnte auch in diesen Versuchen, die Anwesenheit von *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11 φcu an den Wurzeln durch Fluoreszenzmikroskopie in allen Fällen nachgewiesen werden (Abbildung 14). Unterschiede zwischen adhären (A-D) und internalisierten (E-H) Bakterien konnten detektiert werden. Allerdings waren keine Unterschiede zwischen den gewählten Parametern in Abhängigkeit vom Bodentyp und der Pflanzenart gegeben. Mittels quantitativer Analyse konnte gezeigt werden, dass der Boden einen signifikanten Einfluss auf die Adhärenz hat (Abbildung 15), wohingegen keine Unterschiede zwischen den untersuchten Pflanzenarten gefunden wurden. Die Zahl der internalisierten Bakterien lag zwischen $2,4 \times 10^2$ und $2,6 \times 10^4$ CFU/g Wurzel und damit deutlich über der Infektionsdosis. Hier scheint allerdings die Pflanzenart einen Einfluss auf die Internalisierung der Wurzeln zu haben, da signifikant weniger internalisierte Bakterien in Feldsalatwurzeln gefunden wurden im Vergleich zu Kopfsalatwurzeln (Abbildung 15).

Interessanterweise konnte bei Kopfsalat ein signifikanter Einfluss des Bodens auf die Internalisierung beobachtet werden, der bei Feldsalat nicht vorhanden war. Zusammenfassend scheint das Ausmaß der Internalisierung wirtsspezifisch zu sein und abhängig vom Wirt kommen bodenspezifische Unterschiede zum Tragen. Jedoch ist unklar, ob die beobachteten Unterschiede in Adhärenz und Internalisierung, im Falle von Kopfsalat, auf unterschiedliche Eigenschaften der Böden zurückzuführen ist und ob Unterschiede in der Boden- und Rhizosphärenmikrobiota diese Prozesse beeinflussen. Dazu wird derzeit die Komposition der Bodenmikrobiota mittels NGS untersucht. Die Ergebnisse stehen noch aus.

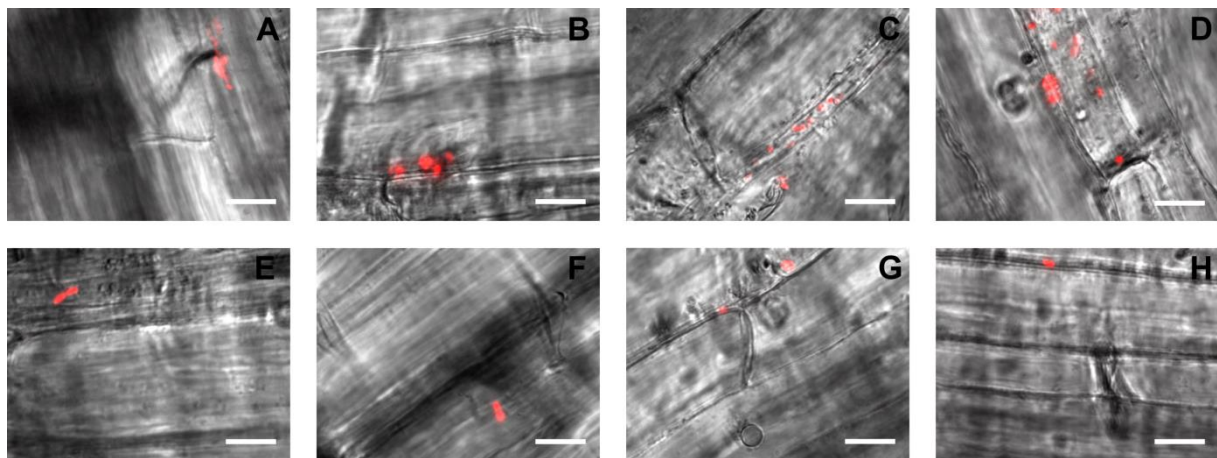


Abbildung 14: Analyse fluoreszierender Bakterien an und in den Wurzeln von Kopf- und Feldsalat nach 4 Tagen Inkubation. Fluoreszenzmikroskopie wurde nach Waschen (A-D) und Desinfektion (E-H) der Wurzeln durchgeführt, um adhärenzte bzw. internalisierte Bakterien zu detektieren. Abgebildet sind mit *E. coli* O104:H4 C227/11φcu kontaminierte Wurzeln von in DS angezogenen Kopfsalat (A und E), in AL gewachsenen Kopfsalat (B und F), in DS angezogenen Feldsalat (C und G) und in AL gewachsenen Feldsalat (D und H). Die Skala gibt 10 µm an. Die Gesamtvergrößerung war 100-fach.

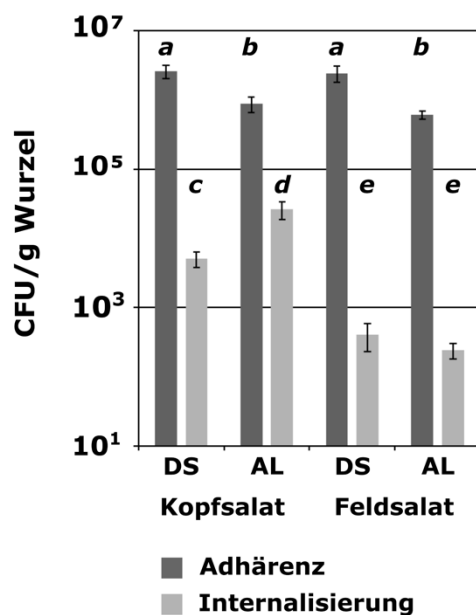


Abbildung 15: Anzahl der an Wurzel adhärenzten und internalisierten Bakterien in CFU/g Wurzel. Kopf- und Feldsalatpflanzen wurden je in DS und AL angezogen und die Pflanztpöfe wurden mit $5,0 \times 10^8$ CFU/ml *E. coli* O104:H4 C227/11φcu inokuliert und für 4 Tage inkubiert. An den nicht kontaminierten Kontrollwurzeln wurden in keinem Fall HPB gefunden (hier nicht gezeigt). Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardfehler von drei unterabhängigen Experimenten an, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede jeweils für Adhärenz bzw. für Internalisierung ($p < 0,05$) an.

3.6 Pflanzliche und bakterielle Antworten auf der Transkriptionsebene

3.6.1 Transkriptionelle Antwort von Kopfsalat auf Infektion mit *S. Typhimurium* 14028s

Um die Immunantwort von Kopfsalat auf eine Kolonisierung mit *S. enterica* 14028s auf Transkriptom-Ebene zu untersuchen, wurden Kopfsalatpflanzen auf MS-Agar bis zum 1-Blatt-Stadium vorgezogen und anschließend in 6-Well Zellkulturplatten mit MS-Medium überführt (je 3 Pflanzen pro Well, Abbildung 16). Nach 24 h wurden die Wells mit *S. enterica* 14028s in MgCl₂-Lösung inokuliert bzw. nur mit MgCl₂-Lösung (Kontrolle) und für weitere 24 h in einer Klimakammer inkubiert (3 Replikate per Behandlung).

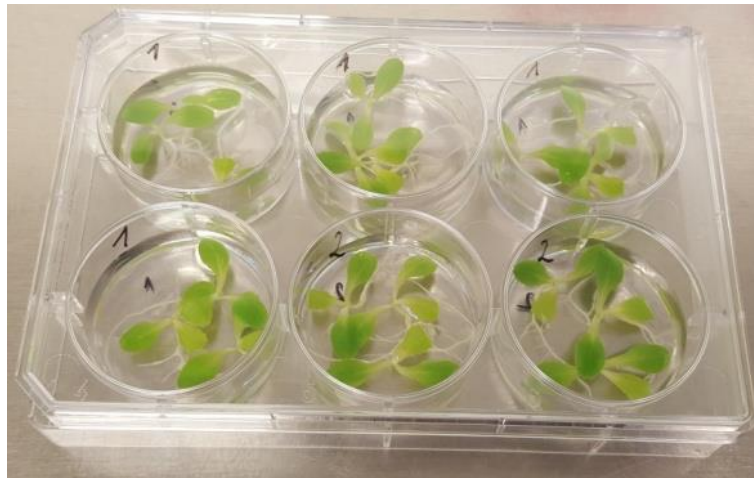


Abbildung 16: Well-Zellkulturplatte mit Kopfsalatpflanzen (3 pro Well) vor der Inkubation mit *S. enterica* 14028s bzw. mit MgCl₂-Lösung (Kontrolle).

Anschließend wurden die Pflanzen beprobt und die RNA, wie oben beschrieben (siehe 2.4.1), extrahiert. Das Transkriptom der Kopfsalatpflanzen wurde mittels Illumina HiSeq sequenziert (3 Replikate pro Behandlung). Die Sequenzen werden in Kollaboration mit Burkhard Flemer vom Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops (IGZ), Großbeeren, Partner des *plantinfect*-Konsortiums, ausgewertet. Eine erste Auswertung ergab, dass in der *S. enterica* 14028s Behandlung im Vergleich zur Kontrolle die Transkription von 1722 Genen signifikant hoch- und von 1103 Genen signifikant runterreguliert waren.

In Tabelle 13 ist eine Auswahl der Gene mit der höchsten Änderung der Genexpression als Antwort auf die Inkubation mit *S. enterica* 14028s dargestellt. Obwohl dies nur ein kleiner Auszug an Genen ist, zeigen diese Ergebnisse bereits sehr interessante potentielle neue Markergene für die zukünftige Analyse der Immunantwort von Salat auf eine Besiedlung mit Salmonellen sowie potentielle beeinflussende Faktoren. Dazu gehören z.B. die in ihrer Expression erhöhten Gene für Metalloendoproteinasen, die kürzlich mit der Immunantwort von *Arabidopsis thaliana* gegen nekrotrophe und biotrophe Pilze in Verbindung gebracht wurden (Zhao, *et al.*, 2017). Des Weiteren ergab eine erste Gene Ontology (GO)-Analyse eine Reihe von signifikant in ihrer

Expression erhöhten Kategorien die der Pflanzenantwort gegen Pathogene und Umweltstress zugeordnet werden konnten.

In zukünftigen Untersuchungen sollen die Ergebnisse dieser Transkriptomanalyse zur Identifizierung alternativer und spezifischer Gene für die Charakterisierung der Pflanzenantwort auf *Salmonella* genutzt werden, um präzise Informationen über die ggf. reduzierte Resistenz / Anfälligkeit der Pflanzen und somit das Risiko einer Kolonisierung mit humanpathogenen Bakterien unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Bodentyp, Düngerart, Temperatur) zu liefern. Diese Informationen sind für eine mögliche Risikobewertung essentiell.

Tabelle 13: Auswahl von 40 Genen mit der höchsten signifikanten Änderung des Genexpressionslevels in Kopfsalat in Reaktion auf *S. enterica* 14028s im Vergleich zur MgCl₂ Kontrolle (log₂-fache Änderung, $p < 0.05$). Zu sehen sind die 30 Gene die in ihrer Expression erhöht bzw. 10 Gene die in ihrer Expression reduziert waren.

Genprodukt	log ₂ -fache Änderung	<i>p</i> -adjust
Metalloendoproteinase 1	9,35	9,92E-63
Metalloendoproteinase 1	8,69	9,95E-43
Lignin-forming anionic peroxidase	8,57	1,18E-10
Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850;	7,74	1,37E-07
Glucan endo-1;3-beta-glucosidase (ECO:0000250 UniProtKB:Q03467)	7,55	1,06E-07
Cytochrome P450 82A4;	6,65	3,13E-06
Putative uncharacterized protein (ECO:0000313 EMBL:CCB60001.1);	6,62	2,72E-05
Uncharacterized protein sll1770;	6,58	6,64E-35
Putative uncharacterized protein (ECO:0000313 EMBL:EEF47206.1);	6,44	1,83E-03
Hypothetical protein	6,43	4,97E-07
7-deoxyloganetin glucosyltransferase	6,09	7,71E-24
Heat shock cognate 70 kDa protein;	6,02	1,51E-175
Dirigent protein 21	6,02	1,10E-09
Dirigent protein 19	6,01	2,03E-48
Uncharacterized protein (ECO:0000313 EMBL:KCW58631.1);	5,97	2,23E-06
Ethylene-responsive transcription factor 1B	5,96	2,80E-21
Pathogenesis-related protein PR-1 type	5,90	5,23E-104
Deacetylindoline O-acetyltransferase	5,78	3,18E-04
Uncharacterized protein (ECO:0000313 EnsemblPlants:Solyc12g014110.1.1);	5,77	5,13E-11
Aspartic proteinase nepenthesin-2	5,69	1,67E-293
NAC transcription factor 56 (ECO:0000303 PubMed:15029955)	5,69	4,05E-04
Putative receptor-like protein kinase At5g39000;	5,68	4,22E-03
Receptor-like protein 12	5,66	2,33E-10
Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850;	5,57	1,83E-09
ABC transporter G family member 36	5,54	3,18E-04
NAC domain-containing protein 90;	5,49	2,79E-03
Hypothetical protein	5,48	4,07E-03
Beta-lactamase domain-containing protein 2;	5,47	6,95E-04
Uncharacterized protein (ECO:0000313 EMBL:KRH57996.1);	5,35	9,27E-12
Cytochrome P450 82C4	5,28	7,82E-13

Uncharacterized protein (ECO:0000313 EMBL:CDP16182.1);	-2,99	3,67E-04
Fe(2+) transport protein 2	-3,01	2,90E-11
Proline rich extensin signature	-3,01	7,94E-07
Proline rich extensin signature	-3,03	8,61E-06
Aquaporin PIP2-1	-3,10	2,59E-18
Phosphate transporter PHO1	-3,16	3,44E-02
Cytochrome P450 78A5	-3,20	8,35E-31
Uncharacterized protein (ECO:0000313 EnsemblPlants:Solyc07g052430.2.1);	-3,25	2,33E-03
Uncharacterized protein (ECO:0000313 EMBL:KDP44572.1);	-3,55	2,02E-06
Cytochrome P450 CYP749A22	-4,86	8,83E-31

3.6.2 Veränderung des Transkriptom von *S. Typhimurium* 14028s in Reaktion auf Salat-Wurzelexudate und Salatmedium

Um transkriptionelle Anpassungen von *Salmonella enterica* Typhimurium 14028s auf die Besiedlung von Salat zu untersuchen, wurde das Transkriptom von *Salmonella* nach 24h Inkubation in Salat-Wurzelexudat-Medium (LE) und Salatmedium (LM) im Vergleich zu in Minimalmedium (MM) inkubierten Salmonellen untersucht. Das LE-Medium sollte dabei Bedingungen in der Rhizosphäre von Kopfsalat simulieren und somit die Anpassungen von *Salmonella* an die initiale Besiedlung und Internalisierung zeigen. Das LM-Medium hingegen sollte als zweiter Schritt eher den Bedingungen ähneln, die die Salmonellen im Inneren des Salats vorfinden. Illumina HiSeq-Sequenzierung ergab eine signifikante Erhöhung der Expression von 129 und 263 Genen für LM und LE, sowie eine signifikant geringere Expression für 43 und 62 Gene. Nicht alle Gene wurden dabei in allen Behandlungen detektiert. Die Expression dieser Gene wurden ebenfalls als signifikant erhöht bzw. erniedrigt behandelt.

Bei Salmonellen aus der LE-Behandlung zeigten Gene die mit der Biosynthese von Aminosäuren assoziiert waren die höchste Anreicherung im Vergleich zu MM. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kwan, *et al.* (2018), die zeigen konnten, dass die Biosynthese von Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung von Tieren aber auch von Pflanzen spielt. Zusätzlich waren Gene angereichert die mit der Virulenz von *Salmonella* in Verbindung gebracht wurden. Ebenfalls hochreguliert war die Expression von Genen, die direkt oder indirekt mit Biofilmbildung in Verbindung gebracht werden, welche vermutlich eine wichtige Rolle bei der Wurzelbesiedlung spielt. Dies zeigt, dass die Wurzelexudate von Kopfsalat bei *S. enterica* Typhimurium 14028s eine transkriptionelle Veränderung auslöst, die der Reaktion auf einen tierischen Wirt ähnelt und bei der Kolonisierung und Internalisierung eine Rolle spielen könnte.

Bei Salmonellen die in LM inkubiert wurden waren insbesondere Gene hochreguliert, die mit einer allgemeinen Stressantwort assoziiert sind. Neben Stress-assoziierten Genen waren Gene hochreguliert, die der Biosynthese von Aminosäuren zugeordnet werden, ähnlich zu Salmonellen die mit Wurzelexudaten behandelt wurden. Ebenfalls hochreguliert war die Genexpression von

Eisen-Transportproteinen und anderen Genen, die vermutlich eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Salmonellen und in der Wirt-Pathogen-Interaktion im tierischen aber vermutlich auch im pflanzlichen Wirt spielen. Ebenfalls, wie bei Salmonellen in LE, waren Gene angereichert, die direkt oder indirekt mit der Biofilmbildung in Verbindung gebracht werden. Unterteilt man die Gene die sowohl in LM als auch in LE angereichert wurden in Gene Ontology (GO)-Kategorien, zeigt sich eine Anreicherung von Stoffwechselprozessen („glyoxylate cycle“, „glycolytic process“) aber auch Stressreaktionen („response to abiotic stimulus“) und anderen Kategorien („protein-containing complex subunit organization“, „translation“ und „transmembrane transport“).

3.6.3 Vergleichende Transkriptomanalyse verschiedener pathogener *E. coli*-Stämme in Anwesenheit von Salatbestandteilen

Um das Kern-Transkriptom der *E. coli* Stämme zu vergleichen, wurde eine differentielle Genexpressionsanalyse durchgeführt, welche auf Basis des annotierten Genoms von *E. coli* Stamm K-12 Substamm MG1655 bestimmt wurde. In *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai wurden 1449 Gene differentiell reguliert, davon waren 714 hoch- und 735 herunterreguliert (Abbildung 17). *E. coli* O157:H7 Stamm 3072/96 zeigte 1210 differentiell regulierte Gene, davon waren 588 herunter- und 622 hochreguliert. In *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11 ϕ cu waren 899 Gene differentiell reguliert (414 Gene hoch- und 485 Gene herunterreguliert). Es zeigte sich, dass in allen drei Stämme Gene der Gen-Sets „Translation“, „Macromolecule Biosynthetic Process“, „Nucleobase-containing Compound Metabolic Process“ und „Gene Expression“ vermehrt hochreguliert waren.

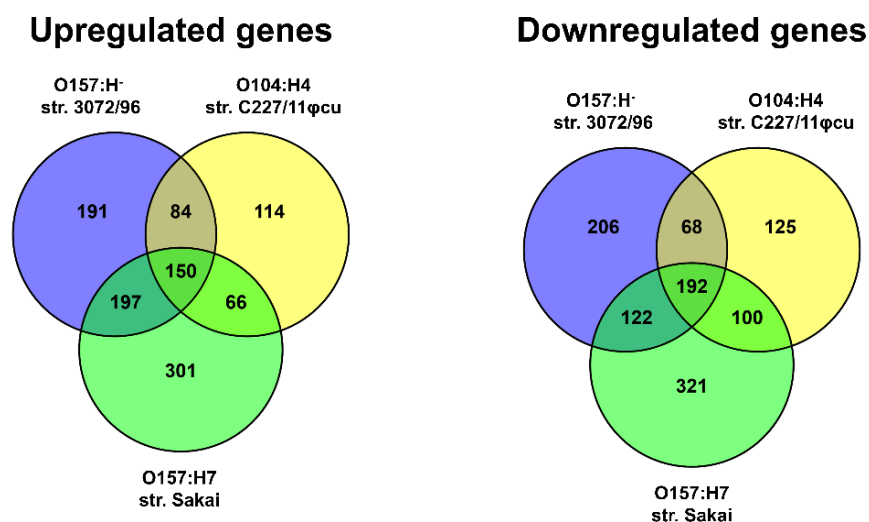


Abbildung 17: Venn-Diagramm der differentiell regulierten Gene in Salatmedium gegenüber M9-Minimalmedium von verschiedenen pathogenen *E. coli* Stämmen.

Differentiell regulierte Gene ($p_{adj} < 0,05$) sind in Kreisen dargestellt, überlappende Gene sind in den Schnittflächen gezeigt. Die deutlichsten stammspezifischen Unterschiede betrafen die Regulation der Flagellen-assoziierten Gene. *E. coli* O157:H7 Stamm 3072/96 zeigte ausschließlich

eine Regulation der Gene *flhCD* (Abbildung 18). *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai wies eine Regulation der Gene, welche der Klasse I und II angehören, auf. Ausschließlich bei *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11φcu war eine deutlich Hochregulation aller drei Klassen, welche ebenfalls Gene für den Ausbau des flagellaren Filaments als auch für das Chemotaxis System kodierende Gene beinhaltet, gegeben. Weitere Unterschiede in der Genexpression waren in der Regulation von Genen für die Etablierung eines Biofilms sowie der Aufnahme von Eisen zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt).

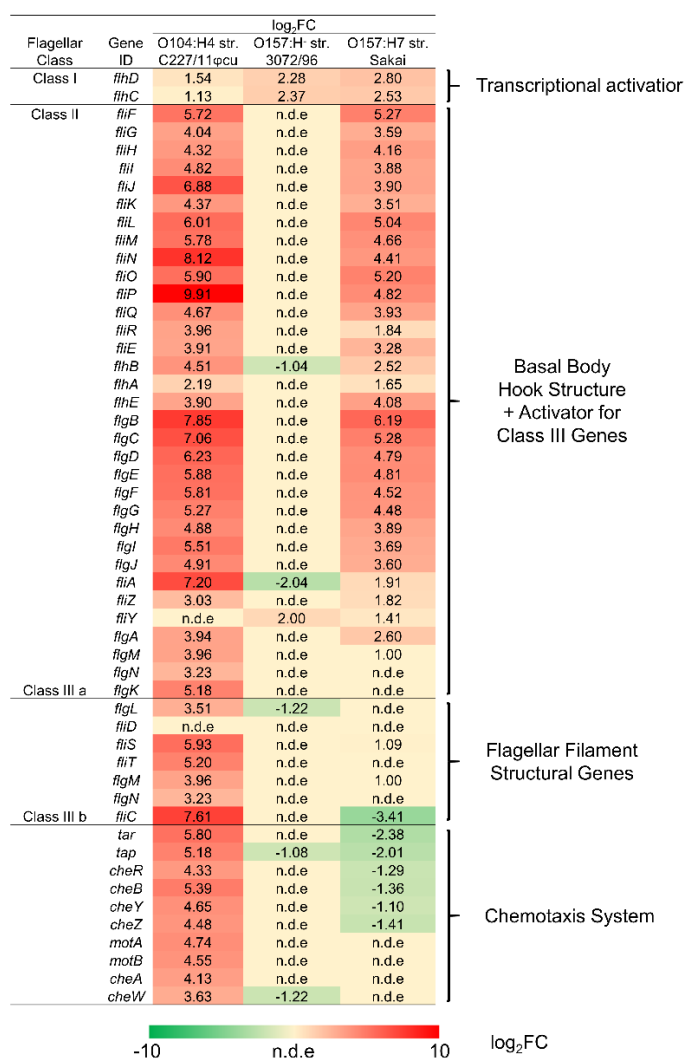


Abbildung 18: Differenziell regulierte, Flagellen-assoziierte Gene. Gene sind gemäß Kalir, *et al.* (2001) in Klassen I bis III eingeteilt. Foldchanges in Rot stellen hochregulierte Gene dar, Folchanges in Grün stellen herunterregulierte Gene dar. Gene mit n.d.e zeigen nicht differenziell regulierte Gene an.

Um stammspezifische Gene ebenfalls in die Untersuchung miteinzubeziehen, wurde eine Genexpressionsanalyse mit dem jeweiligen Referenzstamm durchgeführt. Für *E. coli* O157:H7 Stamm 3072/96 wurde eigens dafür eine *de novo* Genomsequenzierung mit anschließender Annotation durchgeführt. Durch die Genexpressionsanalyse mit einem vorläufig generierten Referenzgenom, konnte gezeigt werden, dass *E. coli* O157:H7 Stamm 3072/96 der einzige Stamm war, welcher Virulenzgene des LEE-Lokus hochreguliert. Dabei wurden die Gene *escCIJ*, welche für das Typ III Sekretionssystem kodieren, sowie Gene, welche für Effektoren des Typ III Sekretionssystems (*espAFHO*) kodieren, hochreguliert.

3.6.4 Veränderung des Transkriptoms von *S. Typhimurium* 14028s in autoklaviertem und natürlichen DS-Boden

In einem weiteren Ansatz analog zu 3.6.2 sollte die Reaktion von *S. Typhimurium* 14028s auf die Bedingungen von autoklaviertem und natürlichem Boden auf transkriptioneller Ebene untersucht werden. Dabei wurde eine eventuelle Anpassung an den Boden sowie eine spezifische Antwort auf die gegebene mikrobielle Gemeinschaft genauer betrachtet. Die Illumina HiSeq-Sequenzierung ergab eine signifikante Erhöhung der Expression von 419 Genen in Salmonellen aus Bodenproben verglichen mit Salmonellen aus Minimalmedium von denen 84 ausschließlich in natürlichem Boden und 73 ausschließlich in autoklaviertem Boden erhöht waren ($p < 0,05$). 137 Gene waren in ihrem Expressionsniveau signifikant niedriger in Reaktion auf die Bedingungen im Boden im Vergleich zu denen in Minimalmedium, wobei von diesen 35 ausschließlich in natürlichem Boden und 8 ausschließlich in autoklaviertem Boden runterreguliert waren. Unter den runterregulierten Genen konnte keine signifikant angereicherte funktionelle Gruppe identifiziert werden. Unter den hoch regulierten Genen war in beiden Boden-Varianten eine Anreicherung von Translations-Prozessen und der Peptid-Biosynthese zu beobachten. In Reaktion von *S. Typhimurium* 14028s auf die Bedingungen im Boden waren besonders viele Gene hochreguliert, die der Aminosäure-Biosynthese zugeordnet werden konnten. Hierbei gibt es deutliche Unterschiede bei Vergleich der verschiedenen Böden. Während Prozesse der Tryptophan- und Glutamin-Biosynthese in natürlichem Boden hoch reguliert waren, wurden in natürlichem Boden Anreicherungen von Genen, verbunden mit der Synthese von verzweigtkettigen Aminosäuren, festgestellt. In beiden Böden wurde eine Veränderung des Glyoxylatezyklus beobachtet. Wang, *et al.* (2010) haben gezeigt, dass die Regulierung von Aminosäuren und die Verzweigung zwischen Glyoxylat und Zitratzyklus im Zusammenhang stehen. Zusammen mit unseren Ergebnissen lässt sich annehmen, dass diese Regulierungen in Folge einer Anpassung an die im Boden vorherrschenden Bedingungen erfolgen.

3.7 Etablierung des Protokolls zur Bestimmung von Adhärenzraten von Bakterien an Salatoberflächen

Zur Untersuchung des Vorgangs der Adhärenz, des ersten Schritts der Infektion von verschiedenen Salaten durch pathogene *E. coli* Stämme und *Salmonella*, wurde ein Versuchsaufbau konstruiert, um die Adhärenz experimentell testen zu können. Zunächst wurden kontrollierte Anzuchtbedingungen für Feldsalat und im weiteren Verlauf auch für Kopfsalat entwickelt. Die jeweiligen Samen werden dabei mittels Ethanol und Bleiche desinfiziert und auf sterilen synthetischen Medien (Murashige-Skoog-Agar) innerhalb eines sterilen Plastikbehälters mit Luftfilter zur Keimung gebracht. Als optimale Anzuchtdauer stellte sich für Feldsalat ein Zeitraum von 8 Wochen heraus, in dem die Pflanzen groß genug für Inokulationsversuche sind, ohne bereits das Stadium des eigentlichen Erntezeitpunkt zu erreichen (Abbildung 19). Für Kopfsalat konnte eine optimale Anzuchtdauer von 4-5 Wochen ermittelt werden. Der Fokus unserer Arbeiten war dabei die Adhäsion von Pathogenen an die Blätter des Salats, als den für Konsumenten relevanten Teil der Pflanze.

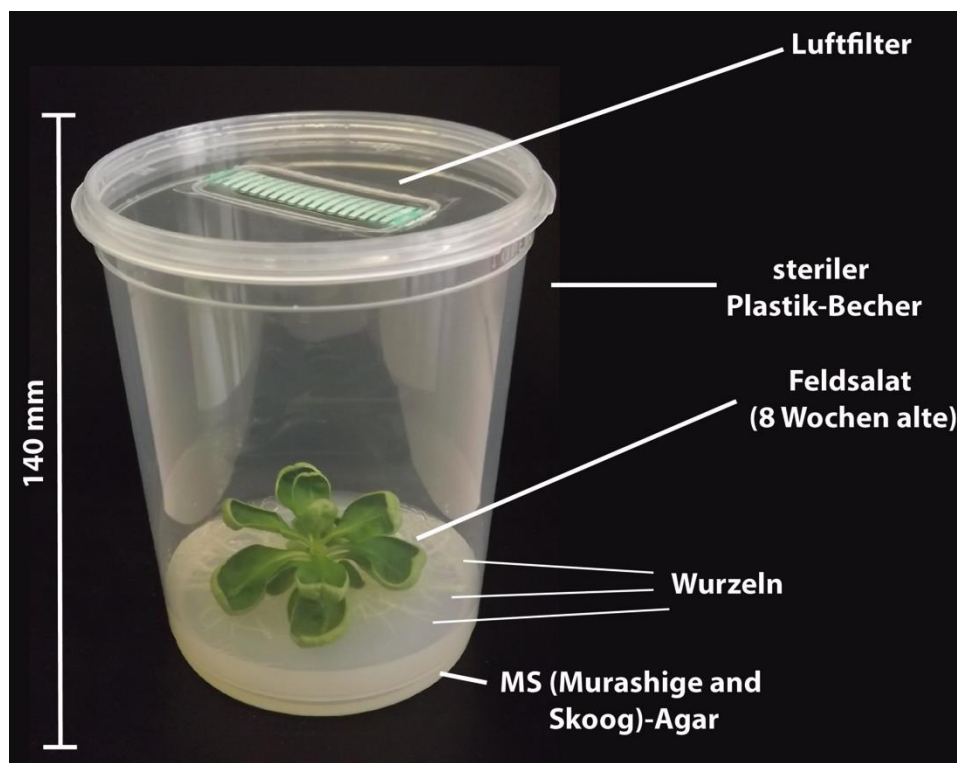


Abbildung 19: Anzucht von Feldsalat auf Murashige-Skoog (MS)-Agar unter sterilen Bedingungen.

Für die Inokulationsversuche wurde das bakterielle Inokulum in definiertem Volumen auf mittels Biopsiestanzen ausgestanzten Bereichen der Salatblätter getropft. Nach verschiedenen Inkubationszeiten und Waschschritten wurde die Zahl der adhärennten Bakterien durch Homogenisieren der Pflanze und Ausplattieren von Verdünnungen bestimmt. Aufgrund des geringen Probenvolumens erwies sich die Homogenisierung mittels einer Mikropistille und eines

Pellet Pestle Motors als optimale Methode. Um das Homogenat in Lösung zu halten und einen Verlust von Homogenat in der Pipettenspitze zu vermeiden, wurden verschiedene Detergenzien und DNase Zusätze getestet (Abbildung 20A). Hierbei erwies sich der Zusatz von 1% Desoxycholat in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) als optimal. Des Weiteren untersuchten wir den Einfluss der Inkubationszeiten auf die Adhärenz der Bakterien. Es stellte sich heraus, dass bereits 1 h bei Raumtemperatur für eine detektierbare Menge an adhärenierten Bakterien ausreicht. Nach einer Inkubationsdauer von 4 h wurde zudem eine Vermehrung der Bakterien auf der Blattoberfläche beobachtet (Abbildung 20B). Als letzten Schritt zur Optimierung des Protokolls wurden verschiedene Waschschriffe getestet (Abbildung 20C). Es wurde zwischen statischen Waschschriffen in einer 6 Kavitäten Platte unterschieden und dem Waschen mittels Mischen (Vortex-Mischer) in einem geschlossenen Reaktionsgefäß. Bereits nach dem 3. Waschschriff mittels Mischen konnte keine weitere Abnahme von Bakterien im Waschwasser detektiert werden.

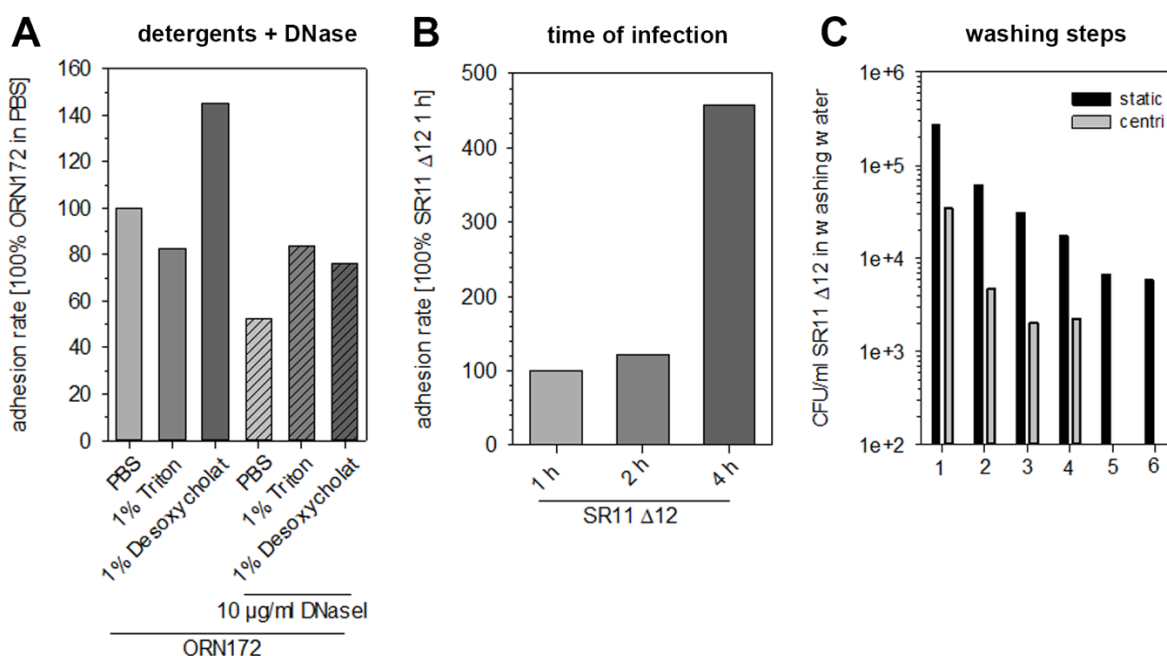


Abbildung 20: Verwendung von Detergenzien und DNase (A), sowie Variation der Inkubationsdauer und Anzahl von Waschschriffen zur Auswahl von optimalen Bedingungen für die Adhärenzversuche an Salat.

Die Durchführung des optimierten Protokolls zur Untersuchung der Adhärenzraten von Bakterien an Salat ist in Abbildung 21 schematisch dargestellt und im Methodenteil 2.2.3 im Detail erklärt.

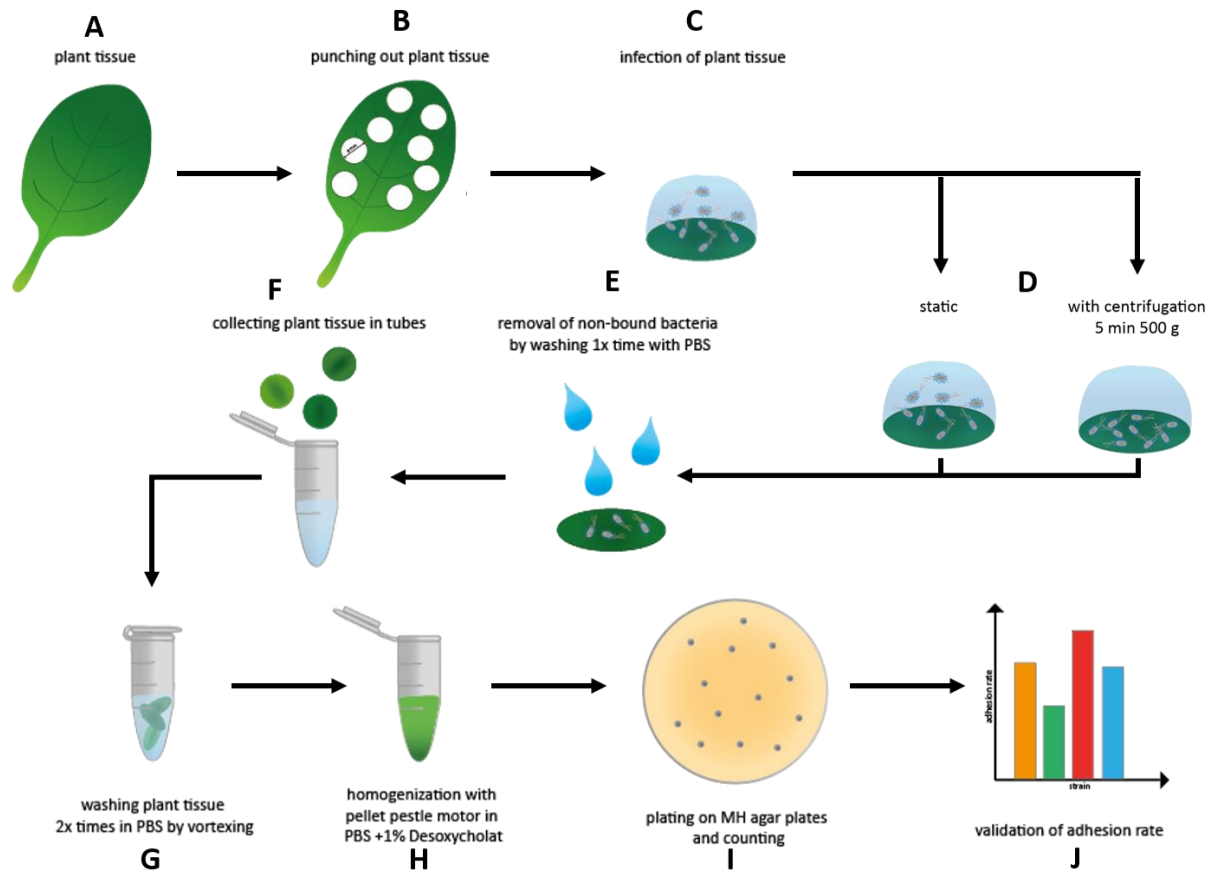


Abbildung 21: Schematische Übersicht des Adhärenz Experiments an Salat. (A) Steriles Pflanzenmaterial. (B) Ausstechen mehrerer Blattproben mittels einer Biopsiestanze mit einem Durchmesser von 8 mm, welche direkt für die Inokulation verwendet werden und mit Hilfe einer kleinen Röhre (*Inlay*) fixiert werden. (C) Jede Blattprobe (28,3 mm²) wird mit 281.000 Bakterien inokuliert. (D) Inkubation für 1 h bei RT unter statischen Bedingungen oder nach 5 min Zentrifugation bei 500 g. (E) Abwaschen nicht gebundener Bakterien mittels PBS. (F) Transfer der Blattproben in Reaktionsgefäße. (G) Zwei weitere Waschschrte mittels PBS und kurzes mischen. (H) Homogenisierung der Blattproben mittels eines *pellet pestle motor* in PBS + 1% Desoxycholat. (I) Ausplattieren der Proben und des Inokulums auf MH Agar Platten mit anschließender Inkubation über Nacht bei 37 °C. (J) Auszählen der Kolonien und zur Bestimmung der CFU/ml bzw. der Adhärenz-Rate.

3.8 Adhäsion der HPB an Kulturpflanzen

3.8.1 Analyse von adhäsiven Strukturen, der Motilität und Lipopolysaccharidschicht (LPS) von *S. Typhimurium* involviert in die Adhärenz an Feldsalat

Zur Untersuchung der genetischen Faktoren, die es *Salmonella* ermöglicht an Pflanzen zu adhären, wurden verschiedene adhäsive Strukturen (fimbrielle und nicht-fimbrielle Adhäsine), Proteine der äußeren Membran (Outer membrane proteins, OMPs), die Lipopolysaccharidschicht (LPS) und verschiedene in der Motilität involvierte Proteine untersucht. Da in den meisten Fällen eine Expression von Adhäsinen und Proteinen der äußeren Membran mit putativen adhäsiven Eigenschaften unter Laborbedingungen nicht vorliegt, mussten zunächst Konstrukte für eine induzierbare Expression erstellt werden. Hierfür wurde das Tet-On System gewählt (für weitere Informationen siehe Hansmeier, *et al.* (2017)). Im Gegenteil zur Expression von adhäsiven Strukturen wurden zeitgleich Deletionsmutanten der jeweiligen adhäsiven Strukturen angefertigt und hinsichtlich ihrer Adhärenzraten an Feldsalat analysiert.

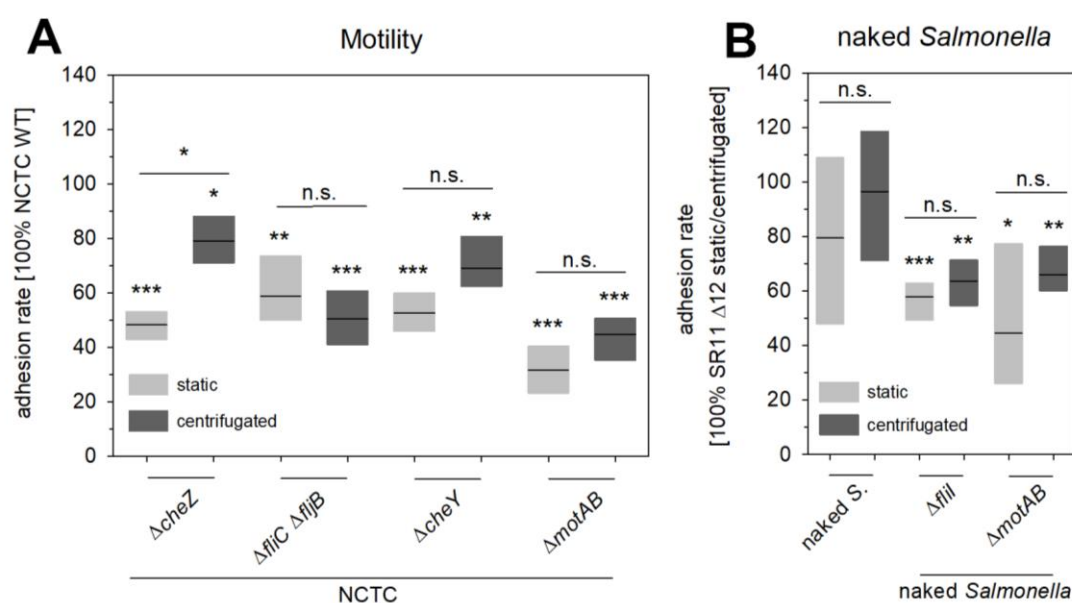


Abbildung 22: Adhärenzverhalten von *Salmonella* an Feldsalat mit Motilitätsdefiziten (A) und Deletionen aller adhäsiven Strukturen (B). Adhärenzversuche wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben. Gezeigt ist die Verteilung von mindestens drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students t-Test. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: n.s., nicht signifikant; *, $p > 0,05$; **, $p > 0,01$; ***, $p > 0,001$.

Es zeigte sich, dass die Deletion von verschiedenen Genen, die in der Motilität involviert sind, zu einer verringerten Adhärenz an Feldsalat führt (Abbildung 22A). Dadurch, dass nach Zentrifugation das Wildtyp-Niveau nicht wieder erreicht werden kann, zeigt, dass nicht nur das Erreichen der Blattoberfläche der entscheidende Faktor ist, sondern auch die Motilität an sich an der Adhärenz beteiligt ist.

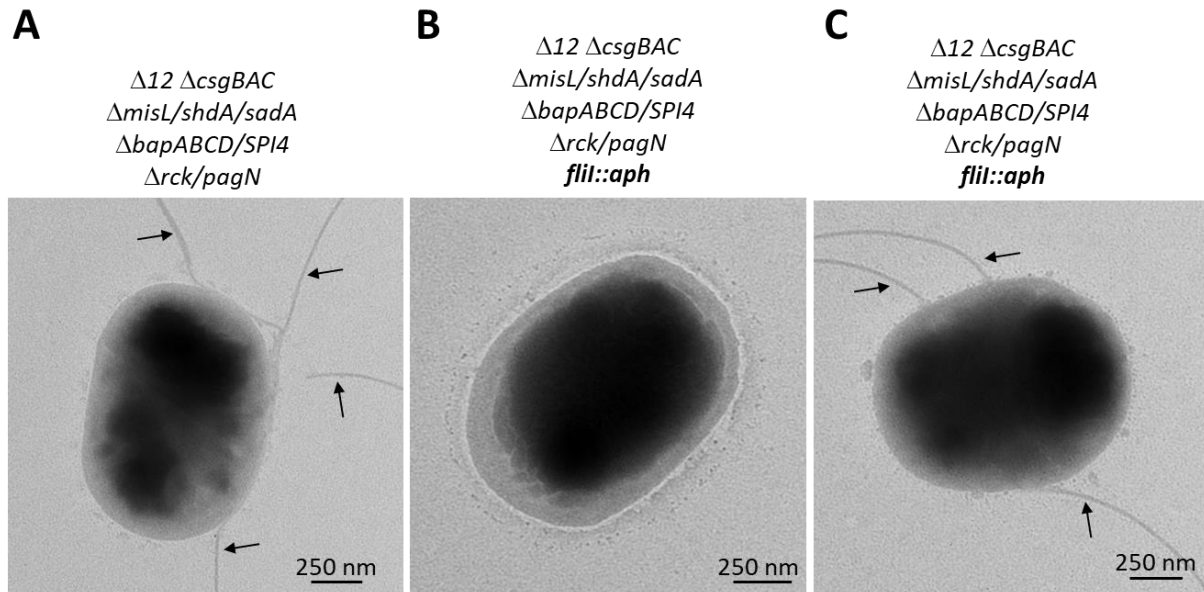


Abbildung 23: Visualisierung der *naked Salmonella* Stämme mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mittels eines TEM erstellt (ZEISS LEO 902, 80 kV).

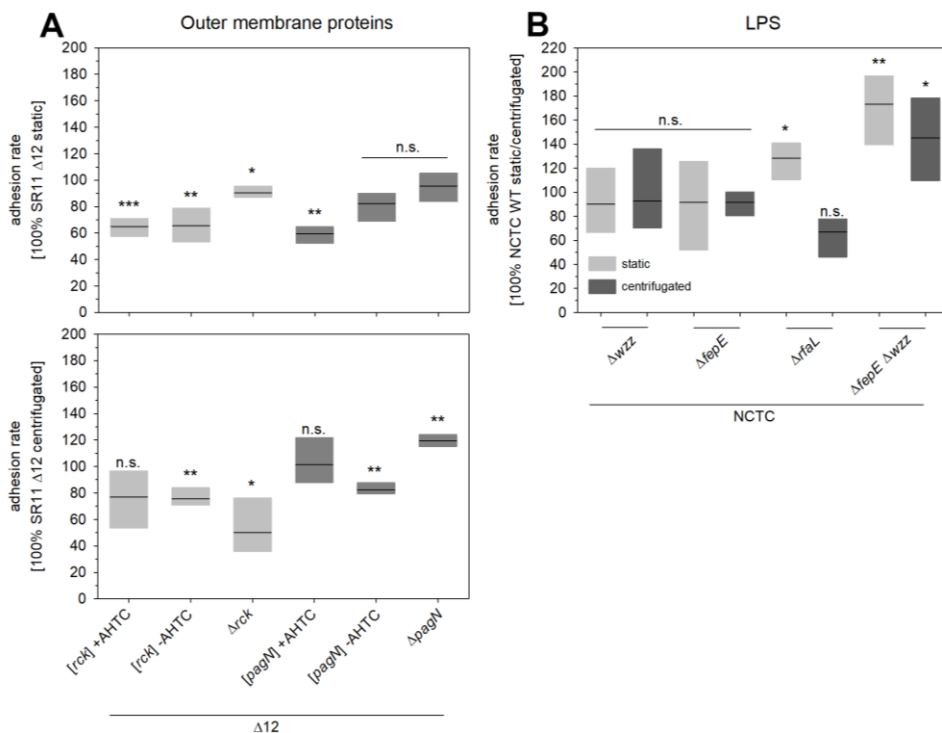


Abbildung 24: Adhärenzverhalten von *Salmonella* an Feldsalat mit Expression von Outer membrane proteins (OMPs) und deren Deletionen (A) und Deletionen in LPS-assoziierten Genen (B). Adhärenzversuche wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben. Gezeigt ist die Verteilung von mindestens drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students t-Test. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: n.s., nicht signifikant; *, $P > 0,05$; **, $P > 0,01$; ***, $P > 0,001$.

Des Weiteren wurde im Verlauf des Projektes eine Mutante erstellt, die Deletionen aller putativen adhäsiven Strukturen trägt (Abbildung 23). Diese Mutante wird unter dem Namen „*naked Salmonella*“ geführt. In Adhärenzversuchen an Feldsalat zeigte sich, dass die Deletionen das Adhärenzverhalten nicht beeinflussten (Abbildung 22B). Wurde eine weitere Deletion eingebracht, die zu einem Defekt in der Motilität führt, war der gleiche Phänotyp wie zuvor für die reinen Motilitätsmutanten zu beobachten.

Ein weiterer entscheidender Faktor in der Adhärenz an Feldsalat stellt das LPS von *Salmonella* dar (Abbildung 24). Es zeigte sich, dass eine Verkürzung des LPS, hervorgerufen durch verschiedene Deletionen, zu einer erhöhten Adhärenzrate führte. Dieser Effekt tritt auf, sobald das LPS kein O-Antigen ($\Delta rfaL$) oder lediglich ein stark verkürztes mono-modales O-Antigen ($\Delta wzz \Delta fepE$) trägt. Im Fall des deletierten O-Antigens kann der Effekt jedoch durch Zentrifugation wieder revidiert werden.

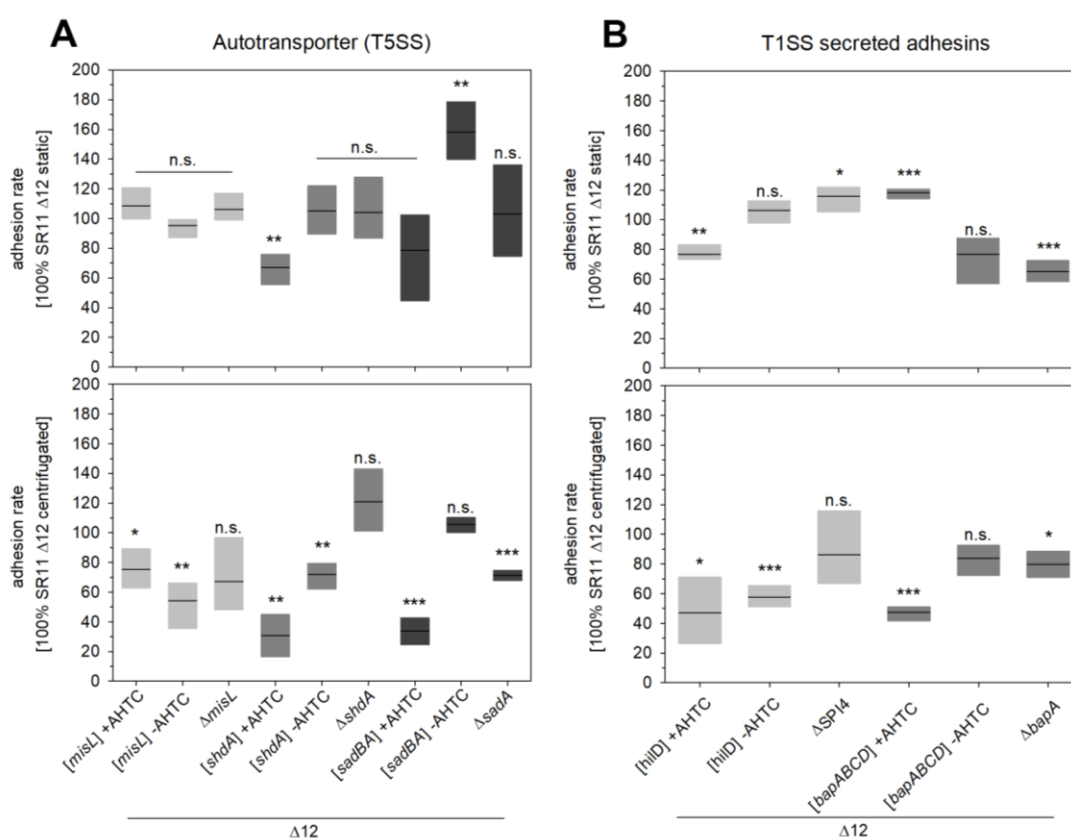


Abbildung 25: Adhärenzverhalten von *Salmonella* an Feldsalat mit Expression von Autotransportern (T5SS) (A) und Typ-1-Sekretionssystem (T1SS) sekretierten Adhäsinen (B) und deren Deletionen. Adhärenzversuche wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben. Gezeigt ist die Verteilung von mindestens drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students t-Test. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: n.s., nicht signifikant; *, $p > 0,05$; **, $p > 0,01$; ***, $p > 0,001$.

Die Expression der drei verschiedenen in *S. Typhimurium* enthaltenen Autotransportern (T5SS) MisL, ShdA und SadA führten zu unterschiedlichen Ergebnissen (Abbildung 25A). Der monomere Autotransporter MisL zeigt sowohl bei induzierter Expression als auch bei Deletion des

entsprechenden Gens keine Auswirkung auf die Adhärenz an Feldsalat bei statischer Infektion. Nach Zentrifugation der entsprechenden Proben zeigt sich für die Expression von MisL eine signifikant verringerte Adhärenzrate. Der andere monomere Autotransporter aus *S. Typhimurium*, ShdA, zeigte bereits bei statischen Bedingungen bei Expression von ShdA eine signifikant verringerte Adhärenzrate. Diese verringerte sich weiter wenn die Proben zentrifugiert wurden. Die Deletion von *shdA* hatte keine Auswirkung. Die Expression von SadA, der einzige trimere Autotransporter, führte nach Zentrifugation zu einer signifikant verringerten Adhärenz an Feldsalat, auch im Deletionsstamm. Die Expression von Autotransportern scheint somit einen negativen Effekt auf die Adhärenz von *S. Typhimurium* an Feldsalat zu haben. Es konnte dabei bisher nicht geklärt werden, ob dies durch mechanische bzw. sterische Effekte ausgelöst wird oder sich die Oberflächenladung des Bakteriums aufgrund der hohen Anzahl an Autotransportern verändert und sich auf die Adhärenz auswirkt. Des Weiteren müssen mögliche Co-Regulation der adhäsiven Strukturen, Motilität und womöglich der Zusammensetzung der äußeren Membran beachtet werden. Um einen Effekt des Typ-1-Sekretionssystem (T1SS), sekretierten großen nicht-fimbriellen Adhäsins SiiE auf die Adhärenz an Feldsalat zu untersuchen, wurde ein Konstrukt verwendet, welches eine Überexpression von HilD hervorruft. HilD reguliert die *Salmonella* Pathogenitätsinsel 4 (SPI4), welche für *siiE* und das dazugehörige T1SS codiert. Die dadurch hervorgerufene Überexpression von SiiE durch Zugabe von AHT im Vergleich zu der nativen Expression von SiiE in Subkulturen (3,5 h), führt zu einer signifikant verringerten Adhärenz an Feldsalat in den statischen Proben, als auch in den zentrifugierten Proben (Abbildung 25B). In der uninduzierten Kontrolle war zudem auch bei den zentrifugierten Proben eine verringerte Adhärenz zu beobachten, welche vermutlich auf die native geringere Expression von SiiE zurückzuführen ist. Deletionsmutanten, denen die gesamte SPI4 fehlt, zeigten im Gegenzug eine signifikant erhöhte Adhärenz in den statischen Proben. Vergleichend zu den Adhärenzexperimenten an Feldsalat können Veröffentlichungen hinzugezogen werden, die zeigen, dass SiiE der entscheidende Faktor zur Adhärenz und der darauffolgenden Invasion in polarisierten Epithelzellen (z.B. MDCK-Zellen) ist (Gerlach, *et al.*, 2007). Hierdurch wird die differentielle Nutzung der adhäsiven Strukturen deutlich, wie sie auch für die weiteren adhäsiven Strukturen vermutet wird. Das andere T1SS sekretierte nicht-fimbrielle Adhäsins BapA, welches in der Biofilmbildung involviert ist (Latasa, *et al.*, 2005), führt bei Expression zu einer signifikant leicht erhöhten Adhärenz in statischen Proben, wohingegen die zentrifugierten Proben eine signifikant verringerte Adhärenz aufweisen. Die Deletion von *bapA* führte in beiden Fällen zu einer verringerten Adhärenz. Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass eine detailliertere Untersuchung der Biofilmbildung, welche von vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist, sinnvoll wäre. Weitere wichtige Faktoren spielen hierbei die Umweltbedingungen unter denen Salat angebaut wird. UV-Stress, Nährstoffmangel auf der Oberfläche des Blattes, verringerte Temperaturen im Vergleich zum tierischen Wirt, etc. könnten zu einer Biofilmbildung führen.

Von den 12 verschiedenen fimbriellen Operonen mit der Assemblierung mittels des Chaperon-Usher Pathways für die *S. Typhimurium* kodiert, wurden bisher Adhärenzversuche für die Bcf-, Fim-, Saf-, Pef-, Std-, Stf-, Stb- und Stj-Fimbrien an Feldsalat durchgeführt (Abbildung 26). Es zeigte sich, dass die Expression von Typ-1-Fimbrien (*fim* Operon), Pef- und Stb-Fimbrien zu einer verringerten Adhärenz an Feldsalat führen. Bcf- und Stj-Fimbrien zeigen lediglich nach Zentrifugation eine verringerte Bindung an Feldsalat. Die Expression von Stf-Fimbrien führt in den statischen Proben zu einer erhöhten Adhärenz. Eine erhöhte Adhärenz konnte auch für Saf-Fimbrien beobachtet werden, welche jedoch nicht signifikant ist. Die Expression von Std-Fimbrien führte zu keinem veränderten Adhärenzverhalten.

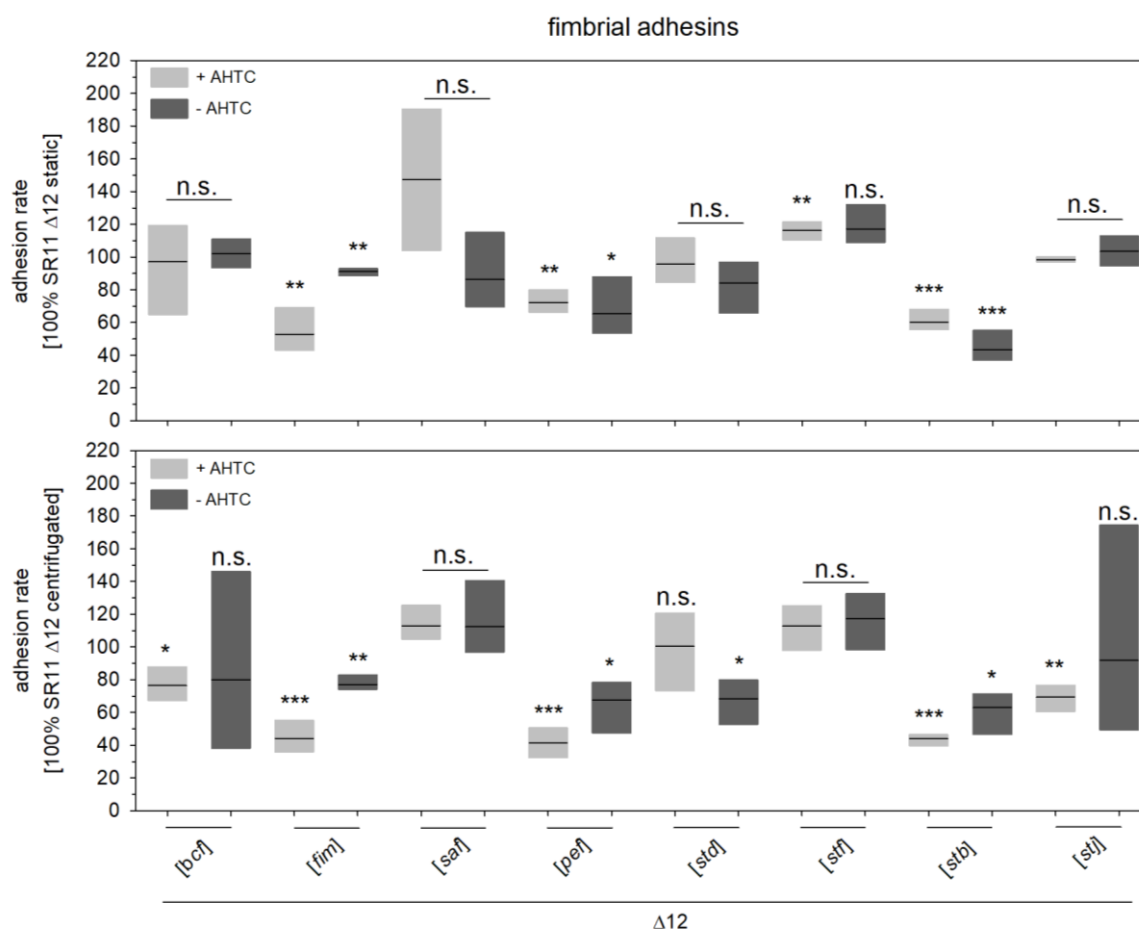


Abbildung 26: Adhärenzverhalten von *Salmonella* an Feldsalat mit Expression fimbrieller Adhäsine. Adhärenzversuche wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben. Gezeigt ist die Verteilung von mindestens drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students t-Test. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: n.s., nicht signifikant; *, $p > 0,05$; **, $p > 0,01$; ***, $p > 0,001$.

Salmonella Typhimurium kodiert für ein fimbrielles Adhäsins (Curli, *csg*-Operone), welches mittels des Nucleation-Precipitation Pathway assembliert wird. Die Expression von Curli führt in den statischen und zentrifugierten Proben zu einer signifikant verringerten Adhärenz an Feldsalat (Abbildung 27). Die Deletion der Hauptuntereinheiten *csgBAC* führte zu keiner veränderten Adhärenz (Abbildung 27).

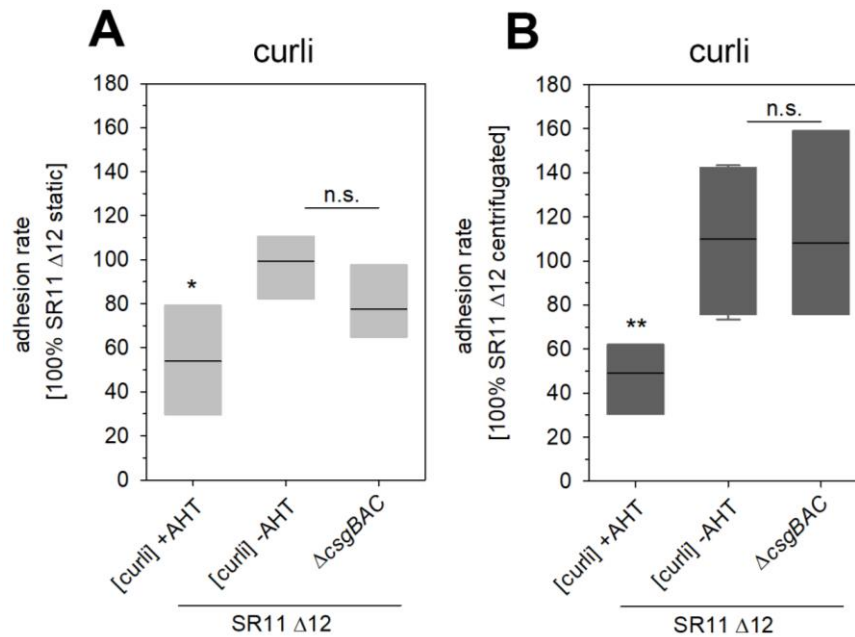


Abbildung 27: Adhärenzverhalten von *Salmonella* an Feldsalat mit Expression von Curli-Fimbrien. Adhärenzversuche wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben. Gezeigt ist die Verteilung von mindestens drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students t-Test. Die Signifikanten sind wie folgt dargestellt: n.s., nicht signifikant; *, $p > 0,05$; **, $p > 0,01$.

3.8.2 Analyse von adhäsiven Strukturen von *S. Typhimurium* involviert in die Adhärenz an Kopfsalat

Als weitere Modellpflanze wurde Kopfsalat gewählt, welcher zu den häufigsten konsumierten Salatsorten zählt und zudem liegen nicht publizierte Ergebnisse aus dem Verbund vor, die zeigten, dass Kopfsalate, neben Tomatenpflanzen, am stärksten durch pathogene Bakterien kolonisiert werden können. Wie auch der Feldsalat, kann der Kopfsalat unter sterilen Bedingungen auf synthetischen Medien angezogen werden. Bisher liegen Ergebnisse zur Involvierung der Autotransporter und T1SS sekretierten nicht-fimbriellen Adhäsinen aus *Salmonella* Typhimurium in der Adhärenz an Kopfsalat vor (Abbildung 28).

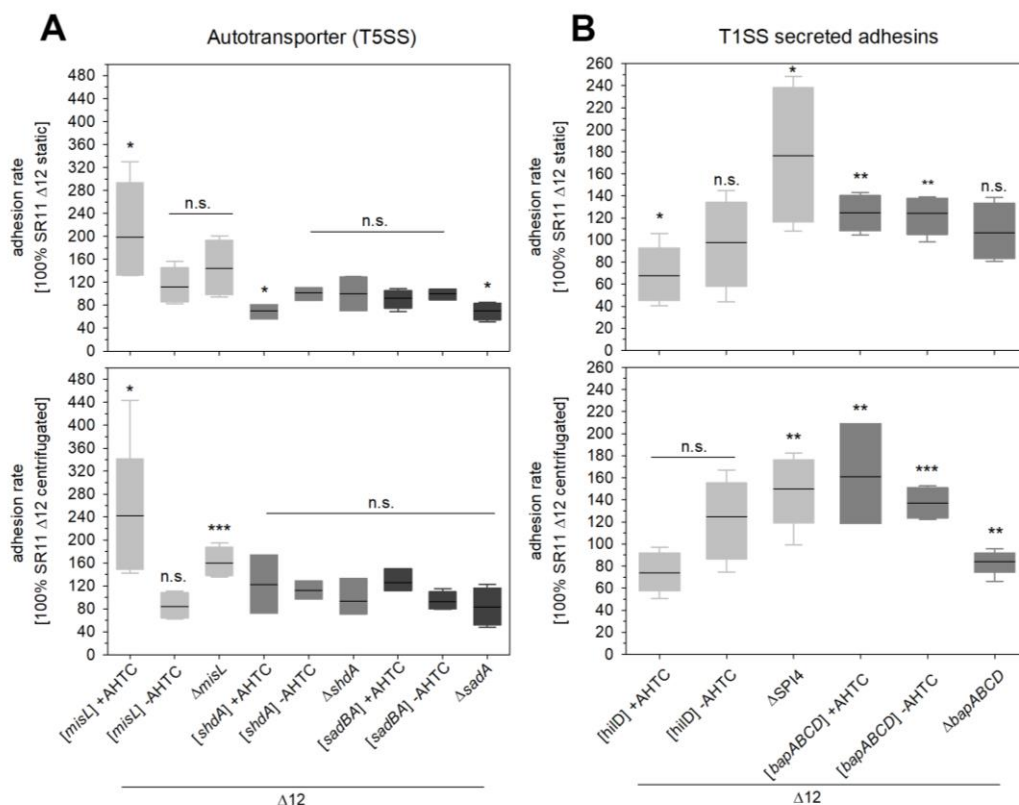


Abbildung 28: Adhärenzverhalten von *Salmonella* an Kopfsalat mit Expression von Autotransportern (A) und Typ-1-Sekretionssystem sekretierten Adhäsine (B) und deren Deletionen. Adhärenzversuche wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben. Gezeigt ist die Verteilung von mindestens drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students t-Test. Die Signifikanten sind wie folgt dargestellt: n.s., nicht signifikant; *, $p > 0,05$; **, $p > 0,01$; ***, $p > 0,001$.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Adhärenzexperimenten an Feldsalat zeigte sich an Kopfsalat nach Expression des monomeren Autotransporters MisL eine signifikant erhöhte Adhärenzrate in den statischen und zentrifugierten Proben (Abbildung 28A). Für die Deletionsmutante *misL* war nach Zentrifugation eine verringerte Adhärenzrate gegeben. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auf der Oberfläche von Kopfsalatblättern ein spezifischer Bindepartner für MisL vorhanden ist, welcher nicht konserviert auf allen Pflanzenzellen vorkommt. Die Expression des anderen monomeren Autotransporters ShdA führt nur in den statischen Proben zu einer leicht verringerten Adhärenz an Kopfsalat, welche auch in den Experimenten an Feldsalat beobachtet werden konnte. Die Expression von SadA führte zu keiner veränderten Adhärenz an Kopfsalat. Bei der Deletionsmutante von *sadA* war in den statischen Proben eine verringerte Adhärenz zu verzeichnen, welche in den zentrifugierten Proben nicht mehr beobachtet werden konnte. Wie bereits in den Experimenten mit Feldsalat gezeigt werden konnte, führt die Überexpression von SiiE zu einer verringerten Adhärenz auch an Kopfsalat. Im Gegensatz dazu führt die SPI4 Deletionsmutante, wie bei Feldsalat, zu einer erhöhten Adhärenz an Kopfsalat (Abbildung 28B). Analysen zum Einfluss weiterer adhäsiver Strukturen, der Motilität und des LPS von *Salmonella* auf die Adhärenz an Kopfsalat sollen folgen.

3.8.3 Analyse von adhäsiven Strukturen von *S. Typhimurium* involviert in die Adhärenz an Spinat

Als dritte Modellpflanze diente Spinat, welcher als roh verzehrtes Frischeprodukt immer mehr an Bedeutung gewinnt. Der Versuch Spinat auf synthetischen Medien unter sterilen Bedingungen selber anzuziehen, scheiterte. Daher wurde auf kommerziell erhältlichen Spinat aus lokalen Geschäften zurückgegriffen. Dieser wurde hinsichtlich seiner Hintergrundflora untersucht, die je nach Jahreszeit und Wetterverhältnissen variierte. Durch vorhergehende Waschschriffe mit sterilem Reinstwasser konnte ein Großteil der Hintergrundflora entfernt werden, sodass Experimente zur Untersuchung der Adhärenzraten trotzdem möglich waren. Die im Labor verwendeten Stämme waren gut von der Hintergrundflora unterscheidbar, sodass auf Selektivagar verzichtet werden konnte. Bisherige Adhärenzexperimente an Spinat wurden mit Fim-, Stf-, Stb-, Pef- und Bcf-Fimbrien durchgeführt. In Abbildung 29 sind vergleichend die Ergebnisse der Adhärenzexperimente an Feldsalat (A, C) und an Spinat gezeigt (B, D). Die Expression von Typ-1-Fimbrien (*fim*-Operon) zeigt, im Gegensatz zu Feldsalat, eine erhöhte Adhärenz an Spinat. Die an Feldsalat erhöhte Adhärenz von Stf-Fimbrien konnte im Fall von Spinat nicht beobachtet werden, hier zeigte sich kein Unterschied in der Adhärenz im Vergleich zum Hintergrundstamm SR11 Δ 12.

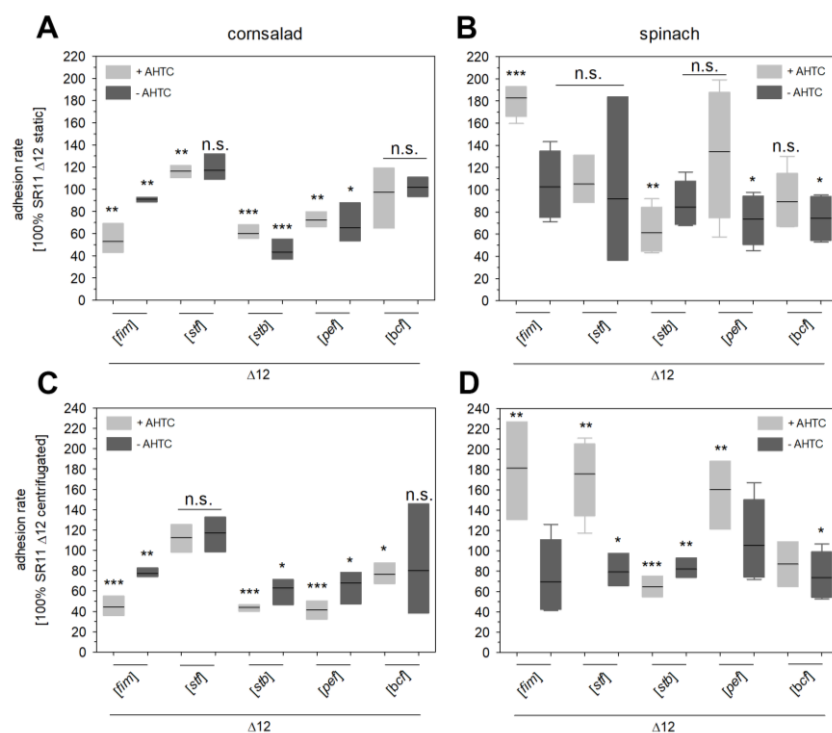


Abbildung 29: Adhärenzverhalten von *Salmonella* an Feldsalat (A+C) und Spinat (B+D) mit Expression von verschiedenen Fimbrien. Adhärenzversuche wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben. Gezeigt ist die Verteilung von mindestens drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Studentischen t-Test. Die Signifikanten sind wie folgt dargestellt: n.s., nicht signifikant; *, $p > 0,05$; **, $p > 0,01$; ***, $p > 0,001$. Abbildungen B+D beruhen auf Daten von Bachelorstudentin Corinna Liersch.

Die Expression von Stb-Fimbrien führt auch in den Experimenten mit Spinat zu einer verringerten Adhärenz. Pef-Fimbrien haben keinen Einfluss auf die Adhärenz an Spinat, sowie es auch für Bcf-Fimbrien beobachtet werden konnte. Im Gesamten ist zu beobachten, dass einige fimbrielle Adhäsine zu ähnlichen Adhärenzraten an unterschiedlichen Salatsorten führen. Allerdings konnte auch beobachtet werden, dass Fimbrien spezielle Bindeeigenschaften aufweisen, die Auswirkungen auf die Adhärenzrate an verschiedenen Pflanzenarten haben. Dies stellt das Problem deutlich heraus, dass erhobene Ergebnisse nur begrenzt auf alle Salat-, bzw. auch Gemüsesorten übertragen werden können.

3.8.4 Einfluss von Stomata auf die Adhärenz von *S. Typhimurium* an Feldsalat

Um einen besseren Einblick in den verwendeten Versuchsorganismus Feldsalat, sowie Kopfsalat und Spinat zu erhalten, wurde dieser hinsichtlich der Spaltöffnungen (Stomata) untersucht. Diese stehen in der Diskussion eine entscheidende Rolle in der Infektion und der Persistenz von Bakterien auf Pflanzen zu spielen (Kroupitski, *et al.*, 2009). Mittels mikroskopischer Analysen der Blätter der verschiedenen Salatsorten im Nagellack-Abdruckverfahren konnte die Verteilung von Spaltöffnungen bestimmt werden. Es zeigte sich für alle getesteten Salatsorten, dass sowohl auf der Blattoberseite (adaxial), als auch auf der Blattunterseite (abaxial), Stomata vorhanden sind (Abbildung 30). Für Feldsalat und Spinat wurde beobachtet, dass auf der abaxialen Seite jeweils mehr Stomata vorhanden sind als auf der adaxialen Seite. Dabei steigt im Fall des Feldsalats die Stomataanzahl mit zunehmenden Alter der Blätter innerhalb der Pflanze an (Abbildung 30A). Für den Kopfsalat konnte kein Unterschied in der Anzahl an Stomata auf der adaxialen und abaxialen Seite beobachtet werden (Abbildung 30B).

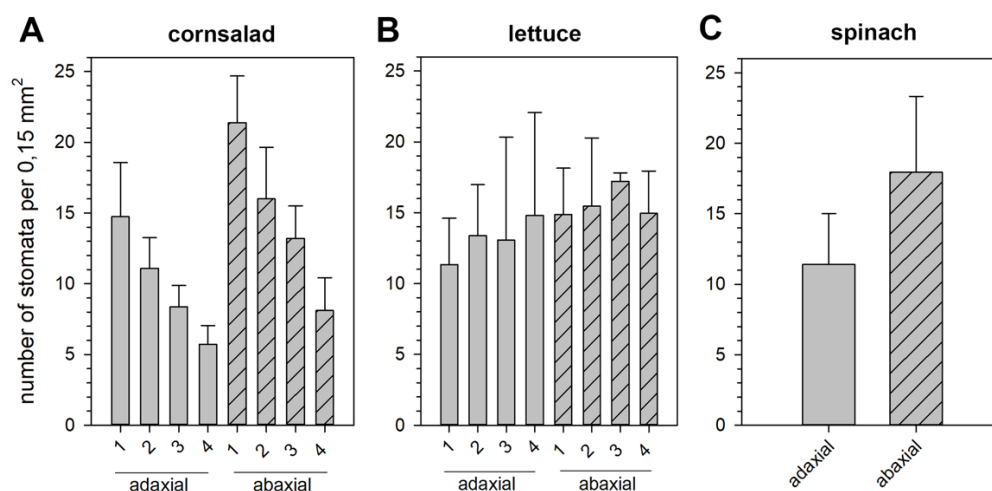


Abbildung 30: Anzahl der Stomata von Feldsalat (A), Kopfsalat (B) und Spinat (C) der adaxialen und abaxialen Blattseite. Gezeigt sind Nagellackabklatschtests von Blättern verschiedener Salatsorten. Für Feldsalat und Kopfsalat wurden sterile selbst-angezogene Pflanzen verwendet. Die Nummerierung 1-4 entspricht der Reihenfolge der Blätter von den ältesten zu den jüngsten Blättern. Für Spinat wurde kommerziell erhältlicher Spinat verwendet, der bereits in einzelnen Blättern vorlag. Es fanden jeweils drei biologische Replikate mit jeweils 1 Pflanze oder 3 Blättern statt.

Auffallend ist, dass die durchschnittliche Stomata-Anzahl pro mm^2 zwischen den drei Salatsorten nicht variiert. Um mögliche Effekte durch die unterschiedliche Anzahl an Stomata auf der adaxialen und abaxialen Blattseite auszuschließen, wurde ein Adhärenzexperiment an Feldsalat durchgeführt, in dem sowohl die adaxiale, als auch die abaxiale Seite infiziert wurde (Abbildung 31). Es zeigte sich, dass die Infektion der verschiedenen Blattseiten zu keiner stark abweichenden Adhärenzrate führt. Als weiterer möglicher Faktor wurde untersucht, ob der Öffnungsgrad, bzw. Schließungsgrad der Stomata einen Einfluss auf die Adhärenz ausübt. Je nach Ausdehnung der in den zwei Schließzellen enthaltenden Vakuole kann es zu geöffneten Stomata oder geschlossenen Stomata kommen (Abbildung 32B). Dieser Mechanismus ist abhängig von einer Reihe an äußeren Faktoren (Licht, Temperatur, etc.). Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, die Stomata äußerlich zu manipulieren. Durch die Zugabe von Abscisinsäure (ABA) kommt es zu einem Verschluss der Stomata (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013), wohingegen es durch die Zugabe von Fusicoccin (FC), ein Pilztoxin, zu dem Anschwellen der Vakuole und so zu sogar überweit geöffneten Stomata kommt (Abbildung 32B). Dies kann mittels Lichtmikroskopie visualisiert werden (Abbildung 32C). In dem sonst verwendeten Infektionspuffer PBS können sowohl geschlossene, als auch offene Stomata beobachtet werden. Durch den manipulierten Verschluss der Stomata kommt es im Adhärenzexperiment zu einer erhöhten Adhärenzrate durch *Salmonella* an Feldsalat im Vergleich zur PBS Kontrolle (Abbildung 32A). Das überweite Öffnen der Stomata, hervorgerufen durch Fusicoccin, führt im Vergleich zur PBS Kontrolle zu einer verringerten Adhärenz. Es könnte sein, dass durch die verschlossenen Stomata ein Raum geschaffen wird, aus dem die Salmonellen nach Adhärenz nicht mehr heraus gewaschen werden können. Im Vergleich zu den überweit geöffneten Stomata, die zu einer verringerten Adhärenz von *Salmonella* führen, würde das bedeuten, dass hier die Salmonellen keinen „versteckten“ Raum erhalten und leichter abgewaschen werden können.

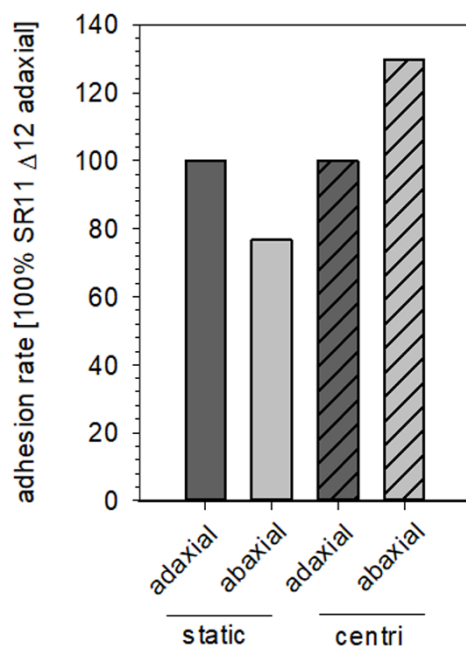


Abbildung 31: Adhärenzverhalten von *Salmonella* an Feldsalat in Abhängigkeit von der adaxialen und abaxialen Blattseite. Versuche wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben.

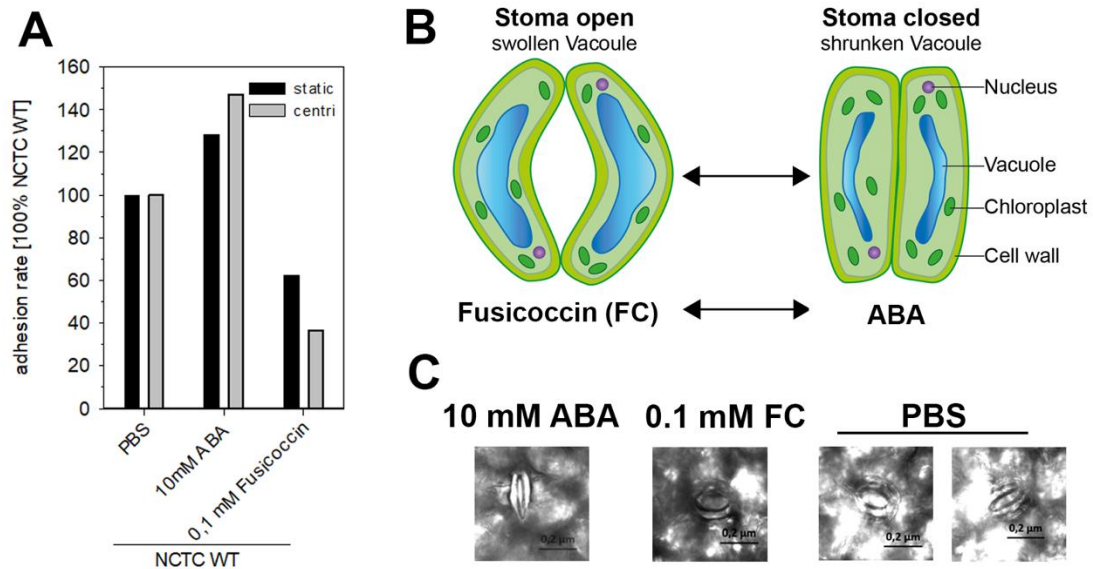


Abbildung 32: Manipulation der Stomata-Bewegung und deren Auswirkung auf das Adhärenzverhalten von *Salmonella* an Feldsalat. In (B) sind schematisch die zwei Stadien von Stomata zu sehen, welche durch die Zugabe von Fusicoccin (FC) und Abscisinsäure (ABA) manipuliert werden können. Mikroskopische Aufnahmen von Stomata nach Manipulation mit Fusicoccin und ABA, sowie PBS als Kontrolle (C). Die Auswirkung der Manipulation auf die Adhärenz von *Salmonella* an Feldsalat ist in (A) dargestellt.

3.8.5 Analyse von adhäsiven Strukturen von pathogenen *E. coli* Stämmen (O157:H7 und O104:H4)

Zur Untersuchung der genetischen Faktoren, die es pathogenen *E. coli* Stämmen ermöglicht an Pflanzen zu adhären, wurden die für die Ausbruchstämme O157:H7 (Sakai) und O104:H4 (C227) verfügbaren sequenzierten Genome nach möglichen adhäsiven Strukturen untersucht. Die bisherigen Untersuchungen dazu stützen sich auf bereits publizierte adhäsive Strukturen für die jeweiligen Stämme (McWilliams & Torres, 2014), als auch auf vergleichende Analysen mit Genomdatenbanken. Der Fokus bestand hier zunächst auf fimbrielle Adhäsine, die wie für *Salmonella*, unter Kontrolle des Tet-On Systems gebracht wurden und in einem apathogenen *E. coli* Stamm, ORN172, zur Expression gebracht werden sollten. Der limitierende Faktor hierbei war, dass für die zu untersuchenden fimbriellen Adhäsine häufig keine Antikörper vorlagen und so ein Nachweis der Expression ausschließlich durch Transmissionselektronenmikroskopie möglich war. Bisher konnten Typ-1-Fimbrien (*fim*-Operon), Ecp-Fimbrien, Hcp-Fimbrien und Curli-Adhäsine (*csg*-Operon) von Sakai und C227 visualisiert werden, sowie Pili (Typ-IV-Pili) von C227 (Abbildung 33).

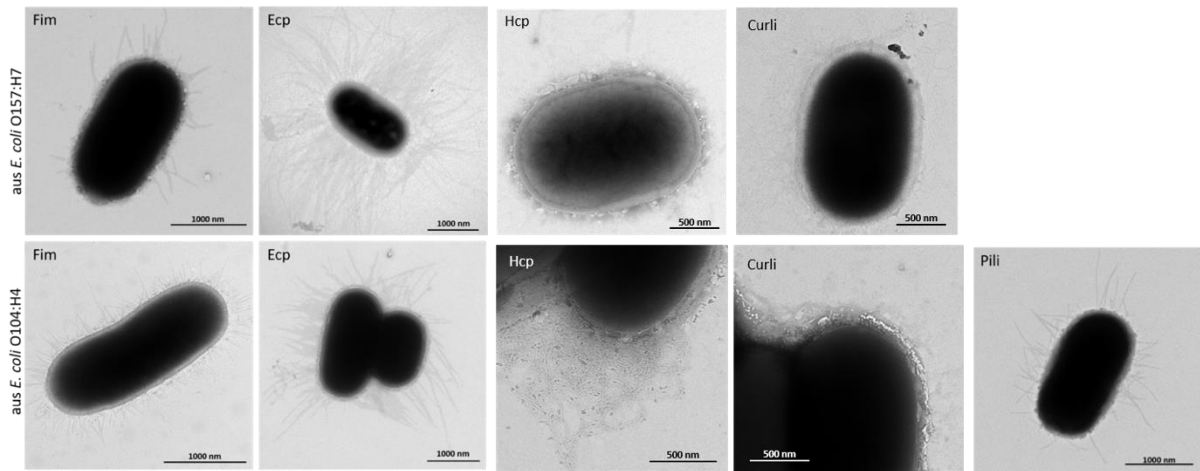


Abbildung 33: Mikroskopische Analyse der Expression von fimbriellen Adhäsinen aus pathogenen *E. coli* Stämmen unter Kontrolle des Tet-ON Systems im apathogenen *E. coli* Stamm ORN172 mittels TEM. Subkulturen wurden mit 100 ng/ml AHT induziert um eine Expression der verschiedenen fimbriellen Adhäsine hervorzurufen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mittels TEM erstellt (ZEISS LEO 902, 80 kV, teilweise mit 1 % PTA Färbung).

Bereits visualisierte adhäsive Strukturen aus den pathogenen *E. coli* Stämmen Sakai und C227 können für Adhärenzexperimente im Weiteren verwendet werden. Bisher wurde der Einfluss von Ecp-Fimbrien aus Sakai und C227 auf die Adhärenz an Feldsalat und Kopfsalat (kommerziell erworben) getestet. Es zeigte sich, wie in vorherigen Publikationen schon gezeigt (Rossez, *et al.*, 2014), eine erhöhte Adhärenz durch Ecp-Fimbrien an Feldsalat und Kopfsalat (Abbildung 34). Die Ecp-Fimbrien können somit in weiteren Adhärenzexperimenten als Positivkontrolle verwendet werden. Die Testung anderer bereits visualisierter adhäsiver Strukturen hinsichtlich ihrer Bindung an verschiedene Salatsorten soll folgen.

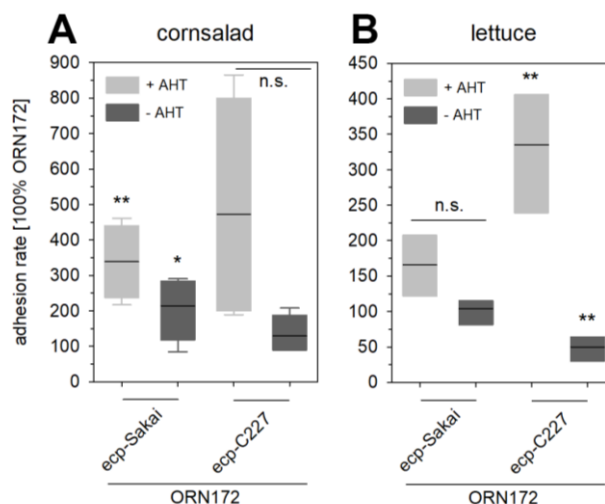


Abbildung 34: Adhärenzverhalten von *Salmonella* an Feldsalat (A) und Kopfsalat (B) mit Expression von Ecp-Fimbrien aus *E. coli* O157:H7 (Sakai) und *E. coli* O104:H4 (C227). Adhärenzversuche wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben. Gezeigt ist die Verteilung von mindestens drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students T-Test. Die Signifikanten sind wie folgt dargestellt: n.s., nicht signifikant; *, $p > 0,05$; **, $p > 0,01$; ***, $p > 0,001$. Daten aus der Bachelorarbeit von Andrea Lepper.

Für die Bindspezifität der Ecp-Fimbrien wird Arabinose vermutet (Rossez, et al., 2014). Um die Involvierung dieser möglichen Bindspezifität an verschiedenen Salatsorten zu untersuchen, wurde versucht eine Bindung der Ecp-Fimbrien an Spinat zu unterbinden, indem eine Vorinkubation der Bakterien mit Arabinose stattfand. Durch die Zugabe von Arabinose zu den Subkulturen konnte eine stark verringerte Adhärenzrate für Ecp-Fimbrien aus Sakai beobachtet werden, eine leichte Abnahme konnte für den Hintergrundstamm ORN172 und für die Ecp-Fimbrien aus C227 gezeigt werden (Abbildung 35B). Diese Ergebnisse müssen durch weitere Replikate bestätigt werden. Eine andere Möglichkeit wäre es, mögliche Arabinosereste auf der Oberfläche von Spinat abzubauen um eine Bindung von Ecp-Fimbrien zu unterbinden. Dieser Versuchsaufbau ist prinzipiell übertragbar auf die genauere Analyse weiterer adhäsiver Strukturen, wie zum Beispiel MisL und Fibronectin.

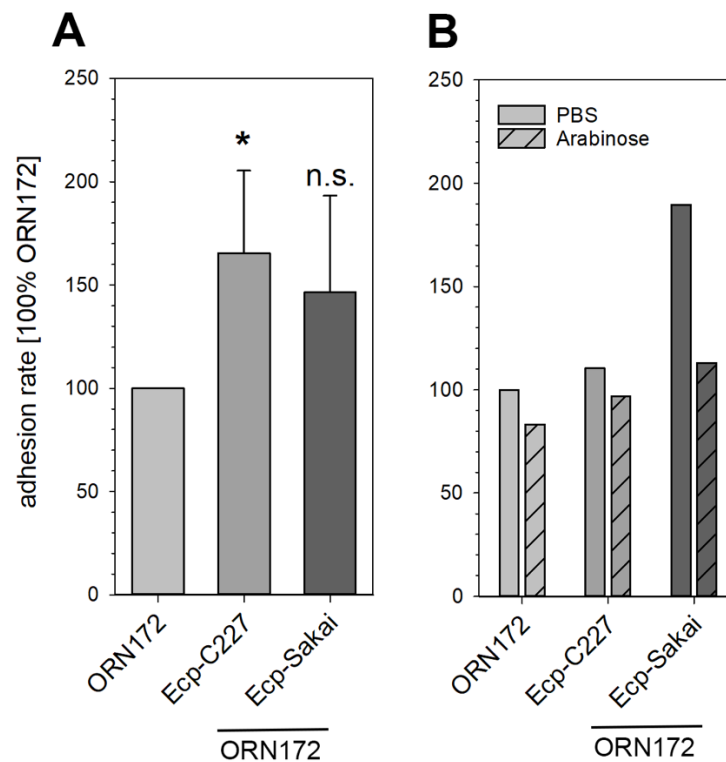


Abbildung 35: Adhärenzverhalten von Ecp-Fimbrien an aus pathogenen *E. coli* Stämmen an Spinat exprimiert in *E. coli* ORN172 und deren mögliche Bindeinhibierung durch Arabinose (B). Adhärenzversuche wurden durchgeführt wie in Abbildung 21 beschrieben. Gezeigt ist die Verteilung von mindestens drei biologischen Replikaten für (A) und eine Durchführung für (B). Die Subkulturen für (B) wurden zusätzlich mit Arabinose inkubiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students T-Test. Die Signifikanten sind wie folgt dargestellt: n.s., nicht signifikant; *, $p > 0,05$.

3.9 Analyse des Proteoms

3.9.1 Analyse des Proteoms von *S. Typhimurium* unter verschiedenen umweltähnlichen Anzuchtbedingungen

Um eine detaillierte Aussage über die Anpassungen von Salmonellen an Temperaturen außerhalb des Säugerwirtes treffen zu können, wurden Proteomproben angefertigt. Die zuvor erstellten Proben von Ganzzelllysaten konnten keinen Aufschluss auf eine veränderte Expression von Membranproteinen, bzw. Proteine von adhäsiven Strukturen liefern. Diese wurden leider durch die verhältnismäßig große Menge an zytoplasmatischen Proteinen überdeckt. Daher wurden weitere Proben angefertigt, für die Membranen separiert wurden, sowie der Überstand mit eventuell sekretierten oder abgescherten adhäsiven Strukturen aufgefangen wurde. Bisher wurden Proben genommen, die bei 37°C und 20°C jeweils in LB-Vollmedium und einem Minimalmedium angezogen wurden. Weitere Proteom-Proben für Anzuchtbedingungen bei 16°C, 12°C und 8°C sollen folgen. Durch den Abgleich von diesen Proteom-Daten mit den Ergebnissen aus den Adhärenz-Versuchen an Feldsalat soll eine Aussage darüber getroffen werden können, welche Ausstattung die Salmonellen zum Zeitpunkt der Kontamination aufweisen. Mit Hilfe dieser Daten kann möglicherweise eine anti-adhäsive Strategie entwickelt werden, die eine Adhärenz der Salmonellen, aber auch anderen HPB an Frischprodukten verringert oder gar verhindert.

3.10 Risikoeinschätzung für den Konsumenten und Interventionsstrategien auf der Basis der gewonnenen Erkenntnisse (AP4)

Nach Wachstum von Kopf- und Feldsalatpflanzen in mit *Salmonella enterica* kontaminiertem Boden waren im Mittel 0,5-0,9% der Pflanzen mit *Salmonella enterica* besiedelt, wobei Kopfsalat (0,7-1,4%) im Vergleich zu Feldsalat (0,3-0,4%) deutlich häufiger besiedelt war. Diese geringe Rate an über die Wurzel besiedelter Pflanzen nach Wachstum in kontaminiertem Boden ist vermutlich ein Grund für die entsprechend relativ geringe Datengrundlage in der vorhandenen Literatur. Aufgrund der im Rahmen des Projektes an Pflanzen nachgewiesenen niedrigen Kontaminationsrate, ist bei einem geringen Stichprobenumfang die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass bei gegebener Salmonellen-Kontamination in einem Pflanzenbestand diese nicht detektiert werden kann. Eine vergleichbar geringe Rate von 2,9% *Salmonella*-positiven Pflanzen (1 von 35) wurde von Honjoh, *et al.* (2014) nach Pflanzung von Salat in mit Salmonellen kontaminierten Boden beschrieben. Dabei wurde von den Autoren vermutet, dass dieser positive Befund mit Verletzungen des Blattes in Verbindung stand. Laut Robert Koch Institut liegt die Infektionsdosis einer Salmonellose für einen erwachsenen Menschen bei 10^4 - 10^6 Salmonellen, wobei unter bestimmten Bedingungen, z.B. Abwehrschwäche wie bei Säuglingen, Kleinkindern und alten Menschen auch Infektionsdosen von nur 10^2 Salmonellen beobachtet wurden (www.rki.de).

Die Nachweisgrenze bei der von uns angewandten Detektionsmethode lag zwischen 1-10 Salmonellen pro 2,5 g Kopfsalat bzw. Feldsalatblatt. Das bedeutet, dass bei einem erwachsenen Menschen eine Salmonellose einen Verzehr von mindestens 2,5-25 kg Salat voraussetzt. Bei der Annahme einer infektiösen Dosis von 10^2 Salmonellen ist entsprechend eine Menge von 25-250 g Salat zu verzehren. Diese Menge entspricht der üblichen Portion an Salat pro Mahlzeit. Allerdings haben unsere Versuche ergeben, dass Salmonellen in höheren Zellzahlen und für einige Wochen auf bzw. in Blättern überleben können. Daher können wir nicht ausschließen, dass die Zahl der vom Boden über die Wurzel oder durch Kontakt von Pflanzenteilen mit kontaminiertem Boden aufgenommenen Salmonellen in den Blättern höher liegt als die Nachweisgrenze der von uns benutzten Detektionsmethode. In dem Fall wäre bereits ein Verzehr von geringeren Mengen an Kopf- oder Feldsalat für eine infektiöse Dosis ausreichend. In Bezug auf den Nachweis einer Kontamination von Pflanzen mit Salmonellen ist auch zu berücksichtigen, dass vermutlich HPB nicht gleichmäßig in/an Pflanzenteilen verteilt sind und zum Nachweis nur entsprechende Stichproben von einer Pflanze selbst beprobt und untersucht werden können.

Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von Salmonellen im Boden zeigten, dass prinzipiell die Zellzahl an Salmonellen über den Versuchszeitraum von 49 Tagen abnahm. Tendenziell nahm auch der Anteil an *Salmonella*-positiven Pflanzen über diesen Zeitraum ab, erreichte jedoch zu keinem Zeitpunkt einen Nullwert. Dies bedeutet, dass trotz Abnahme der Zahl an Salmonellen im Boden die Kolonisierung der Pflanzen nicht ausgeschlossen werden kann. Es ist davon

auszugehen, dass ein Zusammenhang zwischen der Zellzahl an Salmonellen im Boden und der Besiedlungsrate der Pflanzen besteht. Dies wurde jedoch nicht geprüft. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Überlebensfähigkeit sowohl von Stammeigenschaften selbst abhängig ist als auch von Faktoren der Umgebung, wie die Abundanz und Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden. Die Immunreaktion der Pflanze bzw. die Pflanzenart sind weitere Faktoren, die eine Besiedlung mit HPB beeinflussen. So wurde Kopfsalat im Vergleich zu Feldsalat wesentlich häufiger besiedelt. Derzeit ist trotz allem nicht klar, warum einzelne Pflanzen bei vergleichbarem Infektionsdruck besiedelt werden und andere nicht. Dazu sind weitere Studien erforderlich. Ein besseres Verständnis z.B. zur Immunantwort der Pflanze und dem pflanzenassoziierten Mikrobiom bietet Ansatzpunkte für Strategien, einer Besiedlung mit HPB entgegen zu wirken und dem Verbraucher sichere Lebensmittel zur Verfügung zu stellen.

In Bezug auf den Einfluss von organischem Dünger zeigte sich generell, dass dieser die Etablierung von HPB positiv beeinflusst, wenn Dünger als Eintragsquelle benutzt wurde. Ein Vergleich der Varianten mit und ohne Dünger zeigte keine Unterschiede in der Besiedlungsrate der Pflanzen.

Zusammenfassend haben unsere Arbeiten ergeben, dass die Faktoren Bodentextur, Pflanze, *Salmonella*-Stamm sowie organische Düngung einen Einfluss auf das Überleben der Salmonellen im Boden bzw. auf die Kolonisierung der Pflanze haben können und somit bei der Risikobewertung einer Kolonisierung von Pflanzen durch Salmonellen aus dem Boden berücksichtigt werden sollten. Noch nicht hinreichend geklärt ist allerdings der Zusammenhang zwischen Überleben bzw. Konzentration der Salmonellen im Boden und der Kolonisierungsrate der Pflanzen. Eine ebenso wichtige Rolle bei der Etablierung von Salmonellen spielt vermutlich das Mikrobiom des Bodens, wie wir im Vergleich von nativem und autoklaviertem Boden zeigen konnten. Eine hohe mikrobielle Abundanz und Diversität scheinen der Persistenz von *Salmonella* im Boden entgegenzuwirken und dies könnte z.B. durch Zugabe von organischem Dünger erreicht werden. Allerdings müsste dies in weiteren Versuchen geprüft werden, denn andererseits könnten HPB durch organische Düngung, insbesondere tierischen Ursprungs, in den Boden eingetragen werden.

Die Zahl der in die Wurzeln internalisierten *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai lag zwischen $1,1 \times 10^1$ und $2,8 \times 10^2$ CFU/g Wurzel und lag damit im Bereich der für Hackfleisch beschriebenen infektiösen Dosis. Für *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11 ϕ cu lag die Zahl der internalisierten Bakterien zwischen $2,4 \times 10^2$ und $2,6 \times 10^4$ CFU/g Wurzel und damit deutlich über der Infektionsdosis von < 100 Erregern für EHEC O157 (www.rki.de). In Übereinstimmung mit Ergebnissen der Besiedlung der Phyllosphäre durch *S. enterica*, wurden in Feldsalatwurzeln ebenfalls signifikant weniger internalisierte Bakterien gefunden im Vergleich zu Kopfsalatwurzeln. Möglicherweise spielen hier wirtsspezifische Unterschiede in den Immunreaktionen der Pflanzen und des Pflanzenmikrobioms eine wichtige Rolle oder aber auch Unterschiede in der

Wurzelexsudation und damit eventuell in der Attraktion von HPB. Des Weiteren wurde festgestellt, dass, wie für *S. enterica*, die Bodentextur einen Einfluss auf das Überleben und die Internalisierung von EHEC ausübt. Das Überleben von *E. coli* wird möglicherweise, wie bei *S. enterica*, im nährstoffhaltigeren und tonhaltigeren AL begünstigt. Die Internalisierung war bei Kopfsalat in AL-Boden signifikant höher im Vergleich zum DS-Boden. Unklar ist, ob die beobachteten Unterschiede in der Überlebensrate von EHEC im Boden sowie der Adhärenz und Internalisierung, im Falle von Kopfsalat, auf die unterschiedlichen physikochemischen Bodeneigenschaften zurückzuführen sind oder ob, wie bei *S. enterica*, Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens diese Prozesse entscheidend beeinflussen. Des Weiteren ist die Beziehung zwischen der Internalisierung von *E. coli* in die Wurzel und einer möglichen Kolonisierung der Phyllosphäre einschließlich deren Häufigkeit noch nicht ausreichend untersucht, um dies in einer Risikoabschätzung für den Verbraucher zu berücksichtigen.

Im Folgenden werden die sich aus diesen Ergebnissen derzeit ergebenden möglichen Interventionsstrategien aufgelistet, die das Risiko der Besiedlung von Kopfsalat und Feldsalat durch *S. enterica* und EHEC reduzieren können:

1. Erhaltung und/oder Förderung der mikrobiellen Diversität des Bodens, um die Etablierung und Persistenz von *S. enterica* und EHEC im Boden und somit die Kolonisierung der Pflanze zu reduzieren,
2. Reduzierung des Eintrags von leicht bioverfügbaren Nährstoffen wie organische Dünger in den Boden, um die Etablierung und Persistenz von *S. enterica* und EHEC zu reduzieren
3. Förderung der Resistenzeigenschaften der Pflanze bzw. Bereitstellung von Markern, welche die Züchtung resistenterer Pflanzen ermöglichen,

4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

4.1 Nutzen für die Risikobewertung

Die erzielten Ergebnisse des Projekts werden in internationalen als auch nationalen Fachjournalen veröffentlicht und damit Kolleginnen und Kollegen aus Wissenschaft, Beratung und Praxis zugänglich gemacht. Ein Teil der Ergebnisse ist bereits veröffentlicht und weitere Veröffentlichungen sind derzeit in Vorbereitung.

Die Ergebnisse des Projektes unterstreichen, dass Pflanzen ein Habitat für HPB darstellen, doch zeigen sie auch, dass das Risiko der Besiedlung bei gegebener Kontamination, z.B. des Bodens, gering aber gegeben ist. Anhand der bisher vorliegenden Daten allein, ist eine Risikobewertung nicht uneingeschränkt möglich. So fehlen derzeit Daten zu Zusammenhängen von vorliegender Zellzahl in Pflanzensystemen und Befallshäufigkeit. Auch erscheinen Empfehlungen zu besonderen Maßnahmen der Entkeimung von frisch verzehrtem Gemüse, z.B. durch spezielle Wasch-Prozeduren, daher nicht begründet. Ein besseres Verständnis zur Rolle von Adhäsionsfaktoren bei Eintritt von HPB in die Pflanze, z.B. vom Boden in die Wurzel, könnte zu Empfehlungen von Maßnahmen beitragen, die das Risiko einer Besiedlung der Pflanze mit HPB deutlich reduzieren. Die bisher erzielten Ergebnisse bzw. etablierten Methoden stellen eine gute Voraussetzung dar, um im Weiteren notwendige Erkenntnisse zu generieren. So könnten weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der Rolle und Regulation von Adhäsinen in Salmonellen und EHEC in der Interaktion mit Pflanzen oder im Wurzelraum beitragen. Die im Rahmen des Projektes neu etablierte Methodik zur Analyse von bakteriellen Adhäsionsfaktoren kann zur Aufklärung der Bedeutung von weiteren Adhäsinen, z.B. von EHEC, eingesetzt werden. Die Adhäsionsfaktoren von neuen Ausbruchstämmen von EHEC oder *S. enterica* können auf diese Weise schnell strukturell und funktionell charakterisiert werden und bieten eventuell Hinweise, deren Aktivität zu unterdrücken und damit das Risiko einer Besiedlung zu reduzieren. Solche Analysen werden auf der Basis von Genomsequenzen erfolgen, die für klinisch relevante neue Isolate erstellt werden. Die neu etablierte Methode erlaubt nicht nur die Reaktion von HPB auf transkriptioneller Ebene während der Interaktion zu analysieren sondern auch die der Pflanze. Solche Analysen können somit zu einem besseren Verständnis der Reaktion bzw. der Immunantwort der Pflanze beitragen. Die erhöhte Expression relevanter Gene, bzw. deren Produkte könnten somit die Basis für neue Züchtungsstrategien darstellen. Wichtig zu berücksichtigen ist, dass ein Vergleich der Antwort auf Salmonellen zwischen Kopfsalat und der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* nur eine marginale Übereinstimmung ergab. Daraus wird ersichtlich, dass eine simple Übertragung der Ergebnisse aus Modellorganismen in Kulturpflanzen in diesem Fall keine erfolgsversprechende Strategie ist. Weiterführende Untersuchungen sollten sich daher weiter auf für Verbraucher relevante Kulturen konzentrieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der erzielten Ergebnisse ist die Erkenntnis, dass die Zugabe von organischen Düngern, die mit HPB kontaminiert sind, die Persistenz der HBP in pflanzlichen Produktionssystemen positiv beeinflusst. Es sind diesbezüglich unbedingt weitere Untersuchungen unter praxisnahen Bedingungen notwendig, weil die Zugabe von organischer Substanz die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden erhöhen kann. Andererseits, wiesen die Ergebnisse des Projektes darauf hin, dass eine hohe mikrobielle Diversität das Überleben bzw. die Etablierung von HPB im Boden negativ beeinflusst. Noch nicht hinreichend geklärt ist auch der Zusammenhang zwischen Überleben bzw. Konzentration der Salmonellen im Boden und der Kolonisierungsrate der Pflanzen.

4.2 Projektrelevante Publikationen

Die Arbeiten wurden bereits teilweise in peer-review Journalen oder Buchkapiteln veröffentlicht bzw. die Publikationen befinden sich derzeit in Vorbereitung:

- Blau, K., Bettermann, A., Jechalke, S., Fornefeld, E., Stalder, T., Vanrobaeys, Y., Top, E., Smalla, K. (accepted) The transferable resistome of fresh produce characterized by cultivation-dependent and independent methods. *mBio Journal*.
- Hansmeier, N., Miskiewicz, K., Elpers, L., Liss, V., Hensel, M., and Sterzenbach, T. (2017). Functional expression of the entire adhesiome of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Sci Rep* 7, 10326.
- Fornefeld E., Baklawa M., Hallmann J., Schikora, A., Smalla, K. (2018) Sewage sludge amendment and inoculation with plant-parasitic nematodes do not facilitate the internalization of *Salmonella* Typhimurium LT2 in lettuce plants. *Food Microbiol* 71:111-119.
- Eißenberg, K., Moench, D., Drissner, D., Weiss, A., Schmidt, H., 2018. Adherence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain Sakai influence its uptake into the roots of *Valerianella locusta* grown in soil. *Food Microbiol.* 76, 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.016>
- Schierstaedt, J., Bziuk, N., Kuzmanovic, N., Smalla, K., Jechalke, S. (2018) Role of plasmids in plant-bacteria interactions. *Current Issues in Molecular Biology* 30:17-38.
- Fornefeld, E., Schierstaedt, J., Jechalke, S., Grosch, R., Schikora, A., Smalla, K. (2017) Persistence of *Salmonella* Typhimurium LT2 in soil enhanced after growth in lettuce medium. *Frontiers in Microbiology* 8:757.
- Jechalke, S., Schierstaedt, J., Smalla, K., Grosch, R., Schikora, A. (2017) BLE Projekt *plantinfect* – Besiedlung von Kulturpflanzen durch *Salmonella*. *Journal für Kulturpflanzen* 69: 182-183
- Fornefeld, E., Schierstaedt, J., Jechalke, S., Grosch, R., Schikora, A., Smalla, K. (2017) "Interaction between *Salmonella* and plants: potential hosts and vectors for human infection" in *Salmonella*, eds. Mares, M., Ionescu, I. (InTech), ISBN 978-953-51-4980-4

5 Zusammenfassung

Pflanzen stellen ein Habitat für humanpathogene *E. coli* und *S. enterica* dar, die in der Lage sind, Kulturpflanzen wie Salat vom Boden über die Wurzel zu kolonisieren. Ein wichtiger Aspekt für eine erfolgreiche Kolonisierung ist das Überleben der HPB im Boden. Generell betrachtet, nahmen die Populationen der getesteten *E. coli* Stämme sowie die drei getesteten *S. enterica* Typhimurium 14028s, Typhimurium LT2 und Senftenberg unabhängig von Stamm und Bodentyp über die Versuchszeit deutlich ab, waren jedoch in der Lage, mehrere Wochen im Boden zu überdauern und dabei ihre Kultivierbarkeit zu erhalten. Bei allen Untersuchungen waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den Stämmen zu beobachten. Allerdings war das Überleben von *E. coli* und *S. enterica* im nährstoffhaltigeren und tonhaltigeren AL- im Vergleich zum DS-Boden begünstigt. Für Salmonellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Applikation organischen Düngers in den Boden sowie der Zeitpunkt der Salmonellen-Applikation (zusammen mit organischem Dünger oder einen Monat später) die Überlebensrate der Salmonellen im Boden signifikant beeinflusst. Eine Erklärung dafür könnten die mit den organischen Düngern zugefügten Nährstoffe zum Zeitpunkt der Salmonellen Applikation sein, die deren Etablierung im Boden unterstützen.

Die Ergebnisse zu den Adhäsions- und Internalisierungsversuchen mit *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai und den *hcpA*- und/oder *iha*-negativen Mutanten und Feldsalat wurden bereits publiziert (Eissenberger, *et al.*, 2018). Verschiedene Versuche haben gezeigt, dass Oberflächenstrukturen wie das T3SS, Flagellen und Pili für die Kolonisierung ebenso eine Rolle spielen wie die Pflanzenart und der Bodentyp an sich, in dem die Pflanzen angebaut werden. Welchen Einfluss Pflanzenart, Bodentextur sowie die Bodenmikrobiota auf die Kolonisierung und die Interaktion von HPB und Bodenmikrobiota haben, ist noch nicht vollständig geklärt. Für *S. enterica* konnten wir zeigen, dass eine hohe mikrobielle Abundanz und Diversität im Boden der Persistenz von *Salmonella* entgegenwirken. Diese könnte somit auch indirekt die Kolonisierung der Pflanzen reduzieren. Des Weiteren unterstreichen die Ergebnisse den Einfluss von Bodentextur und *Salmonella*-Stamm auf die Befallshäufigkeit von Kopf- und Feldsalat. Tendenziell nahm die Befallshäufigkeit der Pflanzen über die Zeit ab, erreichte jedoch im Versuchszeitraum keinen Nullwert.

Die Transkriptom-Analysen zeigten, dass Flagellen und andere Oberflächenstrukturen von fundamentaler Bedeutung in der Interaktion von *E. coli* (EHEC und EHEC/EAEC) mit Pflanzen sind. Außerdem scheinen diese Stämme ihre Genexpressionsprofile an die Verstoffwechselung pflanzlicher Inhaltsstoffe anzupassen. Die Transkriptom-Analyse von *S. enterica* ergab eine Reaktion auf Wurzelexsudate und Salatextrakte vergleichbar der Reaktion während der Kolonisierung von tierischem Gewebe. Diese Reaktion könnte daher auch bei der Kolonisierung und Internalisierung von Pflanzen eine Rolle spielen.

Im Rahmen des Projektes konnte ein Versuchsaufbau etabliert werden, der es ermöglicht, die Adhärenzrate von verschiedenen Bakterienstämmen quantitativ zu bestimmen. Des Weiteren konnte die Expression aller putativen adhäsiven Faktoren in *S. Typhimurium* mittels des Tet-On Systems gewährleistet werden, um diese in den Adhärenzexperimenten untersuchen zu können. Mit entsprechenden Untersuchungen putativer adhäsiver Faktoren aus pathogenen *E. coli* Stämmen wurde nachfolgend begonnen, doch steht die Analyse verschiedener adhäsiver Faktoren noch aus. Das Fehlen von Informationen zu adhäsiven Faktoren der jeweiligen Stämme, sowie das Fehlen von Antikörpern von zu untersuchenden Strukturen, erschweren den Fortschritt dieser Untersuchungen.

In den bisherigen Untersuchungen konnte kein universeller Faktor von *Salmonella* und pathogenen *E. coli* Stämmen gefunden werden, der eine Adhärenz an verschiedenen Pflanzenarten erlaubt. Vielmehr zeigte sich ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren, welche die Bakterien zu einer Adhärenz an Pflanzenoberflächen befähigen. Besonders auffallend waren bisher die Faktoren Motilität und LPS. Der Effekt von MisL sowie BapA aus *S. Typhimurium* auf die Adhärenzrate scheint zudem pflanzenspezifisch zu sein, was jedoch noch genauer untersucht werden sollte. Für die pathogenen *E. coli* Stämme Sakai und C227 erwiesen sich die Ecp-Fimbrien als ein wichtiger Faktor für die Adhärenz an allen drei untersuchten Pflanzenarten (Kopfsalat, Feldsalat und in diesem Fall zusätzlich Spinat). Um genauere Aussagen treffen zu können, muss die native Expression von Ecp-Fimbrien detaillierter untersucht werden und der tatsächlich pathogene *E. coli* Stamm in die Versuche mit einbezogen werden. Um auch den Einfluss von bestimmten Pflanzencharakteristika wie der Stomata-Anzahl, die für die Besiedlung von Bakterien relevant sind, zu verstehen, wurden Versuche mit Salat durchgeführt, in denen die Stomata-Anzahl manipuliert wurde. Im Ergebnis stellte sich heraus, dass die Besiedlung der Blattoberseite nicht wesentlich von der der Blattunterseite abweicht. Der Verschluss von Stomata führte zu einer erhöhten Adhärenzrate.

Untersuchungen mit GFP-markierten *S. Typhimurium* 14028s zeigten eine Akkumulation von Zellen an der Rhizodermis, den Wurzelhaarzellen sowie an Austrittsstellen von Sekundärwurzeln, was auf mögliche Internalisierungswege über die Wurzel hindeutet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Salmonellen über Hydathoden und Spaltöffnungen in die Blätter eindringen und dort für mehrere Wochen überleben können.

Im Ergebnis der Analyse des Transkriptoms von Kopfsalat war eine ausgeprägte Immunreaktion der Pflanze in Reaktion auf *S. enterica* 14028s zu beobachten. Die *Salmonella*-responsiven Gene waren in Gene Ontology (GO)-Terms angereichert, die bestimmte gut bekannte Bereiche der pflanzlichen Immunantwort abdecken. Zum einen war die Expression von MAP-Kinasen (MAPK) assoziierten Genen erhöht. MAPK sind für die Signaltransduktion zwischen Membranen und Zellkernen verantwortlich und bilden einen der wichtigsten Regulationseinheiten in Reaktion auf Pathogene. Zum anderen wurden mehrere Gene, assoziiert mit dem Metabolismus der α -

Linolsäure, hochreguliert. Dies führt zur vermehrten Produktion von Jasmonsäure und der Induktion von bestimmten Teilen der Immunantwort. Ein weiterer Aspekt ist die Hochregulierung von Genen, die in der Produktion von Ligninen involviert sind. Lignine sind phenolische Komponenten der Zellwand und maßgeblich an der Resistenz gegenüber mehreren Pathogenen beteiligt. Diese ausgeprägte Immunreaktion der Pflanze in Reaktion auf *S. enterica* 14028s könnte ein Grund für die beobachteten relativ niedrigen Kolonisierungsraten sein. Kenntnisse zur Immunantwort der Pflanze eröffnen ein großes Potenzial für weitere, neue Züchtungsstrategien zur Reduktion von Ausbrüchen.

Im Zuge des Vorhabens haben sich weiterführende Fragestellungen ergeben. So wurde bei der Transkriptom-Analyse festgestellt, dass EHEC die Pflanzen als Sekundärwirt nutzen können und Flagellen und T3SS wichtig für die Interaktion sind. Jedoch ist noch unklar, welchen Einfluss der Boden auf die Genexpression von EHEC und die Interaktion mit der Pflanze hat. Darüber hinaus könnten Dual-RNaseq-Analysen, bei denen sowohl die Genexpression von EHEC als auch die der Pflanze untersucht werden, genaueren Aufschluss über die EHEC-Pflanzen-Interaktion einschließlich der gegenseitigen Wechselwirkungen geben. Im Weiteren ist die Rolle der autochthonen Mikrobiota für die Adhärenz und Internalisierung von EHEC aufzuklären. Auch ist derzeit unklar, welchen Einfluss die Passage über Pflanzen auf die Infektiosität von EHEC hat.

Mittels des etablierten experimentellen Systems wurde das vollständige Adhäsionsom von *S. Typhimurium* und ausgewählten Adhäsinen von zwei EHEC Ausbruchsstämmen untersucht. Die Ergebnisse weisen auf eine relativ geringe Bedeutung der Adhäsion an Blattoberflächen von Feldsalat und Kopfsalat hin. Weiterführende Untersuchungen sollten sich auf die Bedeutung von Adhäsionsfaktoren bei Kontakten zwischen HPB und Pflanzen im Wurzelraum konzentrieren. Dazu werden neue experimentelle Herangehensweisen benötigt.

Ebenfalls ungeklärt ist die Beziehung zwischen der Kontaminationsrate des Bodens mit HPB und der Kolonisierungsrate der Phyllosphäre. Dazu sind weitere Untersuchungen unter praxisnahen Bedingungen notwendig. In diesem Zusammenhang ist auch die Frage zu beantworten, warum nur ein geringer Anteil der Pflanzenpopulation durch HPB besiedelt wird. Faktoren, die diese partielle Besiedlung beeinflussen, könnten z.B. der Immunstatus der Pflanze, das Mikrobiom der Pflanze aber auch Temperatur, Feuchtigkeit und die lokale und temporale Nährstoffverfügbarkeit sein.

Da der Boden, die Rhizosphäre, aber auch organische Dünger im speziellen ein Reservoir von Antibiotikaresistenzgenen darstellen, die häufig Plasmid-lokalisiert sind, ist es im Rahmen der Bedrohung durch multiresistente Keime ebenfalls von allgemeinem Interesse und eine weiterführende Fragestellung ob und welche Antibiotikaresistenzgene und mobilen genetische Elemente von HPB in den Pflanzenproduktionssystemen aufgenommen werden können und somit ein mögliches Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen. Plasmide tragen aber auch zur Biofilmbildung bei, wie z.B. für F-Plasmide gezeigt wurde (Ghigo, 2002). Interessant für das

Projekt ist die von Blau, *et al.* (accepted) jüngst zur Publikation angenommene Studie, die zeigt, dass *E. coli* auf Frischeprodukten aus dem Handel wie Salat, Rucola oder Koriander nachgewiesen werden konnten – oft erst nach einer Anreicherung. Die Studie fokussierte zunächst auf Tetracyclin-resistente *E. coli* Isolate, die nach direkter Plattierung oder Anreicherung in BPW erhalten wurden. Die Isolate trugen verschiedenste Mehrfachantibiotika-Resistenzplasmide. Eine detaillierte Analyse der Plasmide zeigte, dass die Isolate IncF und Incl-Plasmide, aber auch Plasmide mit einem breiten Wirtsbereich, wie IncP-1 oder IncN-Plasmide, trugen. Daher ist die Analyse des Beitrags von Plasmiden, aufgrund der plasmid-kodierten Pili und deren Beitrag zur Adhärenz und Biofilmbildung in der Phyllosphäre, sehr wichtig.

Eine wichtige Übertragungsmöglichkeit von HPB auf Pflanzen ist die Bewässerung. Je nach Ursprung des Wassers und Art der Bewässerung ergeben sich unterschiedliche Übertragungsrisiken. Weiterführende Forschungsprojekte könnten diese Risiken mit geeigneten experimentellen Systemen untersuchen und bewerten.

6 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

AP1 - Validierung von spezifischen Nachweisverfahren für *S. enterica* und EHEC in Pflanzen und Boden

Die Ziele des AP1 konnten weitgehend erreicht werden, doch sind einige Punkte noch in Bearbeitung. In den Versuchen zum VBNC-Status wurde mit dem apathogenen Stamm *E. coli* C600 als auch mit *E. coli* O157:H7 Stamm Sakai gearbeitet. Im Ergebnis konnten grundlegende Erkenntnisse sowohl zur Induktion als auch zur Resuscitation des VBNC-Status gewonnen werden. Die ermittelten Daten werden dazu beitragen die Arbeiten des AP1 abzuschließen. Der ursprüngliche Zeitplan konnte in diesem Fall nicht eingehalten werden, da sich die Experimente zur Transkriptom-Analyse deutlich umfangreicher gestalteten als erwartet. Bezüglich der Nachweisverfahren für *S. enterica* konnten im Rahmen des Projekts erfolgreich Methoden etabliert und angewendet werden die es erlaubten, die Zahl der Salmonellen im Boden zu quantifizieren bzw. die Besiedlungsdichte der Phyllosphäre bis zu einer Nachweisgrenze von 1-10 Bakterien zu detektieren. Der Vergleich zwischen Kultivierung und kultivierungs-unabhängiger qPCR-Quantifizierung der Salmonellen im Boden ergab keinen Hinweis auf einen VBNC-Status für *S. Typhimurium* bis 91 Tage nach Inokulation. Interessanterweise gaben die Ergebnisse einen Hinweis auf eine mögliche Ausbildung des VBNC-Status bei *S. Senftenberg* im Boden. Jedoch sind weiterführende Experimente notwendig, um diese möglicherweise Stamm-spezifischen Unterschiede in der Etablierung eines VBNC-Status zu verifizieren und mögliche Ursachen aufzuklären.

AP2 - Einfluss von Anbaubedingungen auf die Internalisierung HPB in Gewebe von Nutzpflanzen

Die „Transkriptom-Analyse der Bakterien bei der Kolonisierung von pflanzlichen Oberflächen“ konnte abgeschlossen werden. Nach anfänglichen Schwierigkeiten konnte eine Transkriptom-Analyse für drei Prototypen pathogener *E. coli* Stämme sowie für *S. enterica* Typhimurium 14028s in Anwesenheit pflanzlicher Bestandteile durchgeführt und Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten zwischen den bakteriellen Stämmen bzw. Behandlungen festgestellt werden. Somit wurden die Ziele für dieses AP erreicht.

Versuche zu „Die pflanzlichen Abwehrmechanismen“ ergaben mittels quantitativer PCR von ausgewählten *PR*-Genen Hinweise auf eine spezifische Antwort der Pflanze in Reaktion auf bestimmte *Salmonella*-Stämme. Die beobachtete Pflanzenantwort lässt vermuten, dass die Beschränkung auf die quantitative Analyse von ausgewählten *PR*-Genen nicht ausreichend ist, um ein vollständiges Bild der *Salmonella*-Pflanzen-Interaktion zu erhalten. Seit kurzem steht dem

plantinfect-Konsortium die Genomsequenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa* cv. Tizian) zur Verfügung. Dies ermöglichte durch die Sequenzierung des Transkriptoms des Salats ein weitaus vollständigeres Bild der Pflanzenantwort auf die Kolonisierung durch *Salmonella* zu erhalten. Des Weiteren sollen die Ergebnisse dieser Transkriptom-Analyse zur Identifizierung von spezifischen Genen in Reaktion auf die Interaktion mit *Salmonella* genutzt werden. Auf der Basis von Kenntnissen dieser für die Kulturpflanze (Kopfsalat) spezifischen Abwehrgene wird es in weiteren Versuchen möglich sein, präzisere Informationen über die ggf. reduzierte Resistenz / Anfälligkeit der Pflanzen und somit das Risiko einer Kolonisierung mit HPB unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Bodentyp, Düngersorte, Temperatur) zu erhalten. Informationen über eine Einschränkung (Anfälligkeit der Pflanzen) bzw. Verbesserung (Resistenz der Pflanzen) der Abwehrmechanismen unter bestimmten Wachstumsbedingungen sind für die Risikobewertung essentiell.

Versuche zu „Inokulationsversuche, Umweltfaktoren, stammspezifische Faktoren“ konnten im angestrebten Zeitraum abgeschlossen werden. Allerdings gestalteten sich die Inokulationsversuche mit EHEC im Gewächshaus der Biosicherheitsstufe 3 aufwändiger und darüber hinaus umfangreicher als geplant.

AP3 - Wie verteilen sich die Bakterien in der Pflanze und welches Gewebe können sie kolonisieren?

Für *S. enterica* konnten die Versuche zu AP3 abgeschlossen werden. Der geringe Anteil an durch *S. enterica* besiedelten Pflanzen erschwerte allerdings die Bestimmung der internalisierten Bakterienzahlen, weshalb unter Anderem die Besiedlung und das Überleben der Bakterien in der Phyllosphäre durch Simulierung der Kontamination durch Beregnungswasser erfasst und untersucht wurde. Entsprechende Versuche zur „Systemischen Kolonisierung“ (AP3) konnten für EHEC nicht innerhalb des Zeitplanes durchgeführt werden, was derzeit eine Risikoabschätzung erschwert.

AP4 - Risikoeinschätzung für den Konsumenten

Ziele des AP4 konnten bisher weitgehend erreicht werden. Die Beziehung zwischen in die Wurzel internalisierten *E. coli* und einer möglichen Kolonisierung der Phyllosphäre sowie deren Häufigkeit ist allerdings noch nicht ausreichend untersucht, um eine diesbezügliche Risikoabschätzung für den Verbraucher zu ermöglichen.

Tendenziell nahm der Anteil an *Salmonella*-positiven Pflanzen über die Zeit ab, erreichte jedoch zu keinem Zeitpunkt einen Nullwert.

Abschließend konnten sich aus diesen Ergebnissen ergebende mögliche Interventionsstrategien formuliert werden, die genutzt werden könnten, um das Risiko für die Besiedlung von Kopf- und Feldsalat durch *S. enterica* und EHEC zu reduzieren

7 Literaturverzeichnis

- Aurass P, Prager R & Flieger A (2011) EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. *Environ Microbiol* **13**: 3139-3148.
- Barak JD, Kramer LC & Hao LY (2011) Colonization of tomato plants by *Salmonella enterica* is cultivar dependent, and type 1 trichomes are preferred colonization sites. *Appl Environ Microbiol* **77**: 498-504.
- Blau K, Bettermann A, Jechalke S, et al. (accepted) The transferable resistome of fresh produce characterized by cultivation-dependent and independent methods. *mBio Journal*.
- Brandl MT & Amundson R (2008) Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 2298-2306.
- Brandl MT, Cox CE & Teplitski M (2013) *Salmonella* interactions with plants and their associated microbiota. *Phytopathology* **103**: 316-325.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 4516-4522.
- Daszkowska-Golec A & Szarejko I (2013) Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front Plant Sci* **4**: 138.
- Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- Duerr CU, Zenk SF, Chassin C, Pott J, Gutle D, Hensel M & Hornef MW (2009) O-antigen delays lipopolysaccharide recognition and impairs antibacterial host defense in murine intestinal epithelial cells. *PLoS Pathog* **5**: e1000567.
- Eissenberger K, Moench D, Drissner D, Weiss A & Schmidt H (2018) Adherence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain Sakai influence its uptake into the roots of *Valerianella locusta* grown in soil. *Food Microbiol* **76**: 245-256.
- Erlacher A, Cardinale M, Grosch R, Grube M & Berg G (2014) The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Frontiers in Microbiology* **5**.
- Fletcher J, Leach JE, Eversole K & Tauxe R (2013) Human pathogens on plants: designing a multidisciplinary strategy for research. *Phytopathology* **103**: 306-315.
- Fornefeld E, Schierstaedt J, Jechalke S, Grosch R, Schikora A & Smalla K (2017) Persistence of *Salmonella Typhimurium* LT2 in Soil Enhanced after Growth in Lettuce Medium. *Front Microbiol* **8**: 757.
- Fulde M, Sommer F, Chassaing B, et al. (2018) Neonatal selection by Toll-like receptor 5 influences long-term gut microbiota composition. *Nature* **560**: 489-493.
- Garcia AV, Charrier A, Schikora A, et al. (2014) *Salmonella enterica* flagellin is recognized via FLS2 and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **7**: 657-674.
- Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, Hardt WD & Hensel M (2007) *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* **9**: 1834-1850.
- Ghigo J-M (2002) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Plasmid* **48**: 294.
- Goudeau DM, Parker CT, Zhou Y, Sela S, Kroupitski Y & Brandl MT (2013) The *Salmonella* transcriptome in lettuce and cilantro soft rot reveals a niche overlap with the animal host intestine. *Appl Environ Microbiol* **79**: 250-262.
- Hansmeier N, Miskiewicz K, Elpers L, Liss V, Hensel M & Sterzenbach T (2017) Functional expression of the entire adhesiome of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Sci Rep* **7**: 10326.
- Hernandez-Reyes C & Schikora A (2013) *Salmonella*, a cross-kingdom pathogen infecting humans and plants. *Fems Microbiology Letters* **343**: 1-7.

- Hoffmann S, Schmidt C, Walter S, Bender JK & Gerlach RG (2017) Scarless deletion of up to seven methyl-accepting chemotaxis genes with an optimized method highlights key function of CheM in *Salmonella Typhimurium*. *PLoS One* **12**: e0172630.
- Holzer SU, Schlumberger MC, Jackel D & Hensel M (2009) Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **77**: 5458-5470.
- Honjoh K-i, Mishima T, Kido N, Shimamoto M & Miyamoto T (2014) Investigation of routes of *Salmonella* contamination via soils and the use of mulch for contamination control during lettuce cultivation. *Food Science and Technology Research* **20**: 961-969.
- Jacobsen CS & Bech TB (2012) Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Research International* **45**: 557-566.
- Kalir S, McClure J, Pabbaraju K, et al. (2001) Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science* **292**: 2080-2083.
- Kroupitski Y, Golberg D, Belausov E, Pinto R, Swartzberg D, Granot D & Sela S (2009) Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6076-6086.
- Kwan G, Plagenz B, Cowles K, Pisithkul T, Amador-Noguez D & Barak JD (2018) Few differences in metabolic network use found between *Salmonella enterica* colonization of plants and typhoidal mice. *Frontiers in Microbiology* **9**: 695.
- Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo JM, Gamazo C, Penades JR & Lasa I (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* **58**: 1322-1339.
- Lorkowski M, Felipe-Lopez A, Danzer CA, Hansmeier N & Hensel M (2014) *Salmonella enterica* invasion of polarized epithelial cells is a highly cooperative effort. *Infect Immun* **82**: 2657-2667.
- Macarisin D, Patel J, Bauchan G, Giron JA & Sharma VK (2012) Role of curli and cellulose expression in adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to spinach leaves. *Foodborne Pathog Dis* **9**: 160-167.
- McWilliams BD & Torres AG (2014) EHEC adhesins. *Microbiol Spectr* **2**: EHEC00032013.
- Nübling S, Wohlt D, Saile N, Weiss A & Schmidt H (2017) Antimicrobial effect of lauroyl arginate ethyl on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on red oak leaf lettuce. *European Food Research and Technology* **243**: 879-887.
- Quilliam RS, Williams AP & Jones DL (2012) Lettuce cultivar mediates both phyllosphere and rhizosphere activity of *Escherichia coli* O157:H7. *PLOS ONE* **7**: e33842.
- Richter B & Smalla K (2007) Screening of rhizosphere and soil bacteria for transformability. *Environ Biosafety Res* **6**: 91-99.
- RKI (2011) Abschlussbericht zum EHEC/HUS-Ausbruch Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch Deutschland 2011 (September 2011).
- Rossez Y, Holmes A, Lodberg-Pedersen H, et al. (2014) *Escherichia coli* common pilus (ECP) targets arabinosyl residues in plant cell walls to mediate adhesion to fresh produce plants. *J Biol Chem* **289**: 34349-34365.
- Rühlmann J & Ruppel S (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**: 163-170.
- Saldana Z, Sanchez E, Xicohtencatl-Cortes J, Puente JL & Giron JA (2011) Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Front Microbiol* **2**: 119.
- Schikora A, Garcia AV & Hirt H (2012) Plants as alternative hosts for *Salmonella*. *Trends Plant Sci* **17**: 245-249.
- Schikora A, Virlogeux-Payant I, Bueso E, et al. (2011) Conservation of *Salmonella* infection mechanisms in plants and animals. *Plos One* **6**: 10.
- Schikora M, Neupane B, Madhogaria S, et al. (2012) An image classification approach to analyze the suppression of plant immunity by the human pathogen *Salmonella Typhimurium*. *BMC Bioinformatics* **13**: 171.

- Schneider HA & Zinder ND (1956) Nutrition of the host and natural resistance to infection. V. An improved assay employing genetic markers in the double strain inoculation test. *J Exp Med* **103**: 207-223.
- Semenov AM, Kuprianov AA & van Bruggen AH (2010) Transfer of enteric pathogens to successive habitats as part of microbial cycles. *Microb Ecol* **60**: 239-249.
- Shirron N & Yaron S (2011) Active suppression of early immune response in tobacco by the human pathogen *Salmonella* Typhimurium. *PLoS One* **6**: e18855.
- St-Pierre F, Cui L, Priest DG, Endy D, Dodd IB & Shearwin KE (2013) One-step cloning and chromosomal integration of DNA. *ACS Synth Biol* **2**: 537-541.
- Sundberg C, Al-Soud WA, Larsson M, *et al.* (2013) 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 612-626.
- Thorsted PB, Macartney DP, Akhtar P, *et al.* (1998) Complete sequence of the IncPbeta plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. *J Mol Biol* **282**: 969-990.
- Wang Q, Zhang Y, Yang C, *et al.* (2010) Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science (New York, N.Y.)* **327**: 1004-1007.
- Wang RF & Kushner SR (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**: 195-199.
- Westrell T, Ciampa N, Boelaert F, *et al.* (2009) Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Euro Surveill* **14**.
- Wille T, Wagner C, Mittelstadt W, *et al.* (2014) SiiA and SiiB are novel type I secretion system subunits controlling SPI4-mediated adhesion of *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol* **16**: 161-178.
- Woodall LD, Russell PW, Harris SL & Orndorff PE (1993) Rapid, synchronous, and stable induction of type 1 piliation in *Escherichia coli* by using a chromosomal lacUV5 promoter. *J Bacteriol* **175**: 2770-2778.
- Zhao P, Zhang F, Liu D, Imani J, Langen G & Kogel K-H (2017) Matrix metalloproteinases operate redundantly in *Arabidopsis* immunity against necrotrophic and biotrophic fungal pathogens. *PLOS ONE* **12**: e0183577.
- Zimmermann J (2014) Entwicklung und Validierung schneller und selektiver Verfahren zum Nachweis von *Salmonella enterica*, *Cronobacter* spp. und *Bacillus cereus* in Milcherzeugnissen. *Dissertation University Hohenheim* http://opus.uni-hohenheim.de/volltexte/2014/2993/pdf/Dissertation_Jennifer_Zimmermann.pdf.

8 Anhang

Tabelle S1: Nährstoffgehalte von HTK, benutzt für Versuche mit DS, durchgeführt von dem Landeskontrollverband Berlin Brandenburg eV, Waldsiefersdorf. Es wurden keine Salmonellen in der Originalsubstanz nachgewiesen (Methode BGK Kap. IV C1; 2006-09; LUFA Nord-West, Oldenburg).

	% FM	% TS	kg/t Substrat
Gesamtstickstoff (N)	1,11	3,09	11,05
Ammonium Stickstoff (NH₄-N)	0,41		4,10
Gesamtphosphat (P₂O₅)	0,69	1,92	6,86
Gesamtkaliumoxid (K₂O)	0,78	2,2	7,8
Magnesiumoxid (MgO)	0,29	0,8	2,9
Phosphor	0,3		
Kalium	0,65		
Magnesium	0,18		
Trockensubstanz (TS) in %	35,75		
org. Substanz in % FM	18,5		
pH-Wert (CaCl₂)	6,7		

Tabelle S2: Nährstoffgehalte von Schweinegülle benutzt für Versuche mit DS, durchgeführt von dem Landeskontrollverband Berlin Brandenburg eV, Waldsiefersdorf. Es wurden keine Salmonellen in der Originalsubstanz nachgewiesen (Methode BGK Kap. IV C1; 2006-09; LUFA Nord-West, Oldenburg).

	% FM	% TS	kg/m ³
Gesamtstickstoff (N)	0,839	4,80	8,39
Ammonium Stickstoff (NH₄-N)	0,258	1,48	2,58
Gesamtphosphat (P₂O₅)	0,63	3,60	6,30
Gesamtkaliumoxid (K₂O)	0,44	2,52	4,40
Magnesiumoxid (MgO)	0,23	1,32	2,30
Schwefel	0,08	0,46	0,80
Calcium	0,51	2,92	5,10
Trockensubstanz (TS) in %	17,48		
Kupfer (Cu)	0,00224		128
Zink (Zn)	0,01125		644

Tabelle S3: Nährstoffgehalte von HTK benutzt für Versuche mit AL, durchgeführt von dem Institut für Düngemittel und Saatgut (LUFA Nord-West), Hameln.

	% FM	% TS	kg/t Substrat
Gesamtstickstoff (N)	2,15	3,14	21,46
Ammonium Stickstoff (NH₄-N)	0,28	0,41	2,77
Gesamtphosphat (P₂O₅)	1,88	2,75	18,8
Gesamtkaliumoxid (K₂O)	1,87	2,74	18,7
Magnesiumoxid (MgO)	0,70	1,02	6,97
Schwefel	0,24	0,35	2,39
Natrium	0,23	0,34	2,32
Calcium	7,04	10,3	70,4
Trockensubstanz (TS) in %	68,36		
org. Substanz in % FM	36,19	52,94	
Mineralische Substanz	32,17	47,06	

Tabelle S4: Nährstoffgehalte von Schweinegülle benutzt für Versuche mit AL, durchgeführt von dem Institut für Düngemittel und Saatgut (LUFA Nord-West), Hameln.

	% FM	% TS	kg/m ³
Gesamtstickstoff (N)	0,314	6,47	3,14
Ammonium Stickstoff (NH₄-N)	0,118	2,43	1,18
Gesamtphosphat (P₂O₅)	0,27	5,57	2,70
Gesamtkaliumoxid (K₂O)	0,16	3,30	1,60
Magnesiumoxid (MgO)	0,09	1,86	0,90
Schwefel	0,04	0,82	0,40
Calcium	0,22	4,54	2,20
Trockensubstanz (TS) in %	4,85		
Kupfer (Cu)	0,00096		198
Zink (Zn)	0,00475		980

Tabelle S5: Untersuchungsergebnis Boden DS sowie Boden DS mit HTK von Tag 0 (Zentralversuch), durchgeführt von der LUFA Speyer (Methoden VDLUFA Bd. 1 A 6.1.4.1 und A 2.1.1).

	Tiefe [cm]	Nitrat (NO ₃)	Ammonium (NH ₄)	Nitrat-N (NO ₃ -N)	Ammonium-N (NH ₄ -N)	Trocken- masse [%]
		[mg/100g feldfrischer Boden]				
DS Boden	0-30	5,9	< 0,1	57	< 3	98
DS Boden + HTK	0-30	< 0,5	18,9	< 5	701	90

Tabelle S6: Untersuchungsergebnis Boden DS sowie Boden DS mit Schweinegülle von Tag 0 (Zentralversuch), durchgeführt von der LUFA Speyer (Methoden VDLUFA Bd. 1 A 6.1.4.1 und A 2.1.1).

	Tiefe [cm]	pH	Phosphat (P ₂ O ₅)	Kalium (K ₂ O)	Magnesium (Mg)	Stickstoff (N)	Humus [%]
			[mg/100g feldfrischer Boden]				
DS Boden	0-30	7,4	31	7	3	42	1,1
DS Boden + Gülle	0-30	7,3	29	9	3	42	1,0

Tabelle S7: Untersuchungsergebnis Boden AL sowie Boden AL mit HTK von Tag 0 (Zentralversuch), durchgeführt von der LUFA Speyer (Methoden VDLUFA Bd. 1 A 6.1.4.1 und A 2.1.1).

	Tiefe [cm]	pH	Phosphat (P ₂ O ₅)	Kalium (K ₂ O)	Magnesium (Mg)	Stickstoff (N)	Humus [%]
			[mg/100g feldfrischer Boden]				
AL Boden	0-30	6,5	121	23	11	159	2,6
AL Boden + Gülle	0-30	6,4	135	31	13	186	2,9
AL Boden + HTK Kopfsalat	0-30	6,6	113	36	14	174	2,7
AL Boden + HTK Feldsalat	0-30	6,7	141	44	13	188	2,8