

Foto: Biofilm von *Salmonella enterica* am Pflanzenhaar (Trichom) © Michel Schrader (JKI) und Michael Müssen (HZI)

Abschlussbericht *plantinfect-2*

FKZ: 2819HS002-5

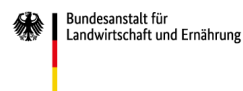
Justus-Liebig-Universität Gießen
Universität Osnabrück
Universität Hohenheim
IGZ, Leibniz-Institut für Gemüse
und Zierpflanzenbau Großbeeren

Gefördert durch



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Projekträger



Zuwendungsempfänger: Justus-Liebig-Universität Gießen Universität Osnabrück Universität Hohenheim Leibniz-Institut für Gemüse und Zierpflanzenbau (IGZ), Großbeeren	Förderkennzeichen: 2819HS002-5
Vorhabensbezeichnung: Aufnahme von Humanpathogenen in Kulturpflanzen (<i>plantinfect-2</i>)	
Laufzeit des Vorhabens: 01.09.2019 bis 31.12.2022	
Berichtszeitraum: 01.09.2019 bis 31.12.2022	
Koordination: Dr. Jasper Schierstaedt	
Dieses Projekt wurde gefördert aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages. Das Projekt wurde von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), bewilligt und betreut. Förderkennzeichen 2819HS002 bis 5.	

Der Abschlussbericht wurde von allen Partnern des *plantinfect-2* Konsortiums verfasst, die Verantwortung für den Inhalt der entsprechenden Arbeitspakete liegt bei den Projektpartnern.

Inhaltsverzeichnis

1	Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	5
1.1	Planung und Ablauf des Vorhabens.....	6
1.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	7
1.2.1	Stand der Forschung.....	7
1.2.2	Eigene Vorarbeiten der Projektteilnehmer, Phase 1: <i>plantinfect</i>	9
2	Material und Methoden	12
2.1	Einfluss der Bodeneigenschaften, Anbaupraxis und weiterer Faktoren auf das Überleben von Humanpathogenen in landwirtschaftlich genutzten Böden (AP1).....	12
2.1.1	Routinemäßige Kultivierung von Bakterienstämmen	12
2.1.2	Kultivierungsabhängige Quantifizierung von Salmonellen im Boden.....	12
2.1.3	Untersuchung der prokaryotischen Gemeinschaft im Boden.....	12
2.1.4	Deletionsmutagenese	13
2.1.5	Überleben von EHEC im Boden in Abhängigkeit von Risikofaktoren	13
2.1.6	Transkriptom von EHEC in Abhängigkeit von Verweildauer und Temperatur	14
2.2	Einfluss der Anbaupraxis auf die Anzahl und Dauer der im Boden vorhandenen Humanpathogene, ihrer Motilität sowie Fähigkeit an Bodenpartikel anzuhaften und die Pflanze zu besiedeln (AP2).....	15
2.2.1	Überlebensrate von Salmonellen im hydroponischen System und im Boden.....	15
2.2.2	Nachweis von HPB in der Phyllosphäre von Kopf- und Feldsalat.....	16
2.2.3	Anzucht von Salmonellen auf Gülle basierendem Medium.....	16
2.2.4	Sterilisation des Saatgutes.....	16
2.2.5	Wachstumsbedingungen für <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.2.6	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.2.7	Pflanzenanzucht im hydroponischen System	17
2.2.8	Nachweis von Salmonellen in der Rhizosphäre von Kopfsalat und Feldsalat im hydroponischen System	18
2.2.9	Anzucht von Kopfsalat im Boden	19
2.2.10	Nachweis von Salmonellen in der Rhizosphäre und im Boden.....	19
2.2.11	Besiedlung von Kulturpflanzen durch EHEC.....	20

2.3	Einfluss des Ernährungszustands und der Temperatur auf die Besiedlung der Pflanze mit <i>Salmonella enterica</i> (AP3).....	21
2.3.1	Pflanzenanzucht und Inokulation von <i>Salmonella enterica</i>	21
2.3.2	ROS-Eisen-Versuch.....	21
2.3.3	Einfluss der Temperatur auf die Besiedlung von Pflanzen mit Salmonellen.....	21
2.3.4	Proteomanalysen von <i>Salmonella</i> in Abhängigkeit von der Temperatur	22
2.3.5	Analyse der Motilität von <i>S. enterica</i> Typhimurium mittels Schwimmagarplatten ...	22
2.3.6	Visualisierung der Flagelle mittels <i>flagella stain</i>	22
2.3.7	Transmissionselektronenmikroskopie zur detaillierten Analyse der Flagelle	23
2.3.8	Strukturelle Analyse der Flagellen	23
2.3.9	Motilitätsanalysen in flüssigen Medien	24
2.3.10	Adhärenz an MDCK-Zellen	24
2.3.11	Adhärenz von <i>Salmonella</i> an Blätter von Kopfsalat	24
2.3.12	Kultivierungs-unabhängige Quantifizierung von Salmonellen	25
2.4	Untersuchung der generationenübergreifenden Übertragung von Salmonellen.....	25
2.5	Erwerb von Antibiotika-Resistenzgenen durch Humanpathogene.....	26
2.6	Übersicht über verwendete Materialien.....	26
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Einfluss der Bodeneigenschaften, Anbaupraxis und weiterer Faktoren auf das Überleben von Humanpathogenen in landwirtschaftlich genutzten Böden (AP1).....	28
3.1.1	Überleben von <i>S. enterica</i> in Abhängigkeit von Bodenart und Bewirtschaftung	28
3.1.2	Überlebensrate von EHEC im Boden in Abhängigkeit von Temperatur und Bodentyp.....	34
3.1.3	Überleben von EHEC im Boden in Abhängigkeit von Temperatur und Bodentyp und Güllezugabe.....	35
3.1.4	Einfluss von RpoS und FliC auf das Überleben von <i>E. coli</i> O104:H4 C227/11Φcu im Boden.....	36
3.2	Einfluss der Anbaupraxis auf die Anzahl und Dauer der im Boden vorhandenen Humanpathogene, ihrer Motilität sowie Fähigkeit an Bodenpartikel anzuhaften und die Pflanze zu besiedeln (AP2).....	38
3.2.1	Überlebensrate von <i>Salmonella</i> -Serovaren im DS-Boden.....	38

3.2.2	Besiedlung von Kopfsalat in Abhängigkeit vom <i>Salmonella</i> -Serovar.....	39
3.2.3	Adaptation der Salmonellen an die Bedingungen während der Tierproduktion	42
3.2.4	Besiedlungsrate von <i>Salmonella</i> in der Rhizosphäre von Feld- und Kopfsalat im hydroponischen System im Vergleich zur Kultivierung im Boden.....	43
3.2.5	Transkriptomanalyse	50
3.2.6	Etablierung einer mTn5-Mutantenbank zur Ermittlung von essenziellen genetischen Faktoren für <i>Salmonella</i> in hydroponischer Anzucht	56
3.2.7	Besiedlung von Kulturpflanzen durch EHEC.....	57
3.3	Rolle des Ernährungszustands und der Temperatur auf die Besiedlung der Pflanze (AP3).....	58
3.3.1	Einfluss von pflanzlichem Nährstoffmangel auf die Kolonisierung und Persistenz von <i>Salmonella enterica</i>	59
3.3.2	Einfluss von Kalkung auf das Überleben von <i>Salmonella enterica</i>	65
3.3.3	Einfluss der Temperatur auf die Persistenz von <i>S. enterica</i> in Blättern von Kopfsalat.....	71
3.3.4	Einfluss der Temperatur auf die Besiedlung von Salat durch Humanpathogene....	74
3.4	Generationenübergreifende Übertragung von Humanpathogenen (AP4).....	84
3.5	Erwerb von Antibiotika-Resistenzgenen (AP5)	86
4	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse (FDMP).....	88
4.1	Projektrelevante Publikationen.....	90
5	Zusammenfassung	91
6	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	93
7	Literaturverzeichnis.....	96
8	Anhang	98

Ziele

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Infektionen mit humanpathogenen Bakterien (HPB) wie *Salmonella enterica* und *Escherichia coli*-Stämmen wie z.B. enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) stellen ein ernstes Problem für die Gesundheit des Menschen dar. Diese Erreger sind für eine zunehmende Anzahl von durch Lebensmittel übertragenen Infektionen verantwortlich, z.B. nach Verzehr von kontaminiertem rohem Gemüse oder Obst. Weltweit sind jährlich schätzungsweise 150 Millionen Infektionen beim Menschen auf verschiedene *S. enterica*-Serovare zurückzuführen, die ca. 1 Million Todesopfer fordern. Obwohl EHEC-Infektionen zahlenmäßig hinter *S. enterica*-Infektionen zurückbleiben, sind sie durch die schweren Krankheitsbilder von großer medizinischer Bedeutung. Landwirtschaftliche Nutztiere sind das Hauptreservoir dieser Krankheitserreger. Daher ist die Verwendung von Gülle als organisches Düngemittel für landwirtschaftliche Nutzflächen eine mögliche Eintragsquelle von HPB in Böden. Bei Präsenz von HPB im Boden können Kontaminationen der Pflanze über die Wurzel und bei Bewässerung oder starken Regenfällen durch Bodenspritzer der oberirdischen Pflanzenteile erfolgen. Nach Adhärenz besiedeln HPB die inneren Pflanzengewebe von Wurzel und Blätter.

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Überleben von HPB in Böden von mehr als 12 Wochen nicht ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass von einem aktiven Besiedlungsprozess der Pflanze durch HPB auszugehen ist. Verfügbare Nährstoffe und die autochthone mikrobielle Gemeinschaft im Boden spielen für das Überleben als auch für mögliche pflanzliche Kontaminationen eine wichtige Rolle. HPB konkurrieren mit den im Boden vorkommenden Mikroorganismen um die vorhandenen Nährstoffe und beeinflusst damit deren Persistenz im Boden bzw. pflanzlichen Produktionssystem. Darüber hinaus sind Umgebungsbedingungen, insbesondere die Temperatur von Bedeutung für die Überlebensrate von HPB im Boden und in Pflanzen. Die Aufklärung des Eintrags von HPB aus organischen Düngern in den Boden und der Mechanismen der nachfolgenden Besiedlung der Pflanze waren Schwerpunkte des Projekts *plantinfect*. Das *plantInfect*-Projekt (2015-2018) lieferte dabei wichtige Erkenntnisse, die zu einem besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen HPB, Kulturpflanzen und organischer Düngung führten. Schwerpunkt des Projektes *plantinfect-2* war, die Kolonisierung der Pflanze durch HPB in Abhängigkeit von der Pflanzensorte, der Bodenmikrobiota (einschließlich Antibiotika-resistenter Bakterien), des Bodentyps und gegebenen Umweltbedingungen zu untersuchen. Berücksichtigt wurde dabei die pflanzliche Abwehr in Reaktion auf die Besiedlung mit HPB. Im Ergebnis des Projektes sollte geprüft werden, ob die derzeit geltenden Vorschriften der Düngeverordnung den bestmöglichen Verbraucherschutz gewährleisten.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Unter Berücksichtigung des One-Health-Konzepts, erfordert das Aufkommen von HPB an Pflanzen ein besseres Verständnis der Mechanismen bezüglich Besiedlung und Reaktion der Pflanze auf die Besiedlung mit HPB, um Interventionsstrategien entwickeln zu können, die eine erhöhte Lebensmittelsicherheit gewährleisten. Während die für eine Infektion von Menschen und Tieren mit HPB zugrundeliegenden Faktoren bereits gut charakterisiert sind, fehlen derzeit sowohl Kenntnisse zu den Mechanismen der Besiedlung von Kulturpflanzen durch HPB als auch Kenntnisse zur Reaktion des pflanzlichen Immunsystems auf eine Besiedlung mit HPB. Ziel des Projekts *plantinfect-2* war es, diese Aspekte unter Berücksichtigung des Eintrages von HPB über organische Dünger in den Boden sowie die mikrobielle Gemeinschaft des Bodens zu untersuchen.

Auf der Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse werden Präventionsstrategien zur Vermeidung von Kontaminationen von pflanzlichen Produkten mit HPB aufgezeigt, um die Lebensmittelsicherheit entscheidend zu verbessern und so Infektionen des Menschen mit HPB zu verhindern. Das Projekt basierte auf einer sich bereits bewährten, sehr erfolgreichen Zusammenarbeit zwischen staatlichen und universitären Forschungsinstituten sowie auf Interaktionen mit nationalen (AG Humanpathogene auf Kulturpflanzen) und internationalen (COST Action 16110) Gruppen. Das auf Initiative der AG Humanpathogene auf Kulturpflanzen gegründete *plantinfect*-Konsortium lieferte zahlreiche entscheidende Einblicke in die Mechanismen der Pflanzenbesiedlung durch HPB.

Plantinfect-2 umfasst 5 Arbeitspakete (AP, **Tabelle 1**):

1. Überprüfung der 12-Wochen-Regelung (AP1)
2. Vergleich der Besiedlungsraten in konventionellen und organischen Anbausystemen (AP2)
3. Identifikation des Einflusses der pflanzlichen Abwehrreaktion, bakterieller Motilität und Anhaftung sowie abiotischer Faktoren, z.B. Temperatur (AP3)
4. Bewertung des Risikos einer generationenübergreifenden Übertragung von HPB (AP4)
5. Erwerb von Antibiotika-Resistenzgenen durch HPB (AP5)

Tabelle 1: Zeitplan des *plantinfect-2* Projektes.

Arbeitspakete / Monate	1. Jahr		2. Jahr		3. Jahr	
	0-6	7-12	0-6	7-12	0-6	7-12
AP1						
AP2						
AP3						
AP4						
AP5						

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

1.2.1 Stand der Forschung

Der Verzehr von Obst und Gemüse ist für die menschliche Gesundheit von großer Bedeutung. Pflanzen sind natürlicherweise mit einer Vielzahl an Mikroorganismen assoziiert, die das Pflanzenwachstum fördern und/oder die Stresstoleranz der Pflanze gegenüber (a)biotischen Stress erhöhen können (Berg *et al.*, 2017). Zu den assoziierten Mikroorganismen gehören potenziell HPB, die in der Lage sind, pflanzliche Habitate zu besiedeln (van Overbeek *et al.*, 2014). In sehr seltenen Fällen besteht daher die Möglichkeit, dass mit pflanzlichen Produkten assoziierte HPB Infektionskrankheiten auslösen, insbesondere bei Verzehr von Frischeprodukten. Daher ist die Lebensmittelsicherheit bzw. Bereitstellung von nichtkontaminierten pflanzlichen Produkten von großer Bedeutung.

Lebensmittelbedingte Krankheiten wie lebensbedrohliche Durchfallerkrankungen (Francis *et al.*, 1999) werden am häufigsten durch Kontaminationen mit pathogenen *Escherichia coli* und Salmonellen Stämmen verursacht (EFSA und ECDC, 2017). Kontaminationen von Kulturpflanzen mit HPB können im Feld sowohl über die Wurzel als auch die oberirdischen Pflanzenteile z.B. durch Bodenspritzer bei Bewässerung oder starken Regenfällen erfolgen (Koukkidis und Freestone 2018). Nach Anhaften an pflanzliche Oberflächen besiedeln HPB anschließend endophytisch das Gewebe von Wurzeln oder Blättern. Ein aktiver Besiedlungsprozess ist hierbei sehr wahrscheinlich. Kontaminationen von Pflanzen können aber auch während der Ernte und nachfolgenden Verarbeitung bzw. entlang der gesamten Produktionskette erfolgen (Jacobsen und Bech, 2012).

Quellen und Mechanismen der Kontaminationen von pflanzlichen Produkten mit HPB sind jedoch oft unklar. Studien zeigen, dass HPB in verschiedenen ökologischen Nischen wie dem Boden überleben können (Brennan *et al.*, 2014; Jeschalke *et al.*, 2019). Eintragsquellen von HPB in den Boden stellen organische Dünger (Gülle, Gärreste, Klärschlamm) oder direkte Fäkalkontamination durch Vögel, Wild oder Mäuse dar (Brandl, 2006; Semenov *et al.*, 2010). Im Boden verfügbare Nährstoffe sowie die autochthone mikrobielle Gemeinschaft spielen für das Überleben von HPB im Boden eine wichtige Rolle (Schierstaedt *et al.*, 2020). Die im Boden vorkommenden Mikroorganismen, einschließlich der HPB, konkurrieren um Nährstoffe und die vorhandenen Nischen (Barak und Liang, 2008; Semenov *et al.*, 2010). Des Weiteren wird das Überleben von HPB im Boden neben dem Bodentyp und deren Mikrobiota, entscheidend von gegebenen Umgebungsbedingungen insbesondere der Temperatur beeinflusst (Locatelli *et al.*, 2013; Jeschalke *et al.*, 2019). Die Untersuchung des Einflusses von organischen Düngern für den Eintrag von HPB in den Boden und der Mechanismen des nachfolgenden Transfers zur Pflanze waren Schwerpunkte des Projekts *plantinfect*. Das *plantinfect*-Projekt (2015-2018) lieferte dabei wichtige Erkenntnisse, die zu einem besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen HPB, Kulturpflanzen und organischer Düngung führten, welche in **Abbildung 1** dargestellt sind.

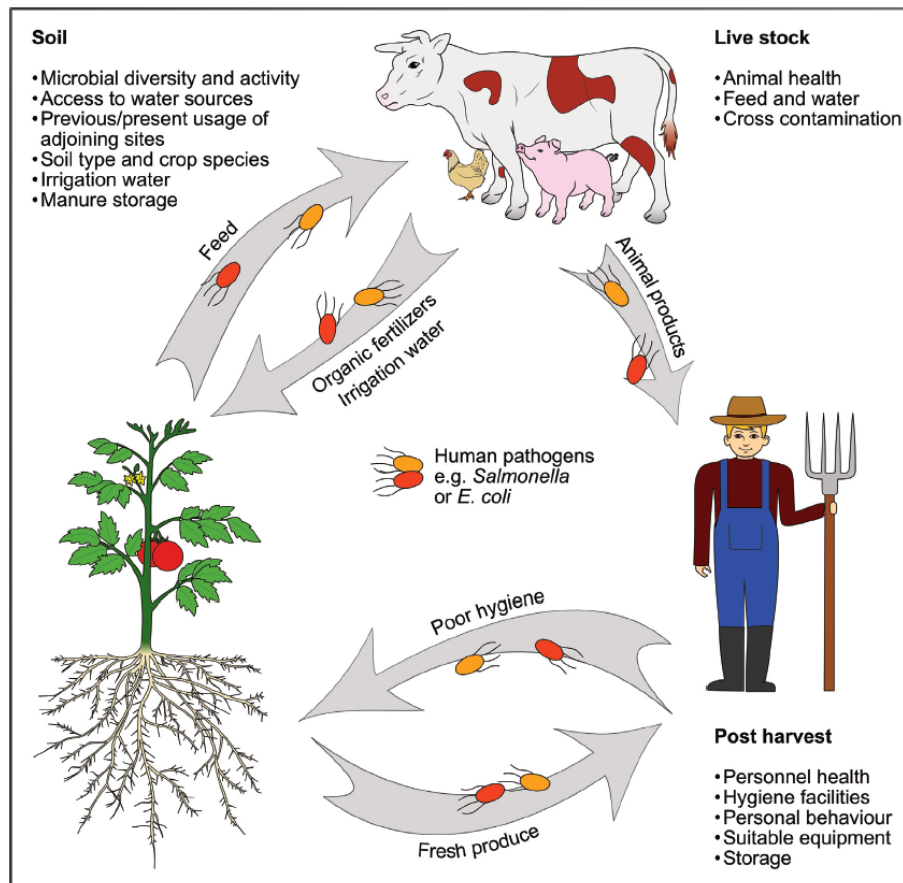


Abbildung 1: Übertragungswege von *Salmonella enterica* in der Umwelt, nach Schierstaedt *et al.* (2019). Pflanzen sind in die Verbreitung von HPB involviert. Das wachsende Bewusstsein für die Fähigkeit von HPB, Pflanzenwirte aktiv zu kolonisieren, eröffnet eine neue Sicht bezüglich der Ausbreitung von HPB in Ökosystemen und ergibt ein diversifiziertes Bild von potenziellen Infektionsquellen für den Menschen.

Es konnte gezeigt werden, dass HPB [z.B. Salmonellen und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)] in landwirtschaftlich genutzten Böden über einen längeren Zeitraum überleben können (Schierstaedt *et al.*, 2019). Die Dauer wird sowohl vom Bodentyp und dessen autochthoner mikrobieller Gemeinschaft als auch von der Übertragungsrouten beeinflusst. Erfolgt z.B. der Eintrag von HPB in den Boden über organischen Dünger, war eine längere Überlebensdauer der HPB im Boden, im Vergleich zu einem Eintrag über Beregnungswasser, zu verzeichnen. Eine hohe mikrobielle Diversität reduziert deutlich die Persistenz von HPB im Boden (Locatelli *et al.*, 2013; Schierstaedt *et al.* 2020). Auch scheint es einen positiven Zusammenhang zwischen der Persistenz und der Anpassungsfähigkeit der HPB und deren Fähigkeit die Pflanzen zu besiedeln zu geben (**Abb. 1**). Des Weiteren zeigte sich, dass nur ein Teil der Pflanzenpopulation besiedelt wird. Es ist davon auszugehen, dass mit HPB besiedelte Pflanzen eine höhere Anfälligkeit gegenüber den HPB aufweisen im Vergleich zu Pflanzen, die nicht von HPB infiziert wurden. Es ist daher zu klären, welche Faktoren die Anfälligkeit/Resistenz einer Pflanze gegenüber HPB bestimmen und ob/wie internalisierte HPB sich von den Wurzeln in die Blätter bewegen können.

Derzeit gibt es keine Kenntnisse dazu, wie landwirtschaftliche Praktiken (Bodenbearbeitung, Bewässerungsweise, Düngung usw.) das Überleben von HPB im Boden und die Besiedlung von Pflanzen beeinflussen.

Pflanzenproduktionssysteme stellen keine homogenen Umgebungen dar, und weisen eine Vielzahl ökologischer Nischen auf, wie z.B. die Oberflächen von Bodenpartikeln (Tonminerale), Wurzeln oder Blättern. Nicht nur die Persistenz von HPB in diesen Nischen kann sich unterscheiden, sondern auch deren autochthone Mikrobiota (Babin *et al.*, 2021), einschließlich ihrer Resistenzeigenschaften z.B. gegenüber Antibiotika oder Schwermetallen, die damit zusätzliche Einflussfaktoren darstellen. Mikroorganismen mit Antibiotikaresistenzen sind häufig Bestandteil von organischen Düngemitteln. In einer kürzlich erschienenen Studie wurde gezeigt, dass Salatpflanzen sowohl ein Reservoir von multiresistenten *E. coli* als auch einer großen Diversität von durch horizontalen Gentransfer übertragbaren Resistenzplasmiden aufweisen können (Blau *et al.*, 2018). Die Aufnahme von Antibiotikaresistenzgenen durch HPB in pflanzlichen Produktionssystemen stellt somit ein potentiell Risiko für die menschliche Gesundheit dar. Die Wirksamkeit von Antibiotika ist für eine Vielzahl an derzeitigen medizinischen Behandlungen von großer Bedeutung. Das Auftreten von multiresistenten Erregern wurde bereits beim Menschen nachgewiesen, wodurch die Behandlung insbesondere schwer erkrankter Patienten erschwert oder unmöglich macht.

Das Projekt *plantinfect-2* befasste sich mit diesen Fragen und es wurde geprüft inwieweit relevante Erkenntnisse in den geltenden gesetzlichen Vorschriften zu berücksichtigt sind.

1.2.2 Eigene Vorarbeiten der Projektteilnehmer, Phase 1: *plantinfect*

Die JLU in Gießen (AG Kogel, Dr. Sven Jechalke) konnte im Projekt *plantinfect* zeigen, dass *S. enterica*-Stämme im Boden in Abhängigkeit vom Bodentyp für mehrere Wochen überleben können. In lehmigem Boden war eine längere Überlebensrate von *Salmonella* sp. im Vergleich zum sandigen Boden zu beobachten, die durch die Zugabe von organischem Dünger positiv beeinflusst wurde. Sowohl Kopfsalatblätter und Feldsalatblätter wurden von *S. enterica* besiedelt. Es ist davon auszugehen, dass die Besiedlung bzw. Internalisierung über die Wurzel erfolgt. Die Besiedlungsraten der Pflanzen mit HPB wurden durch Bodentyp, Pflanzenart und den Stamm von *S. enterica* beeinflusst. Im Durchschnitt war eine Besiedlungsrate der Kulturpflanzen von 0,5% bis 0,9% gegeben, wobei Kopfsalat im Vergleich zu Feldsalat eine höhere Besiedlungsrate aufwies. Des Weiteren waren Pflanzen, gewachsen in sandigem Boden, häufiger mit HPB besiedelt im Vergleich zu Pflanzen, kultiviert in lehmigem Boden. Nach der Inokulation bzw. Besprühen von Blättern mit einer Suspension von *S. enterica* konnten diese über mehrere Wochen an und in Blättern mittels kultivierungsabhängiger Verfahren nachgewiesen werden. Die Präsenz von *S. en-*

terica in/an der Pflanze mittels kultivierungsabhängiger Methoden wurde durch konfokale Mikroskopie unter Verwendung von GFP-markierten *S. Typhimurium* 14028s bestätigt. Mittels Transkriptomanalyse wurde der Reaktion von *S. Typhimurium* 14028s auf pflanzliche Metabolite untersucht, wozu die Kultivierung des Stammes auf Medium erfolgte, welches entweder mit Wurzel-exsudaten oder Metaboliten von Salat versetzt war. Die Ergebnisse zeigten eine Hochregulierung von Genen, die mit der Biofilmbildung und Virulenz assoziiert sind. In mit *S. Typhimurium* 14028s inokuliertem Kopfsalat wurden Genen hochreguliert, die sowohl mit der Immunantwort der Pflanzen als auch der Stressreaktion assoziiert sind. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass erfolgreiche Strategien zur Verhinderung von Ausbrüchen von mit Lebensmitteln assoziierten Krankheiten die Betrachtung des gesamten Pflanzenproduktionssystems voraussetzen, wie des Bodentyps, der Düngungsstrategie oder dem physiologischen Zustand der Kulturpflanze.

Das IGZ in Großbeeren (AG Grosch, Dr. Jasper Schierstaedt) hat im Projekt *plantinfect* gezeigt, dass das Überleben von Salmonellen im Boden von dessen mikrobieller Diversität deutlich beeinflusst wird. Eine hohe mikrobielle Diversität reduzierte signifikant die Überlebensrate von HPB im Boden. Diese mit kultivierungsabhängigen Methoden beobachteten Unterschiede in der Persistenz in Abhängigkeit von der mikrobiellen Diversität des Bodens, wurden mittels quantitativer PCR bestätigt. Mittels des kultivierungsabhängigen Nachweises wurde auch ausgeschlossen, dass die Salmonellen in nicht kultivierbaren Überdauerungsformen (VBNC) in relevanter Menge vorhanden waren. Hierbei stellt sich die Frage, ob Salmonellen sich an die Bedingungen im Boden anpassen können. Die Untersuchung des Transkriptoms von Salmonellen mittels RNA-Sequenzierung zeigte, dass tatsächlich eine Anpassung von *S. enterica* an die Bodenumgebung erfolgt. Die Regulation der Aminosäurebiosynthese und des Glyoxylatzyklus scheint für Anpassungsprozesse von Bedeutung zu sein. Des Weiteren war eine positive Beziehung zwischen mikrobieller Diversität im Boden und der Pflanzenreaktion zu beobachten. Eine erhöhte mikrobielle Diversität im Boden führte zu einer erhöhten induzierten Pflanzenreaktion mit negativem Einfluss auf die Besiedlung der Pflanze mit Salmonellen. Die Ergebnisse belegen, dass Salmonellen, auf Grund ihrer hohen physiologischen Plastizität, Kulturpflanzen und landwirtschaftliche Produktionssysteme als Lebensräume nutzen können. Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines ganzheitlichen Ansatzes zur Verringerung der Anzahl von lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen unter Berücksichtigung der Rolle des Boden-Mikrobioms.

Die Universität in Osnabrück - UOS (AG Hensel, Dr. Laura Elpers) untersuchte im Projekt *plantinfect* die bakteriellen Faktoren, welche die Besiedlung von Blattoberflächen von Feldsalat und Kopfsalat durch *Salmonella enterica* unterstützen. Hierzu wurden gezielt einzelne Adhäsionsfaktoren unter experimentell kontrollierten Bedingungen aktiviert und der Effekt auf die Bindung an Blattoberflächen quantifiziert. Dabei konnten Adhäsine identifiziert werden, die zu einer erhöhten Adhäsion an Feldsalat oder Kopfsalat beitragen. Die Adhäsion von HPB an Blattoberflächen erscheint von untergeordneter Bedeutung für die Besiedlung von Blattoberflächen von Salat. Es

wurde keine zentrale Rolle der Adhäsion an Blattoberflächen gefunden, und die Bedeutung der Bindung an Salatblätter erscheint untergeordnet. Als Faktor für die Besiedlung von Oberflächen wurden Flagellen identifiziert. Des Weiteren wurde der Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Expression diverser Adhäsionsfaktoren von Salmonellen mittels Proteomanalysen untersucht. Dabei wurden Gruppen von differentiell synthetisierten Proteinen gefunden, deren Abgleich mit den Transkriptomdaten des Projektpartners der Universität Gießen geplant ist.

Die Universität Hohenheim - UH (AG Schmidt, Dr. Kristina Eißenberg) hat im Projekt *plantinfect* fundamentale Erkenntnisse zur Kolonisierung von Wurzeln durch EHEC und hybriden EHEC/EAEC Bakterien erworben. So konnte gezeigt werden, dass *E. coli* O157:H7 Stämme unter Gewächshausbedingungen problemlos an den Wurzeln anhaften und in diese internalisieren können. Oberflächenproteine der EHEC sind für diese Prozesse von Bedeutung (Eißenberg *et al.*, 2018). Mit einem attenuierten Derivat des *E. coli* O104:H4 Ausbruchsstamms von 2011 konnte gezeigt werden, dass Salatsorte und Bodentyp die Adhärenz und Internalisierung beeinflussen. Auch konnten wir in den Böden und in der Phyllosphäre der verwendeten Salate eine signifikant unterschiedliche Mikrobiota nachweisen. Interessant war, dass das Überleben von *E. coli* O104:H4 Stamm C227-11Ø-cu in lehmigem Boden ab dem 7. Tag nach der Inokulation deutlich langsamer abnahm im Vergleich zu den *E. coli* O157 Stämmen. Eine differentielle Transkriptomanalyse hat gezeigt, dass bei Interaktion mit Pflanzenbestandteilen insbesondere Gene für Chemotaxis und Motilität differentiell reguliert sind. Die Änderung der Expression zeigt aber auch, dass der untersuchte Feldsalat Stressmerkmale aufweist, die auf Nährstoffmangel (z.B. Bildung von Glycerin) hindeuten. Glycerin kann wiederum von pathogenen *E. coli* metabolisiert werden und könnte damit einen Selektionsvorteil darstellen. Dies ist ein neuer Aspekt, der dringend weiter untersucht werden sollte. Die Möglichkeit Moleküle der Stressantwort von Pflanzen durch Krankheitserreger zu nutzen, ist bisher nicht untersucht.

Die Antragsteller verfügen über ein Set von isogenen EHEC-Mutanten, die im Rahmen des *plantinfect* Projektes generiert wurden und mit denen weiterführende Versuche bezüglich der möglichen Metabolisierung von pflanzlichen Sekundärmetaboliten durchgeführt werden können.

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Einfluss der Bodeneigenschaften, Anbaupraxis und weiterer Faktoren auf das Überleben von Humanpathogenen in landwirtschaftlich genutzten 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. Rifampicin, 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. Die in dieser Studie verwendeten Bakterienstämme sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

2.1.2 Kultivierungsabhängige Quantifizierung von Salmonellen im Boden

Um die Analysen in den verschiedenen Böden vergleichen zu können, wurde die maximale Wasserhaltekapazität (WHC_{MAX}) bestimmt. Die mit 2 mm gesiebten Böden wurden dazu zunächst bei 105°C über Nacht getrocknet und der Wassergehalt bestimmt. Die getrockneten Böden wurden bis zur Sättigung mit Wasser versetzt und aus der zugegebenen Menge Wasser die WHC_{MAX} der Böden berechnet. Basierend auf den Ergebnissen wurde eine Menge gesiebter Boden in 50 mL Zentrifugenröhrchen gefüllt die 30 g Trockengewicht entsprach. Zur Quantifizierung der Salmonellen in Böden (**Tabelle 6**), erfolgte eine serielle Verdünnung einer in 10 mM $MgCl_2$ resuspendierten Bodenprobe und anschließend eine Ausplattierung auf *Salmonella*-spezifischem Medium (XLD-Agar, 37°C, 24 h). Kolonien von Salmonellen verfärbten sich auf diesem Selektivmedium schwarz, was ihre Identifizierung erlaubt. Die erste Boden/ $MgCl_2$ -Suspension im Verhältnis 1:10 wurde zum Isolieren der Salmonellen aus dem Boden für 1 min 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 (KbE oder CFU „*Colony Forming Units*“) wurden auf 1 g Trockenmasse des Bodens zurückgerechnet. Die Effizienz der Methode wurde im Rahmen von *plantinfect* geprüft.

2.1.3 Untersuchung der prokaryotischen Gemeinschaft im Boden

Aus 0,5 g Bodenproben wurde die gesamte DNA extrahiert, mit Hilfe des Kits FastDNA Spin Kit

for Soil und dem GeneClean Spin Kit (MP Biomedicals, Heidelberg) aufbereitet und 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 µL PCR-Ansätzen waren 1 µL 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 MgCl₂, je 0,3 µM Primer 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) und Primer 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) enthalten (Caporaso *et al.*, 2011, Sundberg *et al.*, 2013).

2.1.4 Deletionsmutagenese

Um den Einfluss des Stress-assoziierten Gens *rpoS* sowie des Adhärenz-assoziierten Gens *fliC* auf die Persistenz von *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11Φcu in Lehmsandboden (DS) und Alluvial Lehm (AL) zu untersuchen, wurden isogene Deletionsmutanten mit der Methode zur Deletionsmutagenese nach Datsenko und Wanner hergestellt (Datsenko und Wanner, 2000). Hierbei kodiert *rpoS* für einen Sigmafaktor der RNA Polymerase, der mit der Transkription verschiedener Gene, die mit Metabolismus, Transport, Regulation und Stressmanagement assoziiert sind und *fliC* für die Flagellin-Untereinheit der Geißeln. Alle Deletionsmutanten wurden mit Hilfe eines rekombinanten Plasmids mit den entsprechenden klonierten Wildtypgenen komplementiert. Dafür wurde pBR322 verwendet, bei dem zuvor das Ampicillin-Resistenzgen gegen ein Chloramphenicol-Resistenzgen ausgetauscht wurde. Die Expression der klonierten Gene auf den zur Komplementierung verwendeten rekombinanten Plasmiden wurde zusätzlich durch Transkriptionsanalyse verifiziert. Für jeden Ansatz wurde eine Reverse Transkriptase-Negativkontrolle verwendet, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Die synthetisierte cDNA wurde durch PCR mit spezifischen Primern für *rpoS* und *fliC* analysiert. Die korrekte Amplifikation wurde über eine Agarosegelelektrophorese bestätigt.

Im Rahmen der Transkriptomanalyse wurde für die Untersuchung des Acetatmetabolismus mit der gleichen Methode eine *acs* Mutante von *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11Φcu hergestellt. Diese Mutante wurde auch für Persistenz-Versuche in AL-Boden verwendet.

2.1.5 Überleben von EHEC im Boden in Abhängigkeit von Risikofaktoren

2.1.5.1 Einfluss von Bodentyp und Temperatur

Um das Überleben von *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11Φcu in AL und DS zu untersuchen, wurden je 25 g Boden mit 10⁸ CFU pro Gramm Boden (CFU/g) gemischt und bei 4°C und 22°C inkubiert. Der Boden wurde dafür in einen 100 mL Polypropylen-Becher (Sarstedt) gegeben und auf

50% der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt (10 mM MgCl₂). Nach der Inokulation wurden die Becher geschlossen und gevortext, um eine gute Durchmischung der Proben zu gewährleisten. Je nach Ansatz wurden nach 0, 1, 4, 12, und 20 Wochen Bodenproben für die Bestimmung der Keimzahlen entnommen, serielle Verdünnungsreihen hergestellt und die Proben auf Selektivmedium ausplattiert. Verwendet wurde TBX Chromogener Agar (Carl Roth GmbH + Co. KG), der zur Identifikation, Detektion und Zählung von *E. coli* verwendet wird. Für jeden Ansatz wurden drei biologische Replikate hergestellt.

2.1.5.2 Einfluss von Güllezugabe

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss der Rindergüllezugabe auf das Überleben von EHEC in AL und DS untersucht. Die Gülle wurde vor Beimpfung der Bodenproben zugemischt. Dabei wurde die Menge in Abhängigkeit mit der in der Landwirtschaft zugelassenen Höchstmenge an Stickstoff (170 kg N/ha) berechnet. Die Rindergülle mit entsprechenden Angaben zum N-Gehalt wurde vom Standort Meiereihof mit Kleinhohenheim (Universität Hohenheim) zur Verfügung gestellt. Auch hier wurden die Proben unter den vorher beschriebenen Bedingungen inkubiert und für jeden Ansatz drei biologische Replikate angesetzt.

2.1.5.3 Einfluss von bakteriellen Faktoren

Um den Einfluss von bakteriellen Determinanten für die Persistenz von EHEC im Boden zu untersuchen, wurden isogene Deletionsmutanten in bestimmten Genen hergestellt. Im Rahmen der Versuche sollte der Einfluss von RpoS und der Flagellen untersucht werden. Damit sollte der Einfluss von spezifischen Adhärenzfaktoren und der generellen Stressantwort geklärt werden. Mit dem bereits für den Wildtyp etablierten Modellversuchsaufbau wurde das Überleben von *E. coli* O104:H4 C227/11Φcu Δ*fliC* und *E. coli* O104:H4 C227/11Φcu Δ*rpoS* sowie von deren Komplementanten in Abhängigkeit von Bodentyp und Temperatur nach 1, 4, 8 und 12 Wochen untersucht.

2.1.6 Transkriptom von EHEC in Abhängigkeit von Verweildauer und Temperatur

Um die molekulare Anpassung des EHEC/EAEC Stamms zu untersuchen, wurde eine differentielle Transkriptomanalyse durchgeführt. Hierbei sollte die Anpassung von *E. coli* O104:H4 C227/11Φcu an die Bedingungen eines landwirtschaftlichen Bodens über die Expression habitat- und temperaturspezifischer Gene untersucht werden. Da dieser Stamm das beste Überleben in AL-Boden bei 4°C zeigte, wurde der Versuch unter diesen Bedingungen für die geplanten Transkriptomanalysen durchgeführt. Zusätzlich wurde für die Studie autoklavierter AL-Boden verwendet, da in einem vorangegangenen Pilotexperiment festgestellt wurde, dass der messbare Anteil

von *E. coli* RNA in nicht-autoklaviertem Boden zu gering ist (ca. 2-3%). Autoklavierter AL-Boden wurde mit 10^9 CFU/g Boden an *E. coli* beimpft und bei 4°C inkubiert. An festgelegten Zeitpunkten (0, 1 und 4 Wochen) wurden Proben entnommen und für eine RNA-Isolierung mit dem „RNeasy PowerSoil Total RNA Kit“ von Qiagen verwendet. Für jeden Zeitpunkt wurden zwei biologische Replikate erstellt. Die RNA-Proben wurden nach einem DNase-Verdau auf ein denaturierendes Agarosegel geladen, um die Integrität und Qualität der RNA zu überprüfen. Die weiteren Schritte wurden dann vom „Zentrum für Quantitative Biologie (QBiC)“ (Universität Tübingen) als Auftragsleistung durchgeführt. Für die rRNA-Depletion und für die Erstellung einer cDNA-Bibliothek wurde das „Illumina™ Stranded Total RNA Prep Ligation with Ribo Zero Plus Kit“ (Illumina) eingesetzt. Die cDNA Bibliothek wurde mit dem NextSeq500 System (Illumina) sequenziert. Differentiell regulierte Gene wurden mittels Bioconductor R Paket DESeq2 v1.20.0 bestimmt. Die bioinformatische Grundausswertung der Daten wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Kay Nieselt (Universität Tübingen) durchgeführt.

2.2 Einfluss der Anbaupraxis auf die Anzahl und Dauer der im Boden vorhandenen Humanpathogene, ihrer Motilität sowie Fähigkeit an Bodenpartikel anzuhafte und die Pflanze zu besiedeln (AP2)

2.2.1 Überlebensrate von Salmonellen im hydroponischen System und im Boden

Die Analyse zum Überleben von *Salmonella* fand in den hydroponischen Nährlösungen für Feldsalat und Kopfsalat sowie in PBS (*phosphate-buffered saline*) und in PBS in Boden statt. Es wurden mit Hilfe von Übernachtskulturen von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) 3,5 h Subkulturen (1:31) in LB bei 37°C unter aeroben Bedingungen kultiviert. Diese wurden bei 8000 g für 5 min. pelletiert, der Überstand verworfen, das Bakterienpellet im entsprechenden Medium in der jeweiligen hydroponischen Nährlösung oder PBS re-suspendiert und erneut bei 8000 g für 5 min. pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet erneut in der jeweiligen hydroponischen Nährlösung oder PBS re-suspendiert. Die optische Dichte OD_{600} wurde ermittelt und die gewaschenen Bakterien entsprechend der Startinokula $1.5 \cdot 10^8$; $1.5 \cdot 10^7$; $1.5 \cdot 10^6$; $1.5 \cdot 10^5$ und $1.5 \cdot 10^4$ pro mL in der jeweiligen Nährlösung oder PBS re-suspendiert. Als Kontrolle dienten die Nährlösungen und PBS ohne Bakterien. Jeweils 1 mL der jeweiligen Startinokula wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt, sodass für jeden Zeitpunkt ein Reaktionsgefäß zur Verfügung stand. Für die Analyse des Überlebens von *Salmonella* in Boden wurden zu 0,5 g dreifach autoklaviertem Boden in einem 2 mL Reaktionsgefäß 600 µL Bakterienlösung der verschiedenen Startinokula in PBS zugegeben und mittels Vortexer vermischt. Die Inkubation erfolgte bei 20°C. Die verschiedenen Ansätze wurden entsprechend in PBS verdünnt und auf MH-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert um die CFU/mL zu bestimmen. Für die Analyse der Überlebensrate von Salmonellen in Boden, wurde 1 mL PBS zugeführt, Boden und

PBS mittels Vortexer vermischt und für 1 min. bei 1.000 g zentrifugiert, um die schweren Bestandteile des Bodens zu pelletieren, wohingegen die leichten Bestandteile des Bodens auf der flüssigen Interphase schwammen, welche die Bakterien enthielt. Die verschiedenen Ansätze wurden entsprechend in PBS verdünnt und auf MH-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert um die CFU/mL zu bestimmen.

2.2.2 Nachweis von HPB in der Phyllosphäre von Kopf- und Feldsalat

Zum systemischen Nachweis von Salmonellen in der Phyllosphäre (Blättern) von Kopf- und Feldsalat wurde im Rahmen von *plantinfect* eine neue Methode etabliert. Zunächst erfolgte eine unspezifische Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser (37°C, 18-20 h, 100 rpm), gefolgt von einer Ausplattierung auf selektivem Medium (XLD-Agar, 37°C, 24 h) sowie einer weiteren Inkubation in *Salmonella*-spezifischem RVS-Medium (41,5°C, 24 h) und einer nachfolgenden Ausplattierung auf XLD-Agarplatten. 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.

2.2.3 Anzucht von Salmonellen auf Gülle basiertem Medium

Das Güllemedium wurde auf ähnliche Weise wie das Salatmedium (*plantinfect*) hergestellt, wobei das Salatfiltrat durch Gülle ersetzt wurde. Das Güllemedium bestand zu 25% (v/v) aus Gülle, dem 2% konzentriertes Agarmedium zugesetzt wurde, um eine Endkonzentration von 1% Agar zu erreichen. Die Mischung wurde mit 5x M9-Salzen sowie Rifampicin (50 µg/mL) ergänzt.

2.2.4 Sterilisation des Saatgutes

Zur Anzucht von Kopfsalat-Pflanzen wurden das pillierte Saatgut von ihrer Hüllmasse befreit und dazu dreimal mit sterilisiertem Wasser gewaschen. Zur Oberflächensterilisation wurde anschließend das Saatgut von Kopfsalat und das von *Arabidopsis* für 4 min in 3% NaClO inkubiert. Das Saatgut von Feldsalat wurde zur Oberflächensterilisation für 1 min mit 70% EtOH behandelt und nachfolgend für 2 min mit NaClO. Nach der Oberflächensterilisation wurde das Saatgut viermal mit sterilisiertem Wasser gewaschen und anschließend für die entsprechenden Versuche verwendet oder für 30 min luftgetrocknet.

2.2.5 Wachstumsbedingungen für *Arabidopsis thaliana*

Zur Prüfung der Pathogenität von *Salmonella* an *A. thaliana* unter Gewächshausbedingungen wurden 2 Wochen alte Keimlinge in Töpfe mit einer Mischung (2:1) aus Perlit und Substrat umgetopft und weitere 4 Wochen unter Kurztagsbedingungen bei einer Photoperiode von 8 h zu 16 h (hell/dunkel) bei 22°C kultiviert.

Zur Inokulation der Pflanzen mit *Salmonella* wurden die Blätter mittels einer nadellosen Spritze mit dem *S. Typhimurium* Stamm 14028s (*S. Typhimurium* 14028s) infiltriert. Von jedem Blatt wurden 0 und 7 Tage nach der Infiltration vier Blattscheiben mit einem Durchmesser von 5 mm ausgestanzt. Die Blattscheiben wurden in 10 mM MgCl₂ homogenisiert, verdünnt und auf XLD-Agarplatten, die Rifampicin enthielten, plattiert, um die Anzahl der koloniebildenden Einheiten zu ermitteln.

2.2.6 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die oberflächensterilisierten Samen von *Arabidopsis*-Wildtypen Col-0 und Wassilewskija einschließlich der Mutanten wurden auf ½ MS-Agar angezogen. Nach der Keimung wurde die 2 Wochen alten *Arabidopsis*-Keimlinge in sterile Gläser mit ½ MS-Agar (2,2 g MS-Medium inklusive Vitamine, Duchefa Biochemie #M0222; 10 g Agar; 0,5 g MES pro Liter; pH 5,4) umgesetzt. Nach weiteren 3 Wochen wurden die Keimlinge auf ein Pflanzenwachstumsmedium ohne FeNa-EDTA zur Simulation von Eisenmangel übertragen. Nach einer Woche wurde *S. Typhimurium* 14028s mit einer OD₆₀₀ von 0,1 auf die Blätter gesprüht. Die Dichte von *Salmonella* auf/in den Blättern wurde anschließend mittels Blattscheibentest und Ausplattieren auf Selektivmedium über einen Zeitraum von 2 Wochen ermittelt.

2.2.7 Pflanzenanzucht im hydroponischen System

Zur Anzucht von Pflanzen in einem hydroponischen System wurde zwei Methoden entwickelt. Das oberflächensterilisierte Saatgut von Kopfsalat wurde auf ½ MS-Agar in sterilisierten Reaktionsgefäßen (100 mL Volumen) ausgelegt, welche in sterilen Kunststoffbehältern mit Luftfilter (runde Ausführung 140 mm; Duchefa Biochemie #E1674), gefüllt mit etwa 200 mL ½ MS-basierter hydroponischer Nährlösung (2,2 g MS-Medium inklusive Vitamine, Duchefa Biochemie #M0222; 0,5 g MES pro Liter; pH 5,4), gestellt wurden. Die Anzucht erfolgte für 6 Wochen bei 20°C mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h. Die Wurzeln der sich entwickelnden Salatpflanzen wuchsen während dieser Zeit in die hydroponische Nährlösung, welche die Pflanzen mit Nährstoffen versorgte.

In der zweiten Methode, welche die Kultivierung von einzelnen Pflanzen erlaubte, erfolgte die Keimung der Samen in 0,5 mL Reaktionsgefäßen, gefüllt mit ¼ MS-Agar und Vitaminen sowie

Saccharose, die in sterilen Kunststoffbehälter mit 700 mL ¼ MS Medium gestellt wurden. Die weitere Anzucht erfolgte für ebenfalls bei 20°C mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h.

In beiden Systemen wurden die Wurzeln der Pflanzen mit einer Bakteriensuspension behandelt und nachfolgend die Besiedlungsrate bestimmt.

Die Anzucht von Feldsalat wurde in gleicher Weise wie oben für Kopfsalat beschrieben vorgenommen.

2.2.8 Nachweis von Salmonellen in der Rhizosphäre von Kopfsalat und Feldsalat im hydroponischen System

Für die Ermittlung der Besiedlungsdichte von Salmonellen in der Rhizosphäre von Kopf- und Feldsalat in hydroponischer Kultur wurden zur Inokulation der Pflanzen über Nacht Kulturen von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SR11 Δ12 und SR11 Δ12 Δ*fliC* Δ*fljB* 1:31 in LB verdünnt und für 3,5 h aerob bei 37°C subkultiviert. Die OD₆₀₀ wurde bestimmt und pro Pflanze 150 mL der entsprechenden hydroponischen Nährlösung mit der Subkultur inokuliert (1*10⁶ CFU/mL). Diese inokulierten 150 mL Nährlösung wurden in neue sterile Kunststoffbehälter überführt und jeweils eine Salatpflanze (Kopfsalat 4 Wochen alt; Feldsalat 8 Wochen alt) in dieser Nährlösung kultiviert. Aus dem bisherigen Kunststoffbehälter wurde als Kontrolle 1 mL der Nährlösung entnommen und auf MH-Agarplatten ausplattiert (Sterilkontrolle Pflanzenanzucht). Die für das Inokulum frisch eingesetzte nichtinokulierte hydroponische Nährlösung wurde ebenfalls ausplattiert (Sterilkontrolle hydroponische Nährlösung), als auch das verwendete Inokulum selbst. Die Inkubation erfolgte bei 20°C und einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h. Nach einer Inkubationszeit von 1 h, 6 h und 24 h wurden Nährlösungsproben entnommen, um die Zelldichte von *Salmonella* zu ermitteln. Zur Bestimmung der Dichte von *Salmonella* in der Rhizosphäre wurden Wurzelproben entnommen, die dreimal in 1 mL PBS gewaschen wurden. Nach Erfassung der Wurzelmasse, wurde diese mit dem Pellet Pestle Motor in 600 µL 1% Desoxycholat/PBS homogenisiert. In PBS erfolgte die Erstellung von Verdünnungsreihen, die auf MH-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden, um anschließend die CFU/mL zu berechnen.

Für die Analyse der Kolonisierung der Rhizosphäre von Kopfsalat mit *S. Typhimurium* wurden die Keimlinge in hydroponischer Kultur in Plastikgefäßen kultiviert. Eine in LB über Nacht inkubierte Kultur von *S. Typhimurium* wurde 1:31 verdünnt und für 3,5 h aerob bei 37°C subkultiviert, die OD₆₀₀ bestimmt und 400 mL hydroponischer Nährlösung mit *S. Typhimurium* (OD₆₀₀ von 0,1) inokuliert, 1 mL des Inokulums wurden entnommen, in PBS verdünnt und auf MH-Agarplatten ausplattiert. Vier Wochen alte Kopfsalatpflanzen wurden in die neuen Gefäße mit *S. Typhimurium* inokulierter Nährlösung gesetzt. Aus dem bisherigen Gefäß wurde als Kontrolle 1 mL der Nährlösung entnommen und ausplattiert (Sterilkontrolle Pflanzenanzucht). Die für das Inokulum frisch

eingesetzte Nährlösung wurde ebenfalls ohne Inokulum auf MH-Agarplatten ausplattiert (Sterilkontrolle hydroponische Nährlösung) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Inkubation der Kopfsalatpflanzen erfolgte bei 20°C und einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h. Nach einer Inkubationszeit von 9 Tagen wurden die Wurzeln entnommen, dreimal mit 20 mL PBS gewaschen und deren Masse ermittelt. Ein mL des 9 Tage alten Inokulums wurden entnommen, entsprechend in PBS verdünnt und ausplattiert. Drei Wurzelproben wurden von der Wurzel abgetrennt, deren Masse bestimmt (etwa 0,01 mg bis 0,02 mg) und anschließend mit dem Pellet Pestle Motor in 600 µL 1% Desoxycholat/PBS homogenisiert. Die mittels PBS erstellten Verdünnungsreihen wurden auf MH-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert, um anschließend die CFU/mL zu berechnen.

2.2.9 Anzucht von Kopfsalat im Boden

Für die Anzucht von Kopfsalat im Boden wurde dreifach autoklavierter (121°C, 20 min) Boden verwendet, um den Einfluss des Mikrobioms auf die Kolonisierung der Rhizosphäre mit *Salmonella* auszuschließen. Es wurde ein Volumen von 300 mL dreifach autoklavierten Bodens in einen sterilen Kunststoffbehälter mit Luftfilter (runde Ausführung 140 mm; Duchefa Biochemie #E1674) überführt und mit 75 mL sterilem Leitungswasser angefeuchtet. Ein sterilisierter Kopfsalatsamen wurde pro Kunststoffbehälter ausgesät. Die Anzucht erfolgte bei 20°C mit 12 h/12 h Tag-Nacht-Rhythmus für 4 Wochen. Weitere Bewässerungen der Pflanzen waren nicht nötig, da es sich um ein geschlossenes System handelt.

2.2.10 Nachweis von Salmonellen in der Rhizosphäre und im Boden

Für die Analyse der Kolonisierung der Rhizosphäre von Kopfsalat mit *S. Typhimurium* wurden über Nacht Kulturen von *S. Typhimurium* 1:31 in LB verdünnt und für 3,5 h aerob bei 37°C subkultiviert. Die Zelldichte von *S. Typhimurium* wurde spektrometrisch bei OD₆₀₀ bestimmt, 10 mL PBS wurden mit der Subkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Die 10 mL Bakterienlösung wurde auf den Boden rund um die 4 Wochen alte Kopfsalatpflanze appliziert, wobei vermieden wurde die Phyllosphäre mit dem Inokulum in Kontakt zu bringen. Ein mL des Inokulums wurde entsprechend in PBS verdünnt und auf MH-Agarplatten ausplattiert. Zuvor wurde mit einem oberflächensterilisierten Löffel Boden aus dem Kunststoffbehälter der Pflanze entnommen, abgewogen, 1 mL PBS zugeführt, Boden und PBS mittels Vortexer vermischt und für 1 min bei 1.000 g zentrifugiert. Die so erhaltene Lösung wurde auf MH-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (Sterilkontrolle Boden). Das für das Inokulum eingesetzte PBS wurde ebenfalls ohne Inokulum ausplattiert. Die Inkubation der Kopfsalatpflanze erfolgte unter einer Pflanzenlampe bei 20°C in einem 12 h Tag- und 12 h Nacht-Rhythmus für 9 Tage. Nach 9 Tagen Inkubation wurde die Rhizosphäre von der Pflanze getrennt, dreimal mit 20 mL PBS gewaschen und abgewogen. Erneut

wurde mit einem oberflächensterilisierten Löffel Boden aus dem Kunststoffbehälter der Pflanze entnommen, abgewogen, 1 mL PBS zugeführt, Boden und PBS mittels Vortex-Mixer vermischt und für 1 min bei 1.000 g zentrifugiert. Die so erhaltene Lösung wurde auf MH-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (Inokulum in der Erde nach 9 Tagen). Es wurden drei kleinere Teile der Rhizosphäre abgetrennt und erneut gewogen (etwa 0,01 mg bis 0,02 mg). Anschließend wurden diese mit dem Pellet Pestle Motor in 600 µL 1% Desoxycholat/PBS homogenisiert. Verdünnungen wurden angefertigt, entsprechend in PBS verdünnt, auf MH-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert, um anschließend die CFU/mL zu berechnen.

2.2.11 Besiedlung von Kulturpflanzen durch EHEC

Um die endophytische Besiedelung von Kulturpflanzen mit EHEC zu untersuchen, wurden Salat-samen in MS-Agar sowie in autoklaviertem AL- oder DS-Boden kultiviert (**Abb. 2**). Der Boden bzw. der Agar wurde mit C227/11Φcu (10^8 CFU/mL) beimpft und bei 22°C sowie 12 h Tag/Nacht Rhythmus inkubiert. Nach 2, 4 und 8 Wochen wurde die Phyllosphäre (Blätter) abgeschnitten und auf eine Besiedlung durch C227/11Φcu untersucht. Der weitere Versuchsablauf kann **Abbildung 2** entnommen werden. Für alle Bedingungen wurden vier biologische Replikate mit je zwei technischen Replikaten erstellt.

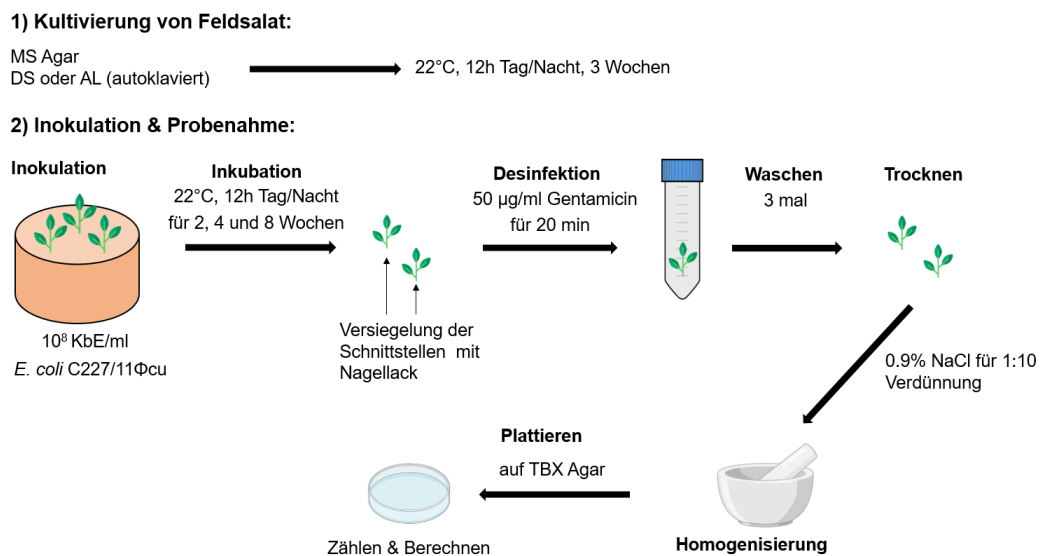


Abbildung 2: Ablaufplan der Besiedlungsversuche. Feldsalat wurden in autoklaviertem AL- und DS-Boden sowie in MS-Agar kultiviert und nach 3 Wochen wurde der Boden um die Pflanzen (Rhizosphäre) mit 10^8 CFU/ml Bakteriensuspension inokuliert und anschließend inkubiert. Nach dem Abschneiden der oberirdischen Pflanzenteile wurden die Schnittstellen versiegelt, die Pflanzen oberflächendesinfiziert, gewaschen und anschließend getrocknet. Nach dem Homogenisieren des Pflanzenmaterials wurde die Besiedlung mit dem getesteten EHEC-Stamm quantitativ, kulturabhängig untersucht.

2.3 Einfluss des Ernährungszustands und der Temperatur auf die Besiedlung der Pflanze mit *Salmonella enterica* (AP3)

2.3.1 Pflanzenanzucht und Inokulation von *Salmonella enterica*

Die Untersuchungen des Einflusses des Mikronährstoffs Eisen auf die Besiedlung mit Salmonellen erfolgte an Kopfsalat und *Arabidopsis thaliana*, Wildtyp und Mutanten die in Genen entscheidend für die Eisenaufnahme beeinträchtigt waren (**Tabelle 4**). Sterilisierte Samen (vgl. 2.2.3) wurden zunächst auf MS-Agar mit Fe-EDTA gekeimt. Nachfolgend wurden die *Arabidopsis*-Keimlinge in Medium mit oder ohne zusätzliche Eisen-Verbindungen umgesetzt. Die Kultivierung der Salatpflanzen erfolgte in hydroponischem System (siehe 2.2.4), wobei die Nährlösung ohne oder mit Eisen (40 μM FeEDTA) angereichert wurde. Zur Untersuchung der *Salmonella*-Zellzahl wurden Bakteriensuspensionen in die Blätter infiltriert und in regelmäßigen Abständen quantifiziert. Dazu wurden 4 Blattscheiben mit einem Durchmesser von 5 mm ausgestanzt, homogenisiert und verdünnt. Die Verdünnungen wurden in 10 μL auf das selektive Medium XLD pipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.2 ROS-Eisen-Versuch

Die Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in einer der ersten Reaktionen der Pflanze auf verschiedene Stressoren. In Reaktion auf die Behandlung mit Peptid flg22 (Flagellin Fragment) wurde die ROS-Produktion mit Hilfe von Luminol in relativen Fluoreszenzeinheiten (RLU) gemessen. Zunächst wurden Kopfsalat-Pflanzen steril auf $\frac{1}{4}$ MS Agar angezogen. Aus den Blättern der Pflanzen wurden nach 4 Wochen 5 mm große Blattscheiben ausgestanzt und in eine 96-well Platte mit 200 μL sterilem Wasser platziert. Die Blattscheiben wurden über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Wasser vorsichtig mit einer Spritze entfernt und durch eine „elicitor“ Lösung ersetzt. Diese Lösung besteht aus Meerrettich-Peroxidase (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Luminol (200 nM), Phosphatpuffer (5 mM, pH 8), Wasser und entweder einer Salmonellen-Suspension (OD_{600} 0,1) oder dem Peptid flg22 (100 nM). Mit Hilfe eines Luminometers wurden dann die RLU in jedem well über 20-60 min aufgenommen.

2.3.3 Einfluss der Temperatur auf die Besiedlung von Pflanzen mit Salmonellen

Samen von Kopfsalatpflanzen wurde in Substrat ausgesät und bei 20°C unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Die Pflanzung in Töpfe (300 mL) erfolgte ca. 5 Wochen nach der Aussaat. Zur anschließenden Behandlung mit Salmonellen wurden Suspensionen der Rifampicin-resistenten *S. enterica* Stämme in 10 mM MgCl_2 mit einer OD_{600} von 0.01 (entspricht ca. 10^7 CFU/mL) mit einer Spritze durch die Spaltöffnungen in die Blätter infiltriert. Jeweils zwei Blätter von 10 Pflanzen wurden so mit den *S. enterica* Stämmen infiltriert und im Gewächshaus bei 21°C, 28°C sowie

14°C kultiviert. Die Kontrolle der jeweiligen Temperaturvarianten umfasste 5 Pflanzen, die entsprechend nur mit 10 mM MgCl₂ infiltriert wurden. Nach 0, 7, 14, 21 und 28 Tagen wurden Pflanzenproben genommen und die Zahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) der Salmonellen in Blattausschnitten definierter Größe bestimmt. Dazu wurden pro Blatt vier Blattscheiben („leaf discs“) mit 5 mm Durchmesser ausgestanzt, in 10 mM MgCl₂ gemörsert und in einer Verdünnungsreihe auf XLD-Agar mit Rifampicin plattiert.

2.3.4 Proteomanalysen von *Salmonella* in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Bakterien wurden aerob in LB- oder PCN- (Phosphat-Kohlenstoff-Stickstoff; MOPS-gepuffertes Minimalmedium, pH 7,4, 1 mM Phosphat, 0,4% Glukose) Medium bei 37°C über Nacht angezogen. Für die Proteomanalysen wurden über Nacht Kulturen von *S. enterica* serovar Typhimurium Stamm NCTC 12023 verwendet, die in LB- oder PCN-Medien bei 37°C gewachsen waren. Die OD₆₀₀ wurden bestimmt und Subkulturen von 100 mL frischem LB-Medium oder PCN-Medium in 500 mL Schikane-Kolben auf eine OD₆₀₀ von 0,01 beimpft. Die Anzucht erfolgte in einem Inkubationsschrank (Innova42, Eppendorf) bei Temperaturen von 8°C bis 37°C mit orbitalem Schütteln bei 160 U/min. Es wurden Wachstumskurven angefertigt durch stündliches Messen der OD₆₀₀. Bakterien aus der späten logarithmischen Wachstumsphase wurde für die Proteomanalysen verwendet. Eine detaillierte und ausführliche Beschreibung der Methoden für die Proteomanalyse von *Salmonella* ist in Elpers et al. (2022) zu finden.

2.3.5 Analyse der Motilität von *S. enterica* Typhimurium mittels Schwimmagarplatten

Zur Untersuchung der Motilität von *Salmonella* wurden Schwimmagarplatten mit 0.3% (w/v) Agar verwendet, deren Zusammensetzung auf dem jeweiligen LB- oder PCN-Medium (1 mM Pi, pH 7,4) basierte. Die Mitte der Schwimmagarplatten wurden mit 1 µL der Subkultur (siehe 2.3.4) nach Anzucht bei 12°C und bei 37°C beimpft und sowohl bei 12°C, als auch bei 37°C aufrecht in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Durchmesser der Ausbreitung von *Salmonella* (Schwimmringe) wurden in regelmäßigen Zeitabständen gemessen. Als Kontrolle diente der Stamm *S. enterica* Typhimurium $\Delta fliC \Delta fljB$, welcher unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurde.

2.3.6 Visualisierung der Flagelle mittels *flagella stain*

Zur Visualisierung der Flagelle auf der Bakterienoberfläche wurde das Flagellenfilament mittels *flagella stain* angefärbt (modifiziertes Ryu Protokoll (Breakwell et al., 2009), bestehend aus Lösung 1: 20% Gerbsäure in gesättigter wässriger Lösung von AlK(SO₄)₂ * 12 H₂O, und Lösung 2: 12% (w/v) Kristallviolett in 95% EtOH; 10 Teile der Lösung 1 und ein Teil der Lösung 2 wurden gemischt, durch ein 0,2 µm-Filter filtriert und in kleinen Aliquoten bei RT gelagert). Bakteriellen

Subkulturen (siehe 2.3.4) wurden 1:2 in PBS verdünnt und 10 μL der Suspension auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen mit einem Durchmesser von 24 mm abgedeckt. Nach kurzem Antrocknen wurden 5 μL des *flagella stain* an den Rand des Deckgläschens gegeben, sodass sich der *flagella stain* unter das Deckgläschen zieht. Die gefärbten Bakterien wurden direkt mit einer Zeiss Axio Lab A1 und einer Bresser MicroCam SP 3.1 mit einem 100er Öl-Objektiv mikroskopiert. Die Bilder wurden mit dem Programm MicroCamLab II, Version x64, 3.7.8752, weiterverarbeitet.

2.3.7 Transmissionselektronenmikroskopie zur detaillierten Analyse der Flagelle

Zur Analyse der Oberflächendarstellung der Flagellen auf *Salmonella* oder zur strukturellen Analyse abgescherter Flagellen wurden Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskopie erstellt. Die Anzucht der jeweiligen Kulturen wurde wie in 2.3.4 beschrieben, durchgeführt. Das Abscheren der Flagelle erfolgte, wie in 2.3.8 beschrieben. Fünf μL der Subkultur wurden auf ein Formvar/Carbon Grid (100 Mesh, Cu beschichtet), bzw. 5 μL abgescherter Flagellen, aufgetragen, welches kurz zuvor mittels eines *EasiGlow* hinsichtlich der Oberflächenladung vorbehandelt wurde. Nach 5 min wurden nicht gebundene Bakterien mit Filterpapier abgezogen und 1 min mit 1% PTA gefärbt und anschließend mit MilliQ gewaschen. Die Aufnahmen wurden an einem Zeiss LEO 912 TEM angefertigt bei 80 kV. Die Auswertung der Bilder wurde in ImageSP durchgeführt. Die weitere Analyse der Flagelle hinsichtlich Länge, Durchmesser und Anzahl erfolgte mit Hilfe von FIJI (Schindelin *et al.*, 2012) und den Funktionen „*Straight Line*“ und „*Segmented Line*“.

2.3.8 Strukturelle Analyse der Flagellen

Für die strukturelle Analyse der Flagellen in der Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Flagellenfilamente von der Bakterienoberfläche abgeschert. Dazu wurde 100 mL Subkultur der entsprechenden Anzuchtbedingungen (siehe 2.3.4) verwendet. Die Bakterien wurden bei 2000 *g* bei 4°C für 20 min pelletiert, der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in insgesamt 25 mL TBS (*Tris-buffered saline*, pH 7,6) resuspendiert. Das Abscheren der Flagellenfilamente fand bei 4°C für 1 h mittels eines Magnetrührers statt (500 rpm). Zelltrümmer und verbliebende Bakterien wurden bei 4000 *g* bei 4°C für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde aufgefangen. Die Flagellenfilamente wurden durch Zugabe von 8,8 g Ammoniumsulfat zu 25 mL Überstand über Nacht bei 4°C gefällt. Die Flagellenfilamente wurden bei 20000 *g* bei 4°C für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet final in 500 μL TBS aufgenommen und für weitere Untersuchungen verwendet.

2.3.9 Motilitätsanalysen in flüssigen Medien

Zur Analyse der Motilität wurden Videoaufnahmen der schwimmenden Bakterien angefertigt. Dazu wurden die Subkulturen mit entsprechenden Anzuchtbedingungen (siehe 2.3.4) verwendet. Die OD₆₀₀ wurde ermittelt und die Bakterien in PBS auf eine OD₆₀₀ von 0,02 verdünnt. Im Weiteren wurde die Bakterienlösung 1:2 in PBS verdünnt und 200 µL in ein *well* eines µ-Slide 8 *well* (ibidi, #80806) gegeben und die Bakterien mittels Zeiss Axio Observer.Z1 mit 40er Objektiv und der CoolSNAP Kamera aufgenommen. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels FIJI (Schindelin *et al.*, 2012) und dem *plug-in TrackMate* (Ershov *et al.*, 2022). Die Durchschnittsgeschwindigkeit wurde direkt mittels *TrackMate* ermittelt, die Stopps wurden die Analyse der Abweichungen zwischen den einzelnen Aufnahmepunkten berechnet (Abweichung < 1,5 µm zwischen zwei Aufnahmepunkten).

2.3.10 Adhärenz an MDCK-Zellen

Die polarisierte Epithelzelllinie MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) wurde für Adhäsionsexperimente verwendet. Die MDCK-Zellen wurden in 24 *well*-Platten mit einer Menge von $1 \cdot 10^5$ Zellen/*well* ausgesät um nach einer Woche Anzucht und Differenzierung eine konfluente Schicht an polarisierten Epithelzellen von $5 \cdot 10^5$ Zellen/*well* zu erhalten. Die MDCK-Zellen wurden stets in MEM-Medium mit Penicillin und Streptomycin angezogen, einen Tag vor dem Experiment wurde auf MEM-Medium ohne Antibiotika gewechselt. Die MDCK-Zellen wurden 1 h vor Experimentbeginn mit Cytochalasin D behandelt zur Inhibition von Aktin-Polymerisation, um eine Invasion von Salmonellen in die Zellen zu verhindern. Die Infektion mit *S. enterica* serovar Typhimurium Stamm NCTC 12023, der in LB- oder PCN-Medium bei 12°C oder 37°C kultiviert wurden (siehe 2.3.4), wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5 eingesetzt. Nach 1 h wurden nicht-adhärenente Salmonellen durch Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die MDCK-Zellen mit 0,5% Desoxycholat in PBS lysiert. Adhärenente Salmonellen wurden durch Ausplattieren des Lysats auf MH-Agarplatten quantifiziert. Die Adhäsionsraten wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Inokulum bestimmt.

2.3.11 Adhärenz von Salmonella an Blätter von Kopfsalat

Eine detaillierte und visualisierte Durchführung des Adhäsionsexperimentes an Blättern von Salatpflanzen ist in Elpers & Hensel (2022) beschrieben. Für die Infektion von Kopfsalatblättern mit *Salmonella* wurden 4 Wochen alte Pflanzen verwendet, von denen definierte Blattbereichen mit einem Durchmesser von durchschnittlich 8 mm ausgestanzt wurden. Es wurden 48-*well*-Platten mit je einer Blattscheibe pro *well* verwendet, die durch sterile Edelstahleinlagen (Inlays) mechanisch fixiert wurden. Für jede Probe wurden drei Blattscheiben infiziert. Zur Infektion wurden über

Nacht Kulturen von den Bakterienstämmen 1:31 in LB verdünnt und für 3,5 h in Reagenzgläsern aerob kultiviert. Die Kulturen wurden in PBS verdünnt, um etwa $5,6 \cdot 10^7$ Bakterien/mL zu erhalten, 50 µL dieses Inokulums wurden auf jeweils eine Blattscheibe gegeben. Die Infektion erfolgte entweder für 1 h, RT oder 12°C unter statischen Bedingungen oder für 55 min, RT oder 12°C nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 500 g. Nach der Infektion wurden die Blattscheiben einmalig mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Bakterien zu entfernen. Drei Blattscheiben wurden in Reaktionsgefäße überführt und zwei weitere Male mit PBS durch kurzes Vortexen gewaschen. Pflanzengewebe wurde mit einem Pellet Pestle Motor in 600 µL 1% Desoxycholat in PBS homogenisiert und die CFU/mL durch Plattieren von seriellen Verdünnungen der Lysate auf MH-Agarplatten nach Inkubation bei 37°C über Nacht bestimmt. In jedem durchgeführten Experiment wurde eine nicht infizierte Probe verwendet, um die Sterilität des Kopfsalates zu überprüfen.

2.3.12 Kultivierungs-unabhängige Quantifizierung von Salmonellen

Zum Nachweis der Salmonellen durch Amplifikation *Salmonella*-spezifischer Gene in extrahierter Blatt-DNA wurde das in *plantinfect* etablierte quantitative PCR-Protokoll genutzt. Ziel war ein Vergleich der Ergebnisse in Bezug auf die Quantität der Salmonellen im Boden, erzielt mittels kultivierungsabhängigen 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 Blättern nach Herstellerangaben extrahiert und mit dem GeneClean Spin Kit (MP Biomedicals) aufgereinigt. Die Blatt-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 (TTAACCTTGTGGAGCATA-TTCG) 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). Der C_t -Wert des *Salmonella*-spezifischen *invA* wurde an dem ct -Wert von *Aktin* abgeglichen.

2.4 Untersuchung der generationenübergreifenden Übertragung von Salmonellen (AP4)

Um zu prüfen ob Salmonellen während der Vegetation über Blüten und somit Samen von Pflanzen weitergegeben werden, wurden Blüten von Bockshornklee, Kresse und Tomaten mit einer *Salmonella*-Suspension behandelt. Die Samen und Keimlinge der darauffolgenden Generation wurden auf Kontamination mit *Salmonella* überprüft.

Im ersten Schritt wurden die Blüten von Bockshornklee und Kresse mit *Salmonella*-Suspensionen (OD₆₀₀ von 0,1) besprüht oder in die Suspension gedippt. Anschließend wurden die Pflanzen bis zur Samenreife bei 20°C im Gewächshaus kultiviert. Die qualitative Auswertung erfolgte mittels RVS und XLD wie unter 2.2.2 beschrieben.

2.5 Erwerb von Antibiotika-Resistenzgenen durch Humanpathogene (AP5)

Verschiedene *Salmonella*-Stämme wurden zunächst in Böden mit oder ohne Gülle inokuliert. *Salmonella* wurde aus der Rhizosphäre extrahiert und auf verschiedene Antibiotikaresistenzen selektiert (**Tabelle 5**). Dann wurde ein *biparental mating* mit resistenten Salmonellen und *E. coli* CV601 durchgeführt, um resistenzvermittelnde Plasmide zu übertragen. Anschließend wurden die *E. coli*-Isolate auf das Vorhandensein von Plasmiden untersucht.

Schweinegülle, Halle Boden (+P +Mg, Z0 1 t CaO/ha) und BS1 Boden sowie die mit Gülle versetzten Böden wurden mit neun verschiedenen Rifampicin-resistenten Mutanten der *Salmonella*-Isolate (**Tabelle 2**) inokuliert. Für die Inokulation wurden die Salmonellen über Nacht auf LB-Agar mit 50 µg/mL Rifampicin bei 37°C inkubiert und die Zellen am nächsten Tag in 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Je 200 g der Böden und Böden mit Gülle wurden in 100 mL Pflanztöpfe abgewogen und mit 10⁷ CFU/g Boden der Salmonellen inokuliert, während 20 mL Gülle in 50 mL Röhren mit 10⁷ CFU/mL inokuliert wurden. In die Pflanztöpfe wurden jeweils zwei 4 Wochen alte Salatpflanzen umgesetzt und im Gewächshaus kultiviert. Nach einer Woche wurden 1 bis 2 g Boden in 9 mL 10 mM MgCl₂ homogenisiert und jeweils 100 µL auf Eosin-Methylenblau-Agar mit 50 µg/mL Rifampicin und 100 µg/mL Cycloheximid sowie einem zusätzlichen Antibiotikum (**Tabelle 5**) ausplattiert. Von den Gülleproben wurden direkt 100 µL auf die entsprechenden Medien ausplattiert, wobei nicht inokulierte Gülle als Kontrolle verwendet wurde. Die Agarplatten wurden bei 28°C inkubiert und nach 48 h auf das Wachstum potentieller Kolonien untersucht. Eine Auswahl antibiotikaresistenter Isolate wurde als Dauerkultur in LB+15% Glycerin für das weitere Vorgehen bei -80°C konserviert.

2.6 Übersicht über verwendete Materialien

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Salmonella enterica</i> serovar. Typhimurium NCTC12023 (STM WT)	Wildtyp	NCTC, lab stock
STM $\Delta fliC \Delta fliB$	$\Delta fliC::FRT \Delta fliB::aph$	Fulde <i>et al.</i> (2018)
SR11 $\Delta 12$	$\Delta firmAICDHF \Delta stbABCD \Delta sthABCDE \Delta stfACDEFG \Delta stiABCH \Delta bcfABCDEFGH \Delta safABCD \Delta pefACDorf5orf6 \Delta stcABCD \Delta stjEDCBA \Delta stdAB \Delta jpfABCDE::KSac$	Elpers <i>et al.</i> (2020)

SR11 Δ 12 Δ fliC Δ fliB	Δ fimAICDHF Δ stbABCD Δ sthABCDE Δ st-fACDEFG Δ stiABCH Δ bcfABCDEFGH Δ sa-fABCD Δ pefACDorf5orf6 Δ stcABCD Δ st-jEDCBA Δ stdAB Δ lpfABCDE::KSac Δ fliC::FRT Δ fliB::aph	Elpers <i>et al.</i> (2020)
<i>S. enterica</i> Typhimurium 14028s	Wildtyp	Dr. Isabelle Virlogeux-Payant, INRA Tours, France
<i>S. enterica</i> Typhimurium LT2 DSM 18522	Wildtyp	DSMZ Braunschweig
<i>S. enterica</i> Senftenberg	Wildtyp	Dr. Nicola Holden, The James Hutton Institute, Dundee, Scotland, UK
<i>Salmonella enterica</i> serovar Infantis 20-00270	Wildtyp	Robert Koch Institut, Werningerode, Dr. Sandra Simon
<i>S. enterica</i> Infantis	Wildtyp	Dr. Kaye Burgess, Teagasc Food Research Centre, Dublin
<i>S. enterica</i> Infantis	Wildtyp	Mieke Uyttendaele, Uni Gent Delbeke <i>et al.</i> , 2015
<i>S. enterica</i> Newport	Wildtyp	Dr. Kaye Burgess, Teagasc Food Research Centre, Dublin
<i>Salmonella enterica</i> Newport 19-07810	Wildtyp	Robert Koch Institut, Werningerode, Dr. Sandra Simon
<i>S. enterica</i> Szentos	Wildtyp	Dr. Charles Franz, MRI, Kiel

Tabelle 3: Verwendete Primer

Name	Sequenz	Verwendung	Referenz
341F	CCTAYGGGRBGCASCAG	16S Sequenzierung	(Caporaso <i>et al.</i> , 2011, Sundberg <i>et al.</i> , 2013)
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	16S Sequenzierung	(Caporaso <i>et al.</i> , 2011, Sundberg <i>et al.</i> , 2013)
invA-FW	TTAACCTTGTGGAGCATATTCCG	invA qPCR	(Zimmermann, 2014)
invA-Rv	TCCTCAACTTCAGCAGATACC	invA qPCR	(Zimmermann, 2014)

Tabelle 4: Verwendete Pflanzenarten/-genotypen

Pflanzenart	Herkunft
Feldsalat, <i>Valerianella locusta</i>	N.L. Chrestensen Erfurter Samen- und Pflanzenzucht
Kopfsalat, <i>Lactuca sativa</i> L. cv Magizian	Syngenta Agro GmbH
Tomate, <i>Solanum lycopersicum</i> cv Money Maker	Kiepenkerl
<i>Arabidopsis thaliana</i> WS nramp1-2, nramp2-3	C. Curie, INRAe Montpellier
<i>A. thaliana</i> WS irt2	C. Curie, INRAe Montpellier
<i>A. thaliana</i> Col-0 fro2	C. Curie, INRAe Montpellier
<i>A. thaliana</i> Col-0 irt1	C. Curie, INRAe Montpellier
<i>A. thaliana</i> Col-0 ysl	C. Curie, INRAe Montpellier

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Konzentration [μ g/ml]	Abkürzung
Ampicillin	50	Amp
Kanamycin	50	Km
Ciprofloxacin	0,5	Cip
Tetracyclin	15	Tet
Imipenem	4	Imp
Ceftazidim	50	Cef
Doxycyclin	20	Dox
Colistin	5	Col
Gentamicin	10	Gm
Rifampicin	50	Rif
Cycloheximid	100	Cyclo

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Bodeneigenschaften, Anbaupraxis und weiterer Faktoren auf das Überleben von Humanpathogenen in landwirtschaftlich genutzten Böden (AP1)

3.1.1 Überleben von *S. enterica* in Abhängigkeit von Bodenart und Bewirtschaftung

Der Nachweis, dass HPB über lange Zeit im Boden überleben können, ist ein bedeutendes Ergebnis des Projektes *plantinfect*. Die negative Beziehung zwischen durchschnittlicher Besiedlungsrate von Pflanzen mit HPB und deren Verweildauer im Boden ist hierbei anzumerken. Des Weiteren können mit HPB kontaminierte organische Düngemittel eine Eintragsquelle für HPB in den Boden sein und deren Überlebensrate im Boden positiv beeinflussen. Eine Überlebensdauer von HPB im Boden von mehr als 12 Wochen kann nicht ausgeschlossen werden. Es sind daher mehr Daten in Bezug auf die Überlebensdauer von HPB in Abhängigkeit vom Bodentyp und dessen mikrobiologischen und physikochemischen Eigenschaften zu erarbeiten, um der Praxis sichere Empfehlungen geben zu können. Zu diesem Zweck wurden in Zusammenarbeit mit dem JKI in Braunschweig, dem IGZ in Großbeeren und dem Projekt *PrimedPlant* 19 Böden ausgewählt, die sich in den zuvor genannten Parametern unterscheiden (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Ausgewählt wurden Bodenarten aus unterschiedlichen Boden-Management-Systemen, die als Modellsysteme repräsentativ für landwirtschaftliche Bedingungen in Pflanzenbausystemen in Deutschland sind. Böden wurden teilweise aus dem Projekt *PrimedPlant* einschließlich der Informationen zu Boden-Charakteristika zur Verfügung gestellt. Diese landwirtschaftlichen Böden repräsentieren sowohl konventionelle (intensiv und extensiv) als auch ökologische Anbaupraxis.

Nr.	Beschreibung der Böden	Herkunft	Humusklasse und Bodenartgruppe	pH-Wert [CaCl ₂]
1	DS – Diluvialer Sandboden	Großbeeren	(h) S	7,0
2	AL – Aluvialer Lehm Boden	Großbeeren	(h) IIS	5,9
3	TE – Tillage Extensive	Bernburg	(h) IIS	7,2
4	CI – Conserved Intensive	Bernburg	(h) IIS	7,1
5	CE – Conserved Extensive	Bernburg	(h) IIS	7,0
6	Folge 2 – Ohne Düngung, ohne PS	JKI Dahnsdorf	(h) I'S	5,9
7	Folge 2 – Mit Düngung, mit PS	JKI Dahnsdorf	(h) I'S	5,7
8	BS1 - gepflügt	JKI Dahnsdorf	(h) IIS	6,0
9	BS1 - ungepflügt	JKI Dahnsdorf	(h) I'S	5,8
10	- Düngung, 0 dt CaO/ha	Halle	(h) sL	5,2
11	- Düngung, 20 dt CaO/ha	Halle	(h) sL	7,1
12	+P +Mg, 0 dt CaO/ha	Halle	(h) sL	5,2
13	+P +Mg, 20 dt CaO/ha	Halle	(h) sL	7,1
14	Schlag 5	JKI Berlin-Dahlem	(h) I'S	6,9
15	Schlag 9	JKI Berlin-Dahlem	(h) I'S	7,1

16	Schlag 6	JKI Quedlinburg	(h) sL	6,5
17	Boden Klein Wanzleben	Klein Wanzleben	h S	6,9
18	Boden organischer Anbau	Großbeeren	(h) l'S	6,2
19	Boden organischer Anbau	JKI Braunschweig	(h) sL	7,0

(h): Humusarm bis humos; h: stark humos; S: Sand; l'S: schwach lehmiger Sand; IIS: stark lehmiger Sand; sL: sandiger Lehm; Quelle LUFA Nord-West;

In mehreren Versuchsdurchläufen wurden die Böden im Dunkeln bei 20°C mit oder ohne Zusatz von Schweinegülle (170 kg N/ha) als organischer Dünger im Klimaschrank inkubiert. Die Ergebnisse des Versuchs sind in **Abbildungen 3 bis 6** dargestellt. Aus den gewonnenen Daten wurden die Abnahmeraten von HPB in den Böden berechnet und statistisch ausgewertet (**Abb. 7, 8**). Um das Überdauern der Salmonellen in den verschiedenen Böden über einen Zeitraum von mehr als 84 Tagen (12 Wochen) zu bewerten, wurden die Böden nachfolgend in regelmäßigen Abständen weiter beprobt und durch Anreicherung auf die Präsenz von Salmonellen getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Persistenz von *Salmonella* über einen in Abhängigkeit von der Zeit, dem Bodentyp und der Bodenbehandlungen (Zugabe von Gülle) deutlich unterscheiden können (**Abb. 9, 10**).

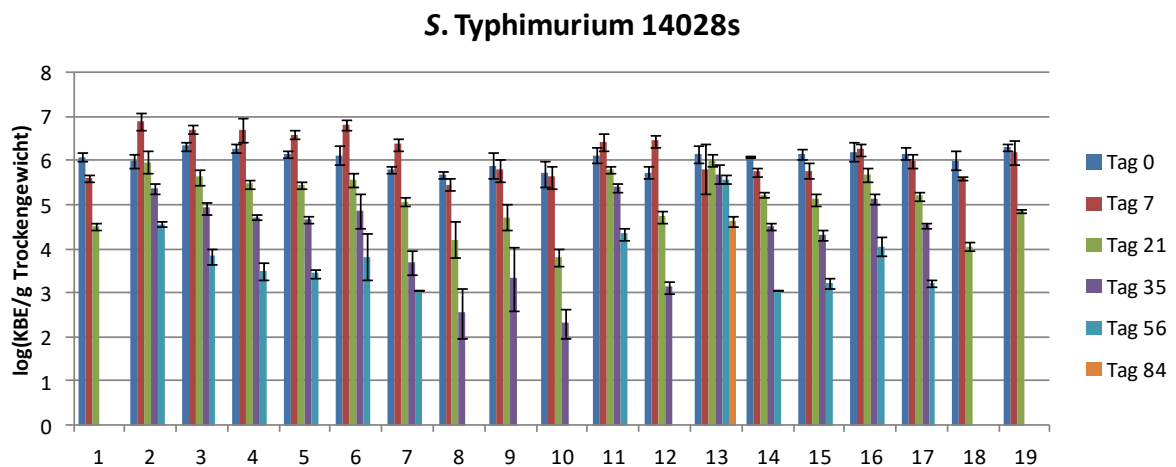


Abbildung 3: Persistenz von *S. enterica* Typhimurium 14028s in 19 Böden (siehe Tabelle 6) ohne Zugabe von Gülle über einen Zeitraum von 12 Wochen. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von 4 Replikaten. Fehlende Balken zeigen Werte unter der Quantifizierungsgrenze (ca. $1 \cdot 10^3$ /g Trockengewicht). Für Bodenart siehe die Bodennummer in Tabelle 6.

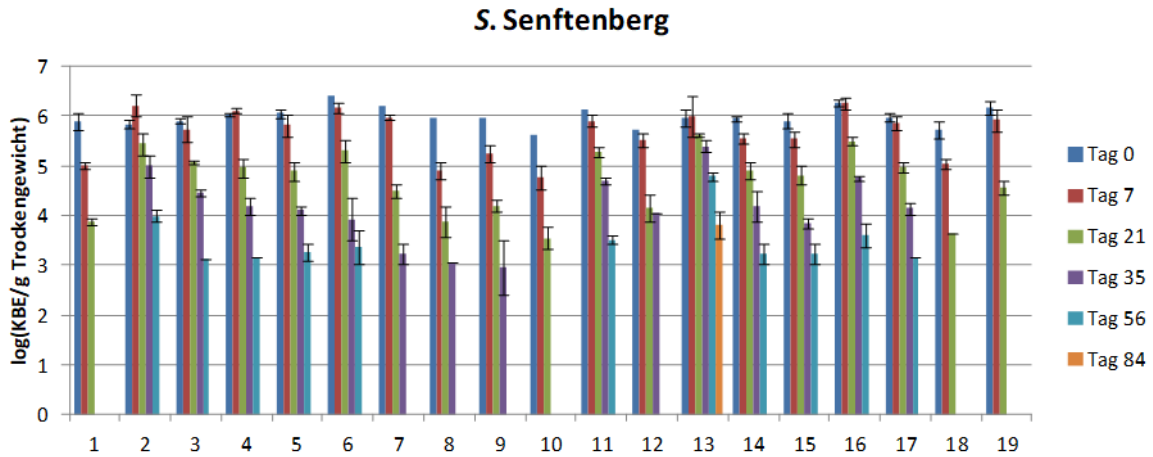


Abbildung 4: Persistenz von *S. enterica* Senftenberg in 19 Böden (siehe Tabelle 6) ohne Zugabe von Gülle über einen Zeitraum von 12 Wochen. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von 4 Replikaten. Fehlende Balken zeigen Werte unter der Quantifizierungsgrenze (ca. $1 \cdot 10^3$ /g Trockengewicht). Mittelwerte für Tag 0 von den Böden 6 bis 12 berechnen sich aus 4 technischen Replikaten. Für Bodenart siehe die Bodennummer in Tabelle 6.

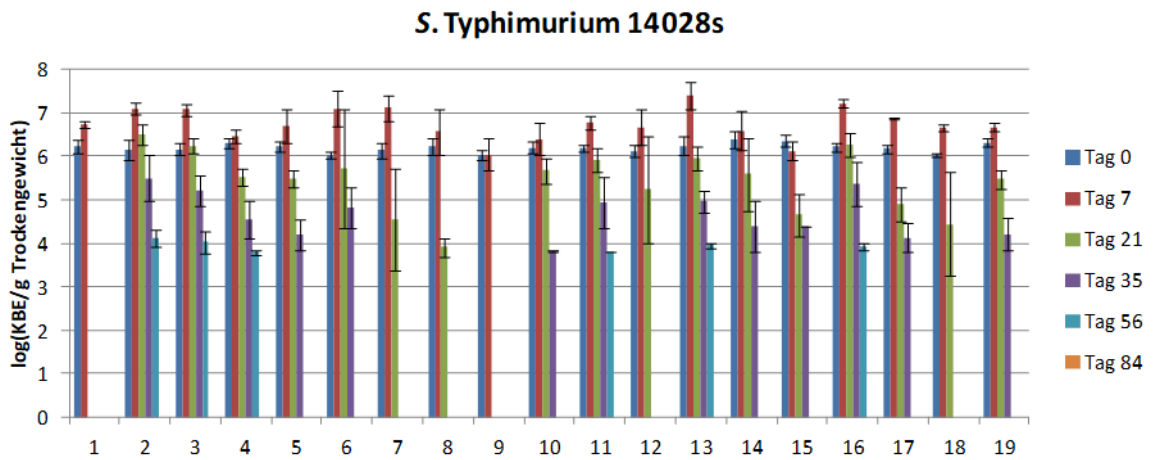


Abbildung 5: Persistenz von *S. enterica* Senftenberg in 19 Böden (siehe Tabelle 6) nach Zugabe von Gülle über einen Zeitraum von 12 Wochen. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von 4 Replikaten. Fehlende Balken zeigen Werte unter der Quantifizierungsgrenze (ca. $1 \cdot 10^3$ /g Trockengewicht). Für Bodenart siehe die Bodennummer in Tabelle 6.

S. Senftenberg

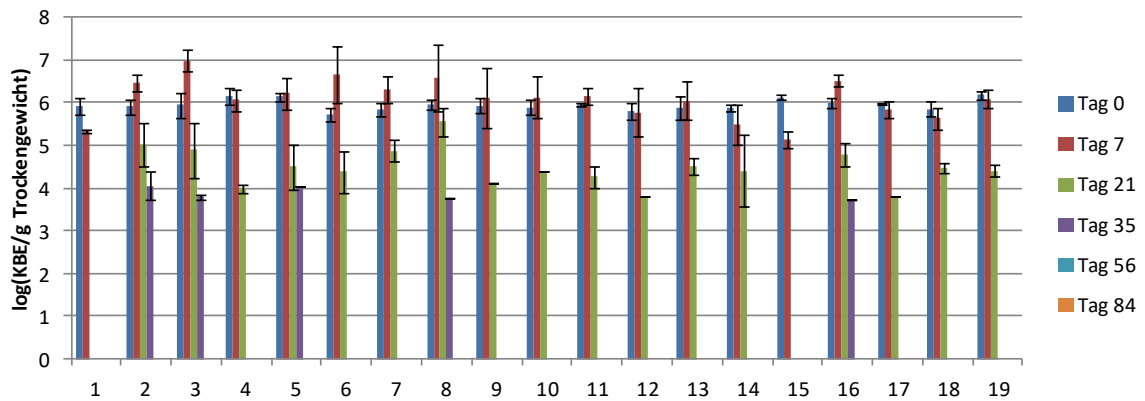
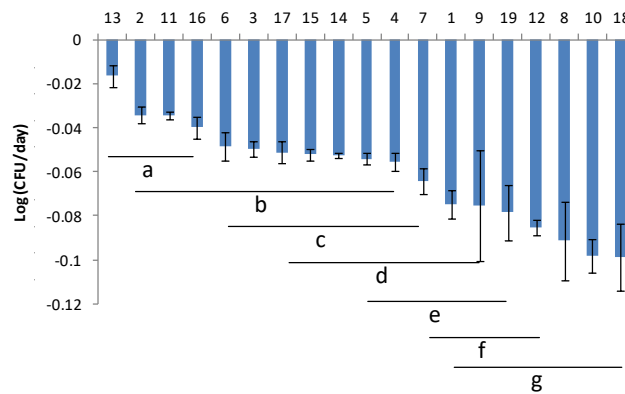


Abbildung 6: Persistenz von *S. enterica* Senftenberg in 19 Böden (siehe Tabelle 6) nach Zugabe von Gülle über einen Zeitraum von 12 Wochen. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von 4 Replikaten. Fehlende Balken zeigen Werte unter der Quantifizierungsgrenze (ca. $1 \cdot 10^3$ /g Trockengewicht).

S. Typhimurium 14028s



S. Senftenberg

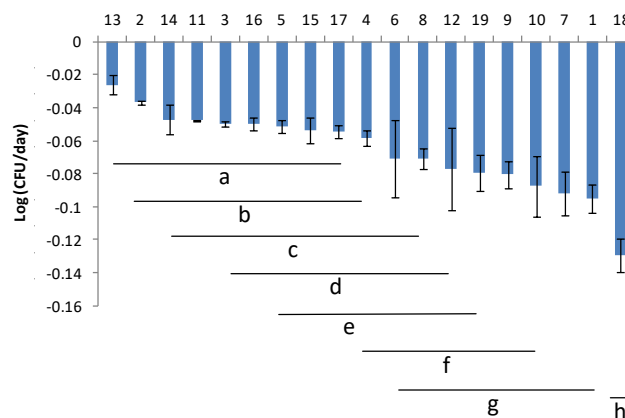


Abbildung 7: Abnahmeraten von *Salmonella* Typhimurium 14028s (oben) und *S. Senftenberg* (unten) in 19 Böden (siehe Tabelle 6) ohne Zugabe von Gülle (log CFU/Tag). Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in der Abnahmerate an (Tukey Test, $p < 0,05$, $n = 4$). Zur Berechnung der Abnahmerate wurde bei Proben die an Tag 21 bereits unter der Nachweisgrenze lagen, log 3 als Nachweisgrenze betrachtet.

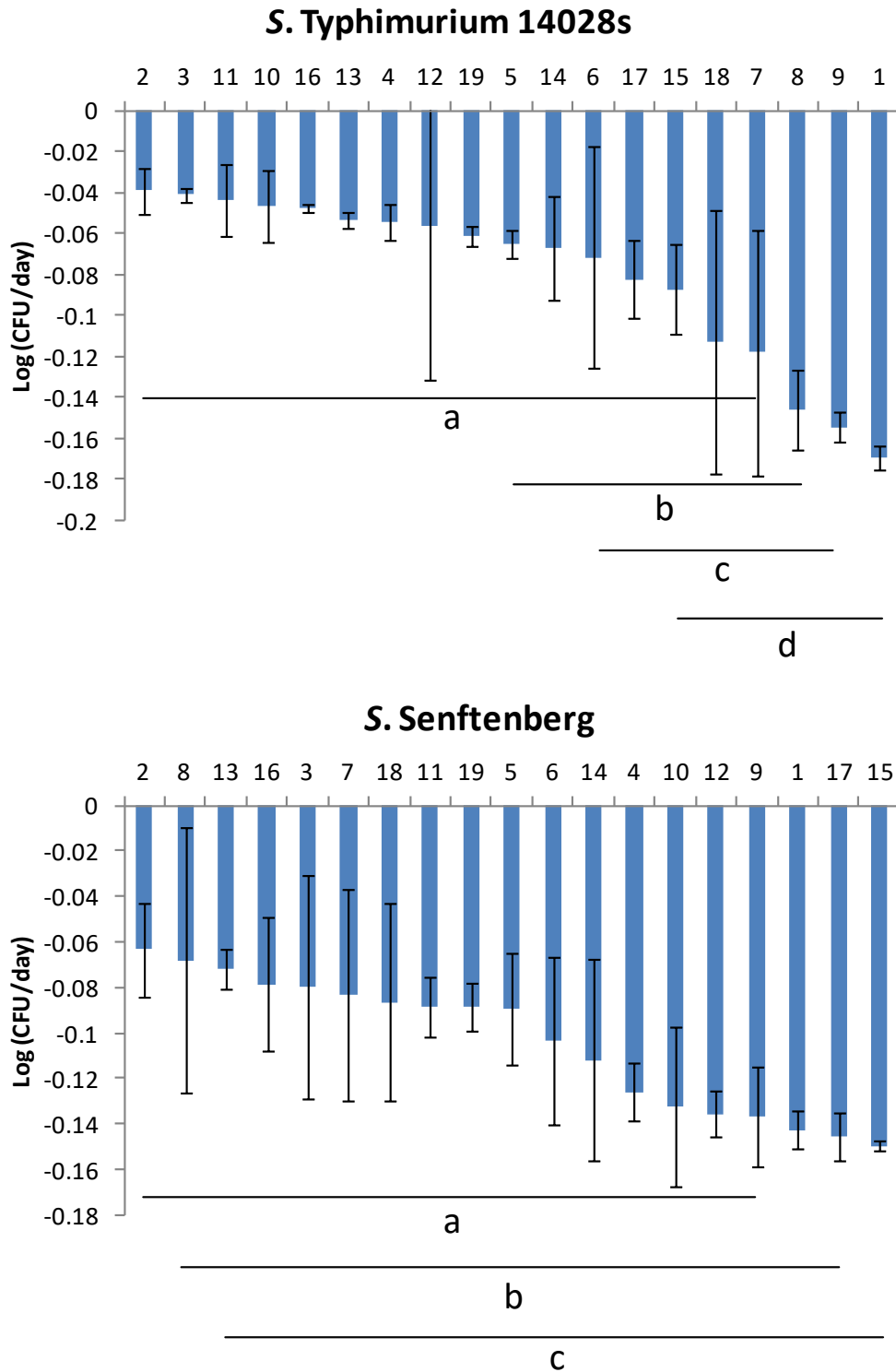


Abbildung 8: Abnahmeraten von *Salmonella* Typhimurium 14028s (oben) und *S. Senftenberg* (unten) in 19 Böden (siehe Tabelle 6) mit Zugabe von Gülle (log CFU/Tag). Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in der Abnahmerate an (Tukey Test, $p < 0.05$, $n = 4$). Zur Berechnung der Abnahmerate wurde bei Proben die an Tag 21 bereits unter der Nachweisgrenze lagen, log 3 als Nachweisgrenze betrachtet.

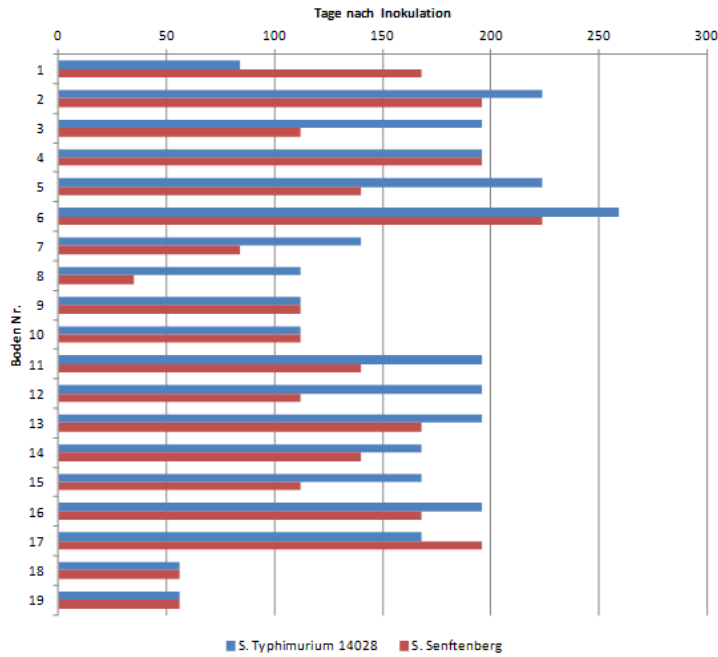


Abbildung 9: Nachweis von *Salmonella Typhimurium 14028s* bzw. *S. Senftenberg* in 19 ausgewählten Böden (siehe Tabelle 6) ohne Zugabe von Gülle über einen Zeitraum von 315 Tagen. Dargestellt ist der Zeitraum in dem bei mindestens einem von vier Replikaten Salmonellen nach Anreicherung nachweisbar waren.

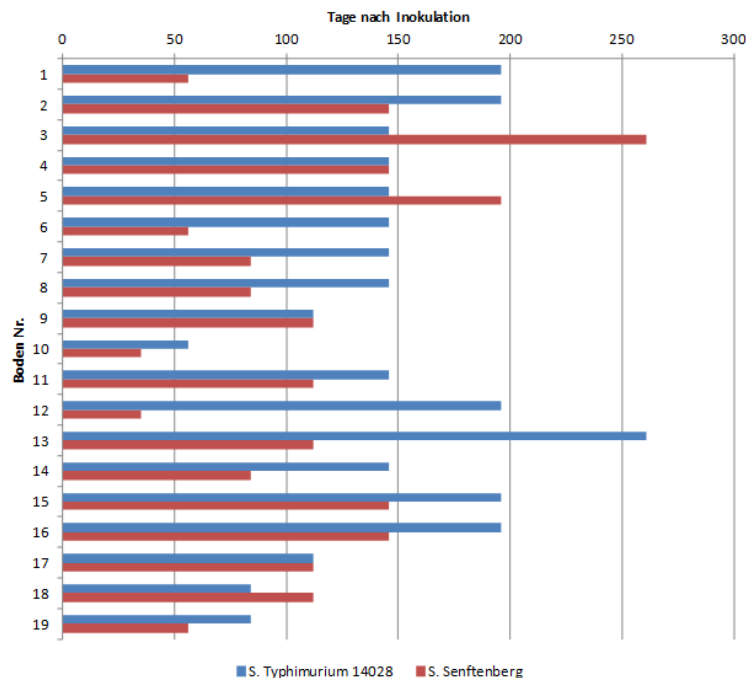


Abbildung 10: Nachweis von *Salmonella Typhimurium 14028s* bzw. *S. Senftenberg* in den 19 ausgewählten Böden (siehe Tabelle 6) nach Zugabe von Gülle über einen Zeitraum von 261 Tagen. Dargestellt ist der Zeitraum in dem bei mindestens einem von vier Replikaten Salmonellen nach Anreicherung nachweisbar waren.

3.1.2 Überlebensrate von EHEC im Boden in Abhängigkeit von Temperatur und Bodentyp

Die Untersuchung des Einflusses von Umweltfaktoren auf die Überlebensrate von EHEC im Boden erfolgte im Labormaßstab unter Verwendung von AL- und DS-Boden, die jeweils mit dem Teststamm C227/11Φ_{cu} beimpft wurden. Die Proben wurden bei 4°C und 22°C inkubiert. In **Abbildung 11** ist das Ergebnis aller Boden/Temperatur Kombinationen dargestellt.

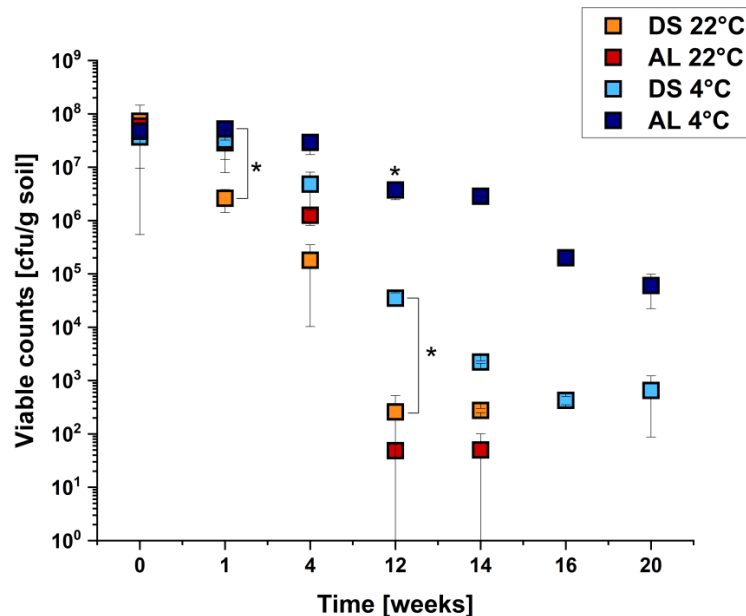


Abbildung 11: Überlebensrate von C227/11Φ_{cu} in DS- und AL-Böden in Abhängigkeit von der Temperatur. 25 g Boden wurde mit 10⁸ CFU/g beimpft und für 20 Wochen unter verschiedenen Temperaturbedingungen inkubiert. Nach 0, 1, 4, 12, 14, 16 und 20 Wochen wurde die Zellzahl von C227/11Φ_{cu} (CFU/g Boden) im Boden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * = Werte sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

In den ersten 4 Wochen überlebte eine höhere Anzahl an Bakterien im AL-Boden im Vergleich zum DS-Boden. Nach 12 Wochen waren keine Unterschiede in der Zellzahl des untersuchten Stammes im DS- und AL-Boden bei 22°C zu verzeichnen. Nach 16 Wochen wurden in beiden Böden keine kultivierbaren Bakterien bei 22°C nachgewiesen. Keine Unterschiede in der Anzahl des untersuchten Stammes waren in beiden Böden nach 4 Wochen bei 4°C festgestellt, während nachfolgend (4. bis 12. Woche) in beiden Böden eine Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen war. Im DS-Boden war im Vergleich zum AL-Boden eine stärkere Abnahme (10³ CFU/g Boden) zu beobachten. Die Inkubation von C227/11Φ_{cu} im AL-Boden bei 4°C über 20 Wochen führte zu einem Rückgang der Zellzahl von 10⁸ auf 10⁵ CFU/g Boden.

Die Ergebnisse der Versuche unter Laborbedingungen zeigten, dass der getestete EHEC/EAEC-Stamm, Temperatur- und Bodentyp-abhängig über 12 Wochen im Boden überleben kann. Die höchste Überlebensrate von *E. coli* O104:H4 C227/11Φ_{cu} war im AL-Boden bei 4°C im Vergleich

zum DS-Boden und der Temperatur von 22°C gegeben. Unter diesen Bedingungen war der Stamm *E. coli* O104:H4 C227/11Φcu auch über einen längeren Zeitraum (20 Wochen) im Boden nachweisbar.

3.1.3 Überleben von EHEC im Boden in Abhängigkeit von Temperatur und Bodentyp und Güllezugabe

Um den Einfluss von Gülle auf das Überleben von C227/11Φcu in DS- und AL-Böden zu untersuchen, wurden die Böden in diesem Ansatz mit Rindergülle versetzt. Die Ergebnisse aller Boden/Temperatur Kombinationen sind in **Abbildung 12** dargestellt.

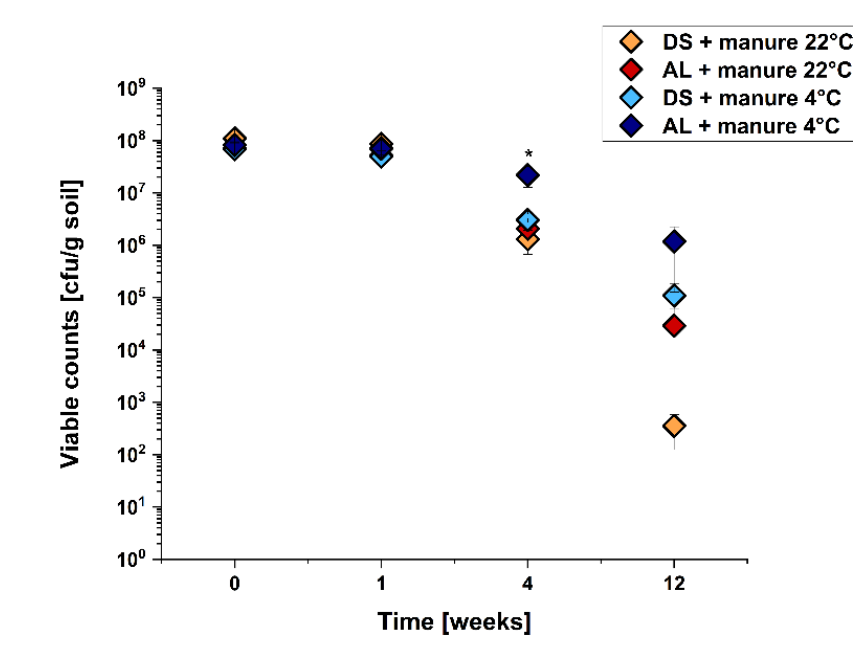


Abbildung 12: Einfluss der Güllezugabe auf die Überlebensrate von C227/11Φcu in DS- und AL-Böden in Abhängigkeit von der Temperatur. 25 g Boden wurde mit 10⁸ CFU/g beimpft und für 12 Wochen inkubiert. Nach 0, 1, 4 und 12 Wochen wurde die Zellzahl von C227/11Φcu (CFU/g Boden) in den Böden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * = Werte sind statistisch signifikant ($p < 0,05$)

Im Gegensatz zu der Überlebensrate von C227/11Φcu in AL- und DS-Böden (**Abb. 11**) war nach Zugabe von Gülle bei 22°C innerhalb der ersten Woche kein Rückgang der Zellzahlen festzustellen. Nachfolgend nahm die Zellzahl der Bakterien jedoch ebenfalls ab. Die Abnahmerate war jedoch im gleichen Zeitraum von 12 Wochen unter beiden Temperaturbedingungen geringer im Vergleich zu der in den Böden ohne Zugabe von Gülle (**Abb. 12, 11**). Dies unterstreicht die positive Wirkung von Gülle auf die Überlebensrate von C227/11Φcu im Boden.

3.1.4 Einfluss von RpoS und FliC auf das Überleben von *E. coli* O104:H4 C227/11Φ_{cu} im Boden

Mit dem bereits für den Wildtyp etablierten Modellversuchsansatz wurde die Überlebensrate der *E. coli* O104:H4 Deletionsmutanten C227/11Φ_{cu} Δ *fliC* und *E. coli* O104:H4 C227/11Φ_{cu} Δ *rpoS* in Abhängigkeit von Bodentyp und Temperatur untersucht. RpoS ist ein wichtiger Regulator der Stressantworten und Flagellin ist für die Mobilität der Bakterien essenziell. Die Ergebnisse der Überlebensrate von *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11Φ_{cu} Δ *rpoS* sind in **Abbildung 13** im Vergleich zum Wildtypstamm dargestellt.

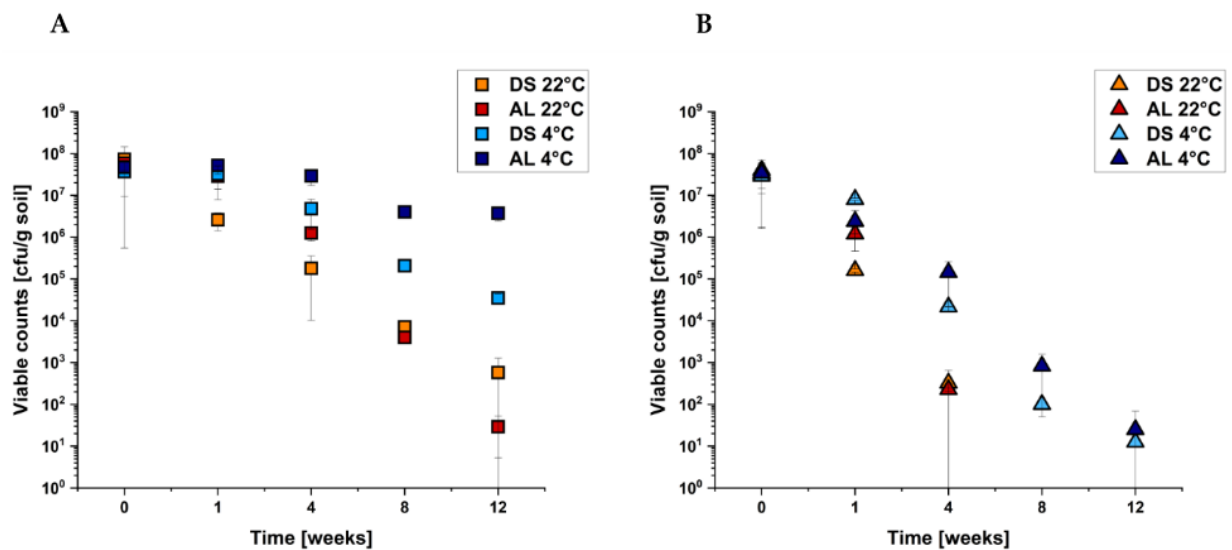


Abbildung 13: Überlebensrate von (A) *E. coli* O104:H4 C227/11Φ_{cu} und (B) der isogenen *rpoS* Deletionsmutante in Abhängigkeit von Bodentyp (DS und AL) und Temperatur (22°C und 4°C). 25 g Boden wurde mit 10⁸ CFU/g Boden beimpft und für 12 Wochen inkubiert. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Gramm Boden (CFU/g Boden) wurden nach 0, 1, 4, 8 und 12 Wochen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Durch die Deletion von *rpoS* reduzierte sich die Überlebensrate der isogenen *rpoS* Deletionsmutante in den ausgewählten Böden unter allen Kultivierungsbedingungen (**Abb. 13B**). Im AL und DS Boden wurde eine Abnahme der kultivierbaren Bakterien der isogenen *rpoS* Deletionsmutante von 10⁸ auf 10¹ CFU/g Boden innerhalb von 12 Wochen bei 4°C festgestellt. Dies entspricht in diesem Versuchsansatz der höchsten Überlebensrate. Im Gegensatz dazu waren bei 22°C bereits nach 8 Wochen keine kultivierbaren Bakterien der isogenen *rpoS* Deletionsmutante nachweisbar (**Abb. 14**). Im Vergleich zur Deletionsmutante zeigte die komplementierten Stämme (**Abb. 14**) eine höhere Überlebensrate.

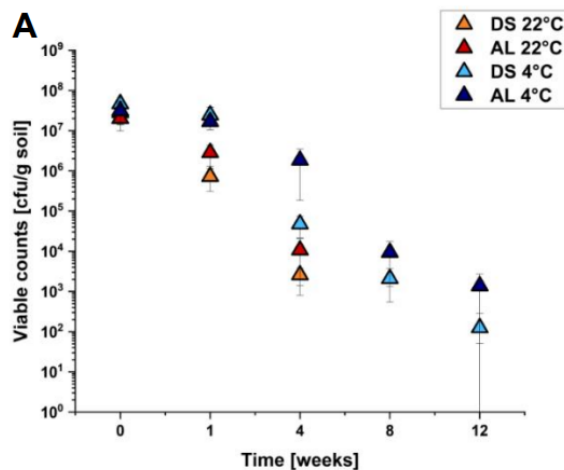


Abbildung 14: Überlebensrate von *E. coli* O104:H4 C227/11Φcu $\Delta rpoS/pFJ02$ in Abhängigkeit von Bodentyp (DS und AL) und Temperatur (22°C und 4°C). 25 g Boden wurde mit 10^8 CFU/g beimpft und für 12 Wochen inkubiert. Die Anzahl der CFU/g Boden wurde nach 0, 1, 4, 8 und 12 Wochen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Unterschiede in der Überlebensrate der isogenen *rpoS* Deletionsmutante in Abhängigkeit von der Temperatur waren vor allem in den ersten 4 Wochen zu beobachten (**Abb. 14**). Das Wildtypniveau wurde durch die Komplementierung nicht vollständig erreicht, aber die Unterschiede zwischen der Deletionsmutante (**Abb. 13B**) und dem komplementierten Stamm (**Abb. 14**) bestätigten, dass der Sigma Faktor RpoS eine wichtige Determinante für das Überleben von *E. coli* O104:H4 Stamm C227/11Φcu in landwirtschaftlichen Böden unter den angewandten Bedingungen ist.

Ebenfalls wurde die Überlebensrate der isogenen $\Delta fliC$ Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp C227/11Φcu im DS- und AL-Boden in Abhängigkeit von der Temperatur (22°C und 4°C) untersucht. Die Ergebnisse aller vier Temperatur/Boden-Kombinationen sind vergleichend zum Wildtyp in **Abbildung 15** dargestellt.

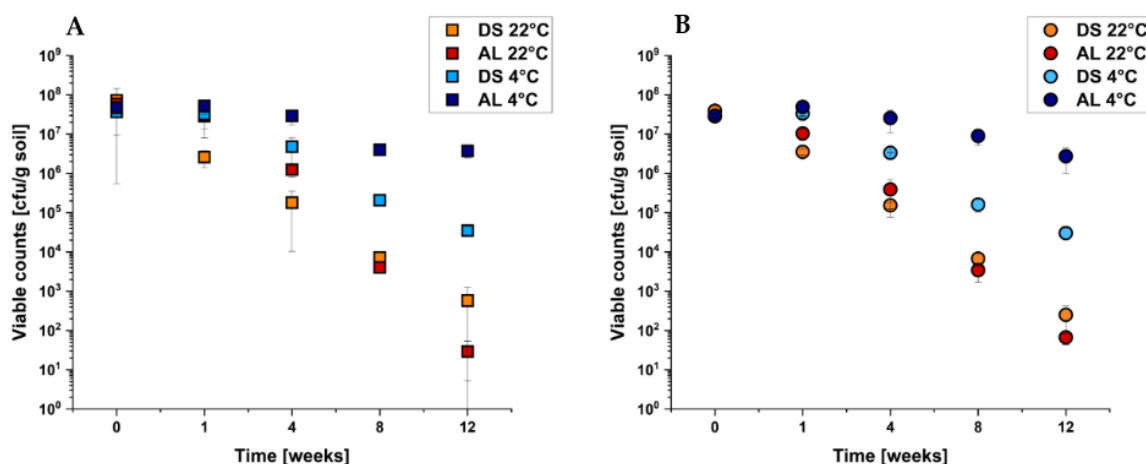


Abbildung 15: Überlebensrate von (A) *E. coli* O104:H4 C227/11Φcu und (B) der isogenen *fliC* Deletionsmutante in Abhängigkeit von Bodentyp (DS und AL) und Temperatur (22°C und 4°C). 25 g Boden wurde mit 10^8 CFU/g beimpft und für 12 Wochen inkubiert. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Gramm Boden (CFU/g Boden) wurden nach 0, 1, 4, 8 und 12 Wochen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Es wurden keine Unterschiede in der Überlebensrate bei Vergleich des Wiltyps C227/11Φ_{cu} und der *ΔfliC* Deletionsmutante (**Abb. 15A, B**) sowie der komplementierten Deletionsmutante C227/11Φ_{cu} *ΔfliC/pFJ03* (**Abb. 16**) in Abhängigkeit von Bodentyp und Temperatur. Die Abnahme der Zellzahlen während der Inkubationszeit war für alle getesteten Bedingungen vergleichbar.

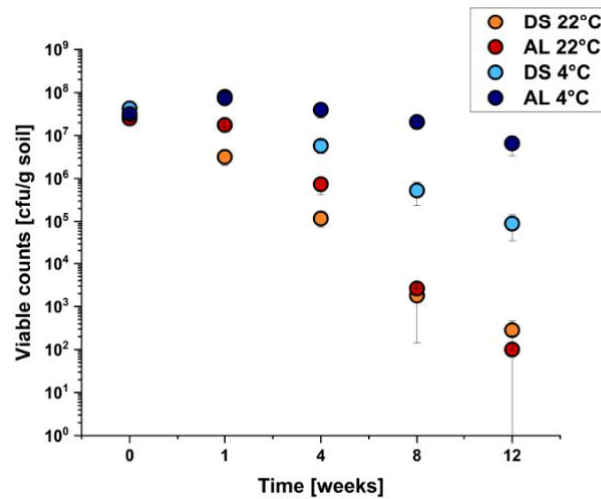


Abbildung 16: Überlebensrate von *E. coli* O104:H4 C227/11Φ_{cu} *ΔfliC/pFJ03* in Abhängigkeit von Bodentyp (DS und AL) und Temperatur (22°C und 4°C). 25 g Boden wurde mit 10⁸ CFU/g beimpft und für 12 Wochen inkubiert. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Gramm Boden (CFU/g Boden) wurde nach 0, 1, 4, 8 und 12 Wochen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Sigma-Faktor RpoS eine wichtige Determinante für das Überleben von C227/11Φ_{cu} im Boden ist. Im Gegensatz dazu scheint die Produktion von Flagellin (kodiert durch das Gen *fliC*) nicht entscheidend für das Überleben des getesteten EHEC-Stammes in den beiden Bodentypen zu sein.

3.2 Einfluss der Anbaupraxis auf die Anzahl und Dauer der im Boden vorhandenen Humanpathogene, ihrer Motilität sowie Fähigkeit an Bodenpartikel anzuhaften und die Pflanze zu besiedeln (AP2)

3.2.1 Überlebensrate von *Salmonella*-Serovaren im DS-Boden

Um herauszufinden, ob es Unterschiede in der Überlebensrate in Abhängigkeit vom Serovar im Boden gibt, wurde ein Experiment mit sechs ausgewählten Serovaren durchgeführt. DS-Boden wurde mit den Serovaren *Salmonella enterica* Serovare Typhimurium14028s, Senftenberg, Sze-

ntes, Newport und zwei verschiedenen Infantis Isolaten inokuliert. Die Bestimmung der Überlebensrate im Boden erfolgte nach 0, 7, und 21 Tagen mittels Selektivmedium (**Abb. 17**). Alle Serovare zeigten vergleichbare Überlebensraten.

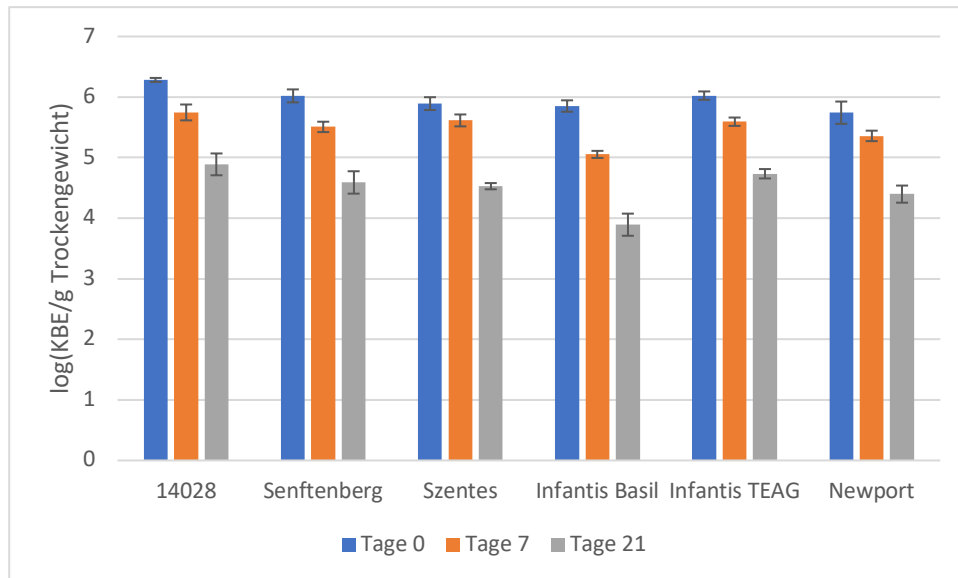


Abbildung 17: Überlebensrate verschiedener *Salmonella*-Serovare im DS-Boden. Die [(Koloniebildende Einheiten, (CFU/g Boden)] der Stämme wurden nach 0, 7 und 21 Tagen ermittelt. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von 4 Replikaten.

3.2.2 Besiedlung von Kopfsalat in Abhängigkeit vom *Salmonella*-Serovar

Um herauszufinden, ob das Überleben im Boden einen Einfluss auf die Besiedlungsrate von Pflanzen hat, wurden verschiedene *Salmonella* Serovare auf ihre Persistenz in unterschiedlichen Böden getestet. In Zusammenarbeit mit dem Projekt PrimedPlant wurden 19 Böden von verschiedenen Standorten in Deutschland ausgewählt, die sich in ihren physikochemischen Parametern unterscheiden (**Tabelle 6**). Aufgrund der geringeren Besiedlungsrate von Kulturpflanzen durch *Salmonella* relativ (ca. 1 bis 2%), war die Einbeziehung einer größeren Anzahl an Pflanzen in die Versuche notwendig. Dies erfordert jedoch eine große Menge an den jeweiligen Böden. Daher wurden für die weiteren Versuche Böden ausgewählt, in denen für *Salmonella* eine geringe und hohe Persistenz gegeben war. Des Weiteren sollte mit *Salmonella*-Stämmen gearbeitet, die im Boden eine geringe und hohe Persistenz aufweisen.

- a) Basierend auf unseren Ergebnissen wurde Alluvialer Lehmboden (**AL**) ausgewählt, da in diesem Boden die höchste Persistenz für *Salmonella* gegeben war sowie der Boden **BS1** aus JKI Dahnsdorf, in dem nur eine geringe Überlebensrate von *Salmonella* zu beobachten war (vgl. Abschnitt 3.1.1).

b) Um die besten und schlechtesten Pflanzen-kolonisierenden *Salmonella*-Stämme zu ermitteln, wurden sechs *Salmonella*-Stämme in DS-Boden, der mit Gülle gedüngt war, inokuliert und 7 Wochen gelagert. Nach der Inkubationszeit wurden in die Böden 2 Wochen alte Kopfsalatpflanzen eingepflanzt. Um die Besiedlungsrate mit den verschiedenen *Salmonella*-Stämmen zu ermitteln, erfolgte die Probenahme nach weiteren 4 Wochen. Unter den angewandten Bedingungen besiedelte nur *S. enterica* Szentés die Pflanzen mit einer Besiedlungsrate von 1,85 bis 3,7% (**Tabelle 7**). Die Präsenz von *Salmonella* wurde auch in der Rhizosphäre und im Boden untersucht. Alle *Salmonella*-Stämme konnten, mit Ausnahme von *S. enterica* Senftenberg, in den inokulierten Böden und in der Rhizosphäre nachgewiesen werden. *S. enterica* Senftenberg war nur in 50% der Rhizosphärenproben nachweisbar. Daher wählten wir *S. enterica* Szentés als das am *besten* kolonisierenden und *S. enterica* Senftenberg als das am *schlechtesten* kolonisierenden Serovar für weitere Versuche aus.

Tabelle 7: Besiedlung von Kopfsalat in Abhängigkeit vom *Salmonella*-Serovar in mit Gülle versetzten DS-Boden 4 Wochen nach der Pflanzung von Kopfsalat. Der Boden wurde zuvor mit den entsprechenden *Salmonella*-Stämmen inokuliert.

<i>Salmonella</i> -Stamm	Anzahl der Salatpflanzen	Anzahl besiedelter Pflanzen	Besiedelte Pflanzen (%)
<i>S. enterica</i> Typhimurium 14028s	108	0	0
<i>S. enterica</i> Senftenberg	108	0	0
<i>S. enterica</i> Infantis Basil	108	0	0
<i>S. enterica</i> Infantis TEAG	108	0	0
<i>S. enterica</i> Newport	108	0	0
<i>S. enterica</i> Szentés	108	2 - 4	1.85 - 3.7

Zusätzlich untersuchten wir, ob *Salmonella* Kopfsalat auch über das Saatgut besiedeln kann. Dafür wurden Salatsamen in Töpfe mit Boden, der mit Gülle gedüngt und mit sechs verschiedenen *Salmonella*-Stämmen inokuliert war, ausgesät. Nach 4 Wochen untersuchten wir die Präsenz von *Salmonella* in den Blättern. Wir fanden keine Salmonellen in den getesteten Pflanzen (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Besiedlung von Kopfsalat in Abhängigkeit vom *Salmonella*-Serovar in mit Gülle versetzten DS-Boden 4 Wochen nach der Pflanzung von Kopfsalat. Der Boden wurde mit den entsprechenden *Salmonella*-Serovaren inokuliert.

<i>Salmonella</i> -Stamm	Anzahl der Salatpflanzen	Anzahl besiedelter Pflanzen	Besiedelte Pflanzen (%)
<i>S. enterica</i> Typhimurium 14028s	56	0	0
<i>S. enterica</i> Senftenberg	56	0	0

<i>S. enterica</i> Infantis Basil	56	0	0
<i>S. enterica</i> Infantis TEAG	56	0	0
<i>S. enterica</i> Newport	56	0	0
<i>S. enterica</i> Szentes	56	0	0

Für diese Studie haben wir den besten und den schlechtesten Boden sowie das beste und das schlechteste *Salmonella*-Serovar in Bezug auf die Überlebensrate und Besiedlung von Salatpflanzen verwendet. Die oben beschriebenen Böden, in denen die beste bzw. schlechteste Persistenz beobachtet wurde (AL, BS1) wurden mit den Serovaren, welche die höchste bzw. schlechteste Besiedlungsrate zeigten (*S. enterica* Szentes und *S. enterica* Senftenberg) inokuliert. Die Böden wurden mit Gülle vermischt und 7 Wochen lang gelagert. Danach wurden 2 Wochen alte Salatpflanzen in Töpfe mit dem gelagerten Boden umgesetzt. Nach weiteren 4 Wochen wurden Proben von den Blättern genommen, um die Besiedlungsrate der Pflanzen mit verschiedenen *Salmonella*-Serovaren zu ermitteln. Wir stellten fest, dass kein *Salmonella*-Serovar den Salat besiedeln konnte (**Tabelle 9**). Darüber hinaus bewerteten wir auch die Persistenz dieser beiden *Salmonella*-Stämme in den beiden getesteten Böden. Wir stellten fest, dass das am besten kolonisierende Serovar *S. Szentes* besser als der am schlechtesten kolonisierende Stamm *S. Senftenberg* in AL-Böden persistierte, während wir in BS-Böden keinen Unterschied in der Persistenz beider *Salmonella*-Serovare über die getestete Zeit feststellen konnten (**Abb. 18**). Durch diese Studie konnten wir nicht feststellen, ob landwirtschaftliche Praktiken die Kolonisierung von durch Salmonellen beeinflussen, aber wir konnten feststellen, dass landwirtschaftliche Praktiken die Persistenz von *Salmonella* im Boden beeinflussen.

Tabelle 9: Besiedlung von Kopfsalat in Abhängigkeit vom *Salmonella*-Serovar. *S. enterica* Senftenberg, *S. enterica* Szentes und Bodentypen AL und BS1 wurden getestet. Kopfsalat wurde in mit Salmonellen-kontaminierten Boden ausgesät und nach 2 Wochen in Töpfe mit Gülle versetzten AL-Böden (beste Persistenz) und BS1-Böden (schlechteste Persistenz) gepflanzt. Die Probenahme erfolgte 4 Wochen nach der Pflanzung in die Töpfe.

<i>Salmonella</i> -Stamm	Anzahl der Salatpflanzen	Anzahl besiedelter Pflanzen	Besiedelte Pflanzen (%)
<i>S. enterica</i> Szentes + AL-Boden	150	0	0
<i>S. enterica</i> Senftenberg + AL-Boden	150	0	0
<i>S. enterica</i> Szentes + BS1-Boden	150	0	0
<i>S. enterica</i> Senftenberg + BS1-Boden	150	0	0

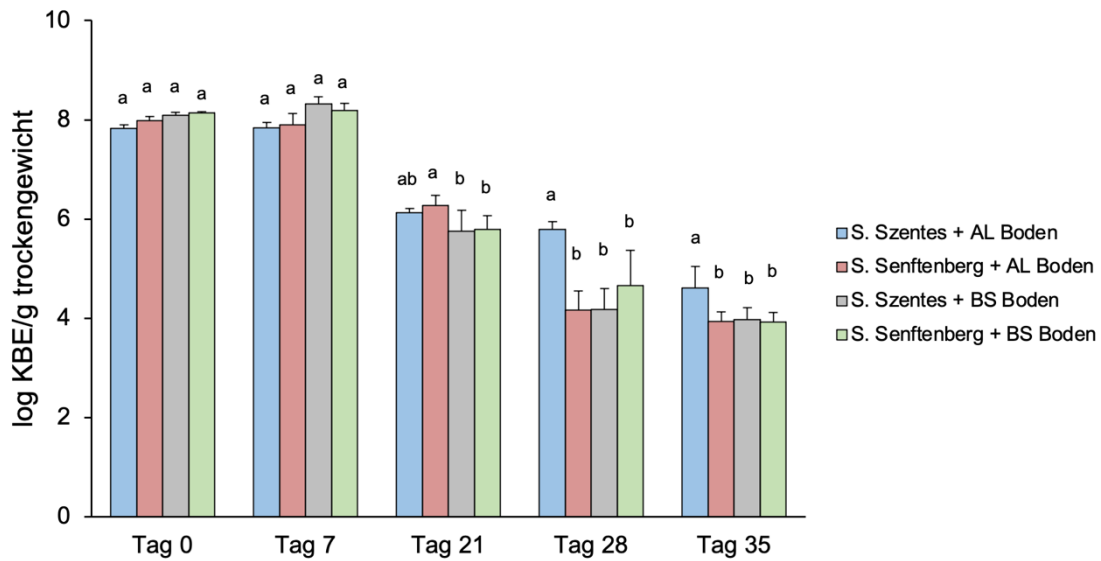


Abbildung 18: Persistenz von *S. Szentes* *S. Senftenberg* in gedüngtem AL-Boden mit Kopfsalat-Pflanzen. Die Persistenz von *Salmonella* Serovaren im Boden wurde über einen Zeitraum von 5 Wochen ermittelt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) von unabhängigen biologischen Wiederholungen dar. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede nach ANOVA mit post hoc Tukey.

3.2.3 Adaptation der Salmonellen an die Bedingungen während der Tierproduktion

Um herauszufinden ob die Anpassung von Salmonellen an die Bedingungen in der Tierproduktion ihre Besiedlung und Persistenz in Blättern bzw. im Boden beeinflusst, wurden Mikrokosmos-Experimente mit Gülle durchgeführt. Das Serovar *S. Szentes*, welches in 3.2.2 die höchste Besiedlungsrate aufwies, wurde zunächst auf einem neu entwickeltem Güllemedium angezogen und dann in AL Boden inokuliert. Neben dem neu entwickelten Gülle-Medium wurde das in *plantinfect* t (Fornefeld *et al.*, 2019). Der AL-Boden wurde mit Gülle gemischt und 4 Wochen lang gelagert. Danach wurden 2 Wochen alte Salatpflanzen in Töpfe mit dem gelagerten Boden gepflanzt und mit *S. Szentes*, angezogen auf den zwei verschiedenen Medien, beimpft. Nach 4 Wochen wurden Proben von den Blättern genommen, um die Besiedlungsrate der Pflanzen zu ermitteln. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Anzucht von *S. Szentes* auf beiden Medien nicht zu einer erhöhten Kolonisierung geführt hat (**Tabelle 10**). Außerdem wurde die CFU der Salmonellen über die Zeit im AL-Boden evaluiert, um festzustellen ob die Persistenz der Salmonellen im Boden beeinflusst wird, wenn sie an die Tierproduktion prä-adaptiert sind (vorgewachsen auf Güllemedien). In den ersten 2 Wochen konnten keine Unterschiede in der Persistenz festgestellt werden. Nach 3 Wochen war die CFU in Proben mit Salmonellen die auf Güllemedium vorgezchtet worden waren jedoch höher als auf Salatmedien (**Abb. 19**). Dieser Trend konnte auch nach 5 und

6 Wochen beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Anpassung von Salmonellen an die Bedingungen in der Tierproduktion ihre Persistenz im Boden beeinflusst.

Tabelle 10: Besiedlung von Salat, der auf AL-Boden angezogen wurde, welcher mit dem am besten kolonisierenden *Salmonella*-Serovar, *S. enterica* Szentes, inokuliert wurde. Die Salmonellen wurden auf Salatmedium oder Güllemedium vorgezogen.

<i>Salmonella</i> -Stamm + Medien	Anzahl der Salatpflanzen	Anzahl besiedelter Pflanzen	Besiedelte Pflanzen (%)
<i>S. enterica</i> Szentes (Salatmedium)	150	0	0
<i>S. enterica</i> Szentes (Güllemedium)	150	0	0

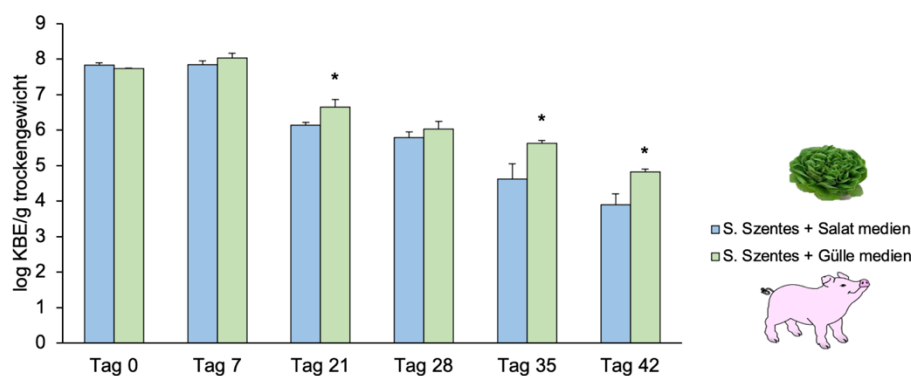


Abbildung 19: Persistenz von auf Güllemedium oder Salatmedium vorgezogen *S. Szentes* in AL-Boden. AL-Boden wurde mit Gülle gemischt und mit *S. Szentes* wurde inokuliert. Die Persistenz der Bakterien im Boden (log KBE / g Boden) wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen ermittelt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) von unabhängigen biologischen Wiederholungen dar. * repräsentiert einen statistischen Unterschied bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ im Students *t*-Test. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) von unabhängigen biologischen Wiederholungen dar.

3.2.4 Besiedlungsrate von *Salmonella* in der Rhizosphäre von Feld- und Kopfsalat im hydroponischen System im Vergleich zur Kultivierung im Boden

Die Ergebnisse von *plantinfect* zeigen, dass *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (hier Stamm NCTC12023) in der Lage ist mittels verschiedener adhäsiver Strukturen an der Blattoberfläche von Feldsalat (*Valerianella locusta*) und Kopfsalat (*Lactuca sativa*) zu binden. In der Praxis erfolgt die Kultivierung von Nutzpflanzen sowohl im Boden als auch in hydroponischer Kultur. Es fehlen jedoch Kenntnisse, welchen Einfluss die Kultivierungsbedingungen auf die Kontamination von Pflanzen mit *Salmonella* ausüben. Daher soll untersucht werden, welche Eigenschaften und adhäsiven Strukturen von *S. enterica* Serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) maßgeblich an der

Kolonisierung in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen beteiligt sind.

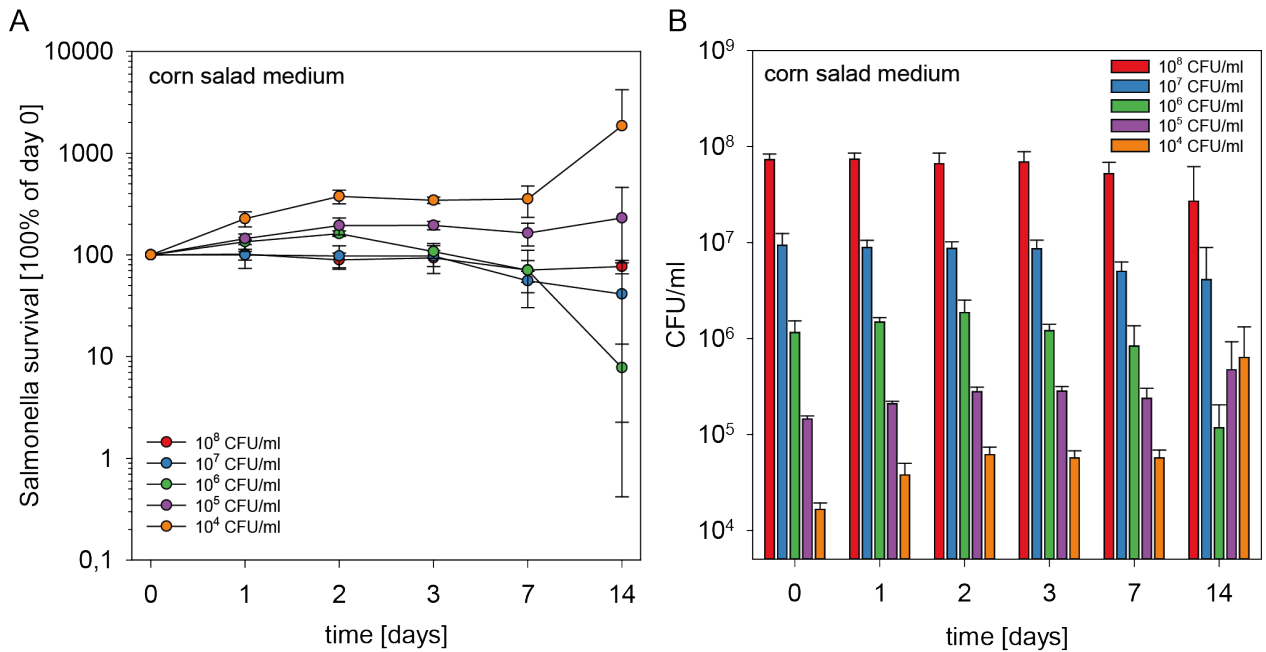


Abbildung 20: Überlebensrate von *S. enterica* Serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) in der Nährlösung einer hydroponischen Kultur für Feldsalat (*Valerianella locusta*) in Abhängigkeit von der applizierten Zellzahl von STM über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Ermittlung der Zellzahl (CFU/mL Nährlösung) von STM erfolgte in MS-basiertem Medium aus drei biologischen Replikaten (n=3) mit den jeweiligen Standardabweichungen. (A) Normierung der ermittelten CFU/mL Werte auf 100% der Start-Inokulation an Tag 0. (B) Ermittelte CFU/mL Werte der verschiedenen Start-Inokulationen im Verlauf der Zeit von Tag 0 bis Tag 14.

Die Anzucht von Feldsalat und Kopfsalat erfolgte in hydroponischer Kultur, deren Nährlösungen in der Zusammensetzung an das MS-Medium angepasst wurde. Zur Kultivierung im Boden wurde dieser zuvor autoklaviert und nachfolgend mit sterilem Leitungswasser bewässert. Die MS-basierte hydroponischen Nährlösungen zur Kultivierung von Feld- und Kopfsalat und der Boden wurden mit verschiedenen Zellzahlen (10⁴ bis 10⁸ CFU/mL) von *S. enterica* serovar Typhimurium Wildtyp (*S. Typhimurium*) inokuliert, um den Einfluss verschiedener Kontaminationsdichten auf die Überlebensrate von *S. Typhimurium* zu simulieren. Das Überleben von *S. Typhimurium* wurde in der hydroponischen Nährlösung und im Boden über einen Zeitverlauf von 1 Tag bis 42 Tagen kulturabhängig bestimmt (**Abb. 21 - 23**).

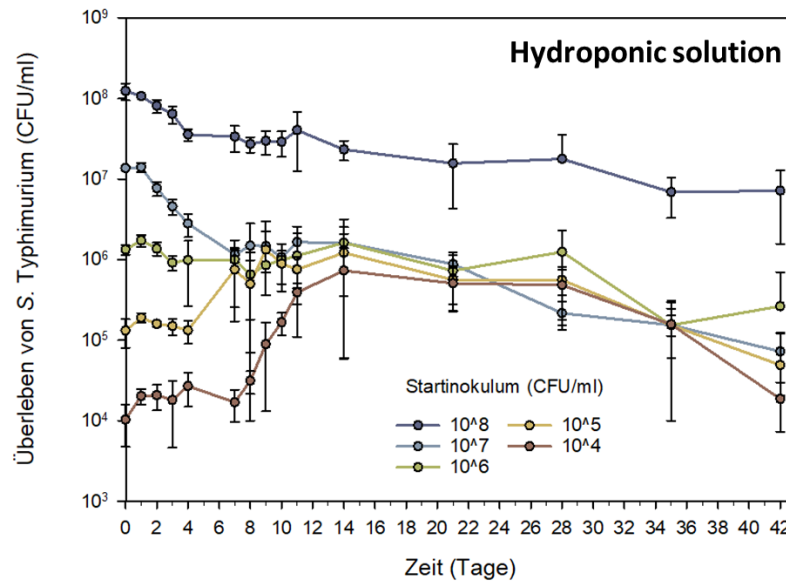


Abbildung 11: Überlebensrate von *S. enterica* Serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) in der Nährlösung einer hydroponischen Kultur für Kopfsalat (*Lactuca sativa*). Die Ermittlung der Zellzahl (CFU/mL Nährlösung) von Salmonella erfolgte in Medium aus drei biologischen Replikaten ($n=3$) mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die initiale Dichte der Kultur variierte zwischen 10^4 CFU/mL und 10^8 CFU/mL.

S. Typhimurium überlebt in MS-basierten hydroponischen Nährlösung für Feldsalat (*Valerianella locusta*; **Abb. 20**), und für Kopfsalat (*Lactuca sativa*; **Abbildung 11**) über einen Zeitraum von mehreren Wochen. Bei beiden hydroponischen Nährlösungen fällt auf, dass die geringste Start-Inokulation von 10^4 CFU/mL, sowie 10^5 CFU/mL über die Zeit einen stetigen Anstieg an koloniebildenden Einheiten (CFU) zeigt. Somit ist *S. Typhimurium* bei diesen Konzentrationen nicht nur fähig zu überleben, sondern auch sich zu vermehren. Die höheren Start-Inokulationen (10^6 - 10^8 CFU/mL) zeigten dieses Phänomen nicht, hierbei ist vielmehr ein Überleben, bzw. sogar ein Absterben sichtbar. Diese Unterschiede können zurückgeführt werden auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen, sodass bei den geringeren Start-Inokulationen genügend Nährstoffe für ein Wachstum vorhanden waren. Für die Bewässerung der Salatpflanzen wurde zunächst entschieden Leitungswasser zu verwenden. Es zeigte sich jedoch, dass bereits nach einem Tag keine koloniebildenden Einheiten (CFU) mehr im Leitungswasser nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Eine *Persister*-Bildung konnte zudem ausgeschlossen werden, da auch nach 16 h Inkubation der Proben bei 37°C in LB-Medium kein Wachstum festgestellt werden konnte. Daher wurde für die weiteren Experimente *phosphate-buffered saline* (PBS) verwendet. Es zeigte sich, dass die CFU-Zahlen für die verschiedenen Start-Inokula von PBS gleichbleibend waren und somit, weder ein Absterben, noch Replikation von *S. Typhimurium* stattfand (**Abb. 22**). In den folgenden Experimenten wurde somit PBS anstelle von Leitungswasser zur Bewässerung der Salatpflanzen verwendet.

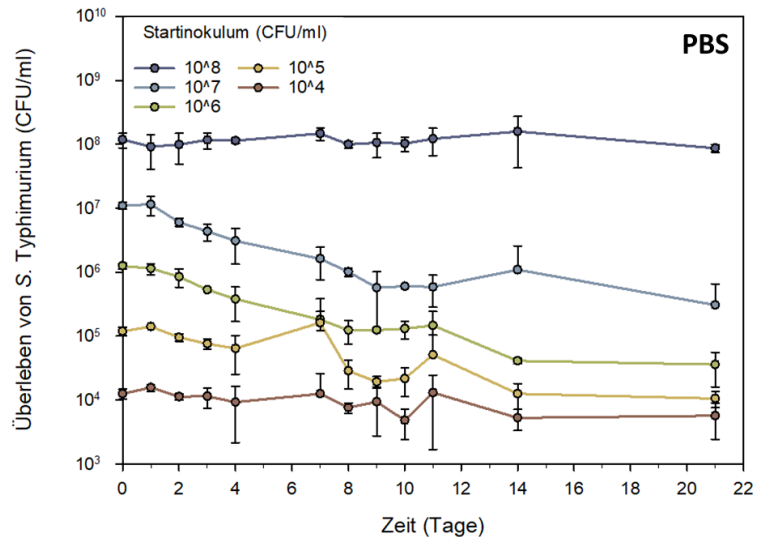


Abbildung 22: Überleben von *S. Typhimurium* in *phosphate-buffered saline* (PBS). Gezeigt sind die durch Ausplattieren ermittelten CFU/mL Zahlen für *S. Typhimurium* der verschiedenen Start-Inokulationen von Tag 0 bis Tag 22 aus drei biologischen Replikaten (n=3) mit den jeweiligen Standardabweichungen.

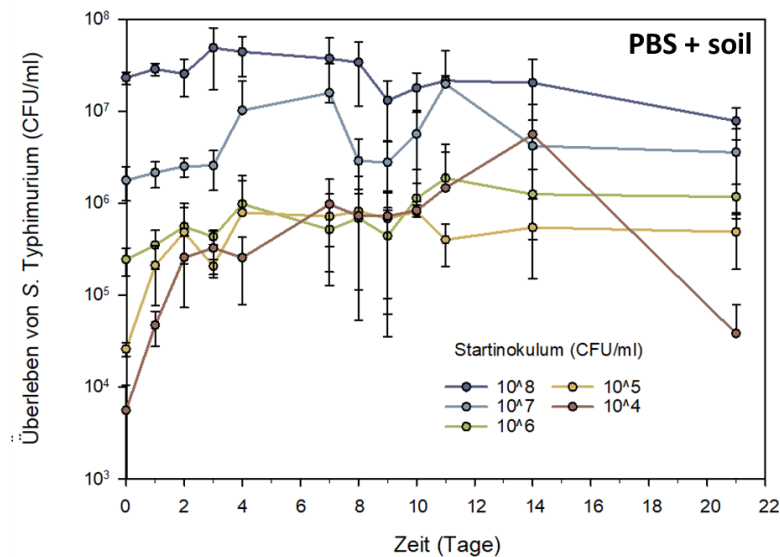


Abbildung 23: Überleben von *S. Typhimurium* in PBS und Erde. Gezeigt sind die durch Ausplattieren ermittelten CFU/mL Zahlen für *S. Typhimurium* der verschiedenen Start-Inokulationen von Tag 0 bis Tag 22 in PBS und Boden aus drei biologischen Replikaten (n=3) mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Im Weiteren wurde der Einfluss des verwendeten Bodens auf das Überleben von *S. Typhimurium* untersucht. Dafür wurde autoklavierte Boden mit *S. Typhimurium* inokuliert und über einen Zeitraum von 3 Wochen bei 21°C inkubiert. Nach Ausplattieren auf Agarplatten konnte für die geringeren Startinokula (10^4 bis 10^5 CFU/mL) ein ähnliches Phänomen beobachtet werden, wie schon

zuvor für die hydroponischen Nährlösungen: Es kam zu einem Anstieg der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) in den ersten 4 Tagen (**Abb. 23**). Für die höheren Startinokula (10^7 bis 10^8 CFU/mL) konnte nur ein leichter Anstieg der CFU-Zahlen beobachtet werden. Für alle Startinokula zeigte sich, dass nach einem Anstieg die CFU-Zahlen stabil blieben. Einzige Ausnahme bildet das Startinokulum 10^4 , welches nach 21 Tagen Inkubation einen starken Abfall zeigte im Vergleich zu dem Wert von Tag 14. Die MS-basierten hydroponischen Nährlösungen und PBS in Boden konnten somit für weiteren Untersuchungen der Kolonisierung der Rhizosphäre verwendet werden.

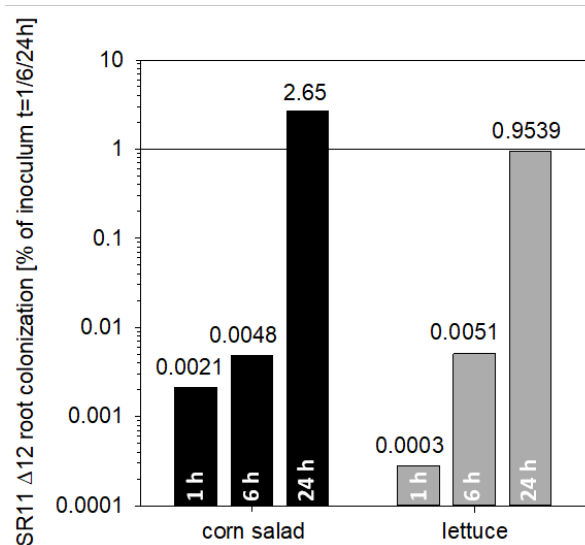


Abbildung 24: Kolonisierung der Rhizosphäre von Feldsalat (*Valerianella locusta*) und Kopfsalat (*L. sativa*) durch *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium SR11 Δ12 in Abhängigkeit von Zeit, in hydroponischer Anzucht. Gezeigt ist die jeweilige Kolonisierungsrate in % bezogen auf das Inokulum des jeweiligen Zeitpunktes ($n = 1$). Die Durchführung des Experimentes erfolgte, wie unter 2.2.5 beschrieben.

Um die Kolonisierung der Kulturpflanzen zu untersuchen wurden Feldsalat und Kopfsalat auf MS-basierter hydroponischer Nährlösung unter sterilen Bedingungen angezogen. Die entsprechende hydroponische Nährlösung wurde mit *Salmonella* inokuliert, und eine mögliche Kolonisierung der Rhizosphäre analysiert. Für eine erste Untersuchung wurde der Stamm SR11 Δ12 verwendet, welcher schon in *plantinfect* für die Experimente bezüglich der Adhärenz von *Salmonella* an Kopfsalatblättern und Feldsalatblättern verwendet wurde. Der Stamm SR11 Δ12 ist durch die Deletion aller 12 fimbriellen Operone gekennzeichnet (Elpers et al., 2020). Es konnte beobachtet werden, dass mit der Zeit (1 h, 6 h, 24 h) eine Zunahme der Kolonisierungsrate, sowohl für Feldsalat, als auch für Kopfsalat, stattfand (**Abb. 24**). Im Vergleich zwischen Feldsalat und Kopfsalat konnte zudem eine erhöhte Kolonisierungsrate für Feldsalat nach 24 h Inkubation beobachtet werden. Mögliche Faktoren sind die phänotypischen Ausprägungen der Wurzelsysteme (Wurzeldurchmesser, Wurzelgeflecht) und die Anwesenheit verschiedener phenolischen Komponenten im

Wurzelraum. Daraufgehend sollte untersucht werden, welche genetischen Eigenschaften von *Salmonella* einen Einfluss auf die Kolonisierung der Rhizosphäre der verschiedenen Pflanzen haben. Bereits in *plantinfect* zeigte sich die Flagellen-basierte Motilität als ein entscheidender Faktor in der Adhärenz von Salmonellen an Feldsalat- und Kopfsalatblättern (Elpers & Hensel, 2020, Elpers *et al.*, 2020). Die Deletionen $\Delta fliC \Delta fljB$ (Flagellen-loser, nicht-motiler Stamm) führten in dem hydroponischen System zu einer verringerten Kolonisierung von Feldsalatwurzeln (**Abb. 25**).

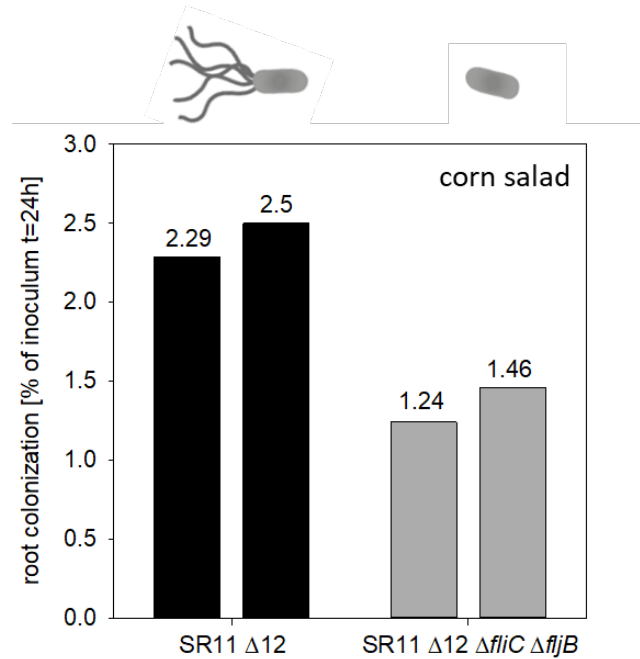


Abbildung 25: Kolonisierungsrate der Wurzeln von Feldsalat (*V. locusta*) durch *Salmonella* SR11 Δ12 und SR11 Δ12 $\Delta fliC \Delta fljB$ in hydroponischer Anzucht. Gezeigt sind die Kolonisierungsraten in % bezogen auf das Inokulum, 24 h nach Inokulationsstart für 2 zufällig gewählte Bereiche der Rhizosphäre einer Pflanze. Die Durchführung des Experimentes erfolgte, wie unter 2.2.5 beschrieben.

Im Verlauf des Projektes konnte am JKI-EP (Julius-Kühn-Institut) in Braunschweig ein optimiertes Protokoll zur hydroponischen Anzucht von Salatpflanzen unter sterilen Bedingungen etabliert werden. Dieses Protokoll wurde, leicht modifiziert, auch in Osnabrück verwendet (siehe 2.2.4 Die Kolonisierung der Rhizosphäre von hydroponisch angezogenem Kopfsalat mit dem neuen Protokoll wurde verglichen mit der Kolonisierung der Rhizosphäre von Kopfsalat nach Anzucht im Boden. Dafür wurden Kopfsalatpflanzen, welche in MS-basierter hydroponischer Nährlösung oder in Boden bei 20°C für 4 Wochen gewachsen sind, mit *S. Typhimurium* inokuliert ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/mL) und für 9 Tage bei 20°C mit einem 12 h/12 h Tag-Nacht-Rhythmus inkubiert (siehe 2.2.5). Anschließend wurden die Rhizosphäre-Proben homogenisiert und das Homogenat auf Agarplatten ausplattiert zur Bestimmung der CFU/mL Zahl. Es wurden vier biologische Replikate mit jeweils einer Salatpflanze mit jeweils drei zufällig gewählten Bereichen der Rhizosphäre durchgeführt. Die Kolonisierungsrate konnte wie folgt bestimmt werden:

$$\text{Kolonisierungsrate} = 0(\text{CFU/g Wurzel})/(\text{w} \times \text{v})A \times 100$$

Formel 1: Berechnung der Kolonisierungsrate in %. Gerechnet wurde mit $w = \text{CFU/mL}$ des Inokulums an Tag 0; mit $v = 400 \text{ mL}$ bei der hydroponischen Infektion und $v = 10 \text{ mL}$ bei der Infektion der Pflanzen, welche in Boden gewachsen sind.

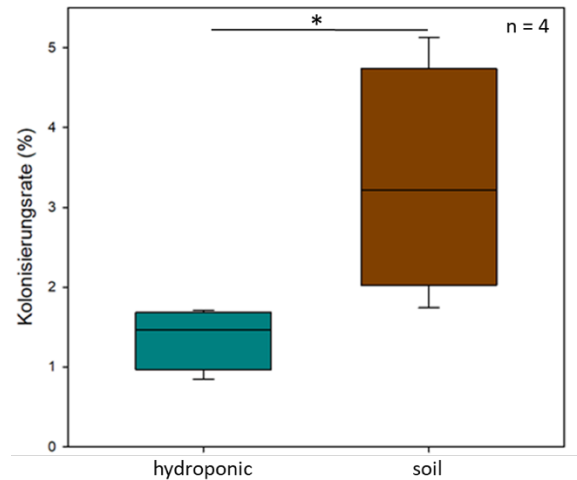


Abbildung 26: Kolonisierung der Rhizosphäre von Kopfsalat (*L. sativa*) durch *S. Typhimurium* im hydroponischen System und in Bodenanzucht. Dargestellt ist die Kolonisierungsrate der Rhizosphäre von Kopfsalat durch *S. Typhimurium* in % an Tag 9 bezogen auf das Inokulum von Tag 0. Gezeigt sind vier biologische Replikate mit jeweils einer Pflanze und jeweils mindestens zwei zufällig gewählten Wurzelstücken. Die Kolonisierungsrate wurde dabei auf die CFU/g Wurzel normiert. Die Signifikanz wurde mithilfe eines zweiseitigen ungepaarten T-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

Im Verlauf des Experiments konnten makroskopisch keine Unterschiede der Kopfsalatpflanzen zwischen Tag 0 (Start des Experimentes) und Tag 9 (Ende des Experimentes) erkannt werden, die durch die Inokulation mit *S. Typhimurium* hervorgerufen hätten werden können (**Abb. 27**).

In **Abbildung 26** sind die gemittelten Kolonisierungsrate der Rhizosphäre durch *S. Typhimurium* während der hydroponischen Anzucht und der Erdanzucht von Kopfsalat zu sehen. Die Kolonisierungsrate der Rhizosphäre durch *S. Typhimurium* betrug bei der hydroponischen Anzucht 1,4% bezogen auf das Inokulum am Tag 9. Für die Rhizosphäre der Kopfsalatpflanzen aus der Bodenanzucht zeigte sich eine Kolonisierungsrate von 3,3% für *S. Typhimurium*. Ein Vergleich der Kolonisierungsraten zeigt unter den gewählten Bedingungen einen statistisch signifikanten Unterschied. Dieser Vergleich zeigt, dass die Anzuchtvariante einen Einfluss auf die Kolonisierung der Rhizosphäre durch *Salmonella* haben kann. Da es sich in den hier durchgeführten Experimenten jedoch um eine Labor-basierte Anzucht handelt, müssen die Ergebnisse zunächst im Weiteren in einem größeren Maßstab validiert werden. Dabei wird ein entscheidender Faktor vermutlich, das Mikrobiom des Bodens sein.

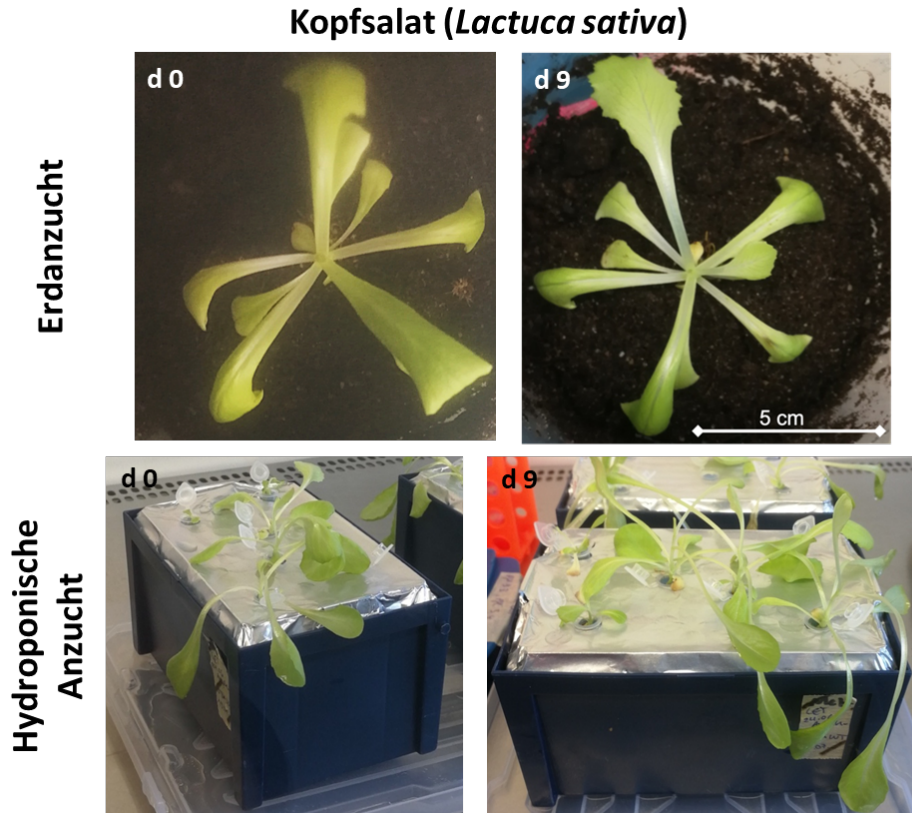


Abbildung 27: Kopfsalat (*L. sativa*) während der experimentellen Untersuchung zur Kolonisierung der Rhizosphäre durch Salmonellen. während Gezeigt sind Pflanzen während der Anzucht im Boden und im hydroponischen System. Die Inokulation des Bodens oder des Nährmediums erfolge an Tag 0 (d 0). Pflanzen 9 Tage nach der Inkubation (d 9) zeigten keine Infektionssymptome.

3.2.5 Transkriptomanalyse

Um zu analysieren, welche genetischen Faktoren während der Persistenz von *E. coli* im Boden eine Rolle spielen, wurden Transkriptomanalysen im Boden-Mikrokosmos Modell durchgeführt. Da *E. coli* O104:H4 C227/11Φcu das beste Überleben in AL Boden bei 4°C zeigten, wurde diese Bedingung für die Durchführung der Transkriptomanalyse gewählt. Durch die differentielle Genexpressionsanalyse konnten Gene identifiziert werden, die unter den gewählten Versuchsbedingungen unterschiedlich reguliert wurden. Dabei wurde insbesondere nach Genen gesucht, die für die Anpassung, das Überleben und die Persistenz in der Bodenumgebung entscheidend sind. Die Transkriptionsmuster der Proben wurden zu den Zeitpunkten 1 Woche und 4 Wochen analysiert und mit denen zum Zeitpunkt 0 verglichen. Die Genexpressionsanalyse ergab, dass 1509 Gene nach 1 Woche im Boden signifikant differentiell exprimiert wurden. Im Einzelnen wurden 756 Gene herunterreguliert und 753 Gene hochreguliert. Nach 4 Wochen waren 1507 Gene signifikant differentiell reguliert. Davon wurden 740 Gene runter- und 767 Gene hochreguliert.

Durch eine „gene enrichment“ Analyse konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Gen-Sets für

Aminosäuretransport, Glykolat- und Glyoxylat-Metabolismus, Nitratreduktion sowie von SOS-Antwort nach 1 und 4 Wochen vermehrt hochreguliert wurden. Zusätzlich waren nach 4 Wochen Gene für Resistenzproteine, RNA- und DNA-Bindung, Zelladhäsion und Adhäsion, die an der Biofilmbildung beteiligt sind, angereichert.

Ausgehend davon werden in den nachfolgenden Abschnitten die Ergebnisse der differentiellen Genexpressionsanalyse in Bezug auf Stressantwort, Aminosäuretransport und Biosynthese sowie der Verwendung alternativer C- und N-Quellen zur Energiegewinnung dargestellt.

3.2.5.1 Stressantwort

Die differenzielle Expressionsanalyse ergab, dass *E. coli* C227/11Φcu die Expression verschiedener stressbezogener Gene während der Persistenz im AL Boden bei 4°C erhöhte. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 11** dargestellt.

Tabelle 11: Stress-assoziierte Gene von *E. coli* O104:H4 C227/11Φcu die während der Persistenz in autoklaviertem AL-Boden bei 4°C differentiell exprimiert wurden.

Gene	Beschreibung	*Log ₂ FC	
		1 Woche	4 Wochen
<i>hsA</i>	multiple stress resistance protein BhsA	-7.59	n.d.e.
<i>bsmA</i>	biofilm peroxide resistance protein BsmA	2.96	3.01
<i>cspD</i>	cold shock-like protein CspD; DNA replication inhibitor	4.10	1.89
<i>pspA</i>	phage shock protein PspA	-1.58	3.89
<i>pspB</i>	envelope stress response membrane protein PspB	n.d.e.	3.94
<i>pspC</i>	envelope stress response membrane protein PspC	n.d.e.	4.65
<i>pspD</i>	phage shock protein PspD	n.d.e.	4.53
<i>pspF</i>	phage shock protein operon transcriptional activator	-2.13	3.94
<i>pspG</i>	envelope stress response protein PspG	n.d.e.	4.05
<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma factor RpoS	2.42	3.23
<i>uspD</i>	universal stress protein UspD	1.62	2.11

*n.d.e = not differentially expressed (nicht differentiell exprimiert)

Wie in **Tabelle 11** gezeigt, wurden bereits nach der 1 Woche einige Stress-assoziierte Gene hochreguliert. Nach 4 Wochen wurden mehr Gene hochreguliert. Anhand dieser Daten wird deutlich, dass die Stressantwort eine große Rolle für die Persistenz im Boden spielt. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Inkubation in AL-Boden zu einer erhöhten Expression verschiedener stressbezogener Faktoren führt und *E. coli* im Boden mit Stresssituationen wie Nährstoffmangel umgehen muss. Durch die Hochregulierung verschiedener Stressreaktionsmechanismen ermöglicht die Anpassung an ungünstige Bedingungen wie z.B. an Nährstoffmangel.

3.2.5.2 Aufnahme und Biosynthese von Aminosäuren

Die „*gene enrichment*“ Analyse ergab, dass Gene für Aminosäure-Transportsysteme nach 1 Woche stark hochreguliert wurden. Nach 4 Wochen sind die meisten Gene nicht mehr differentiell exprimiert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 12** zusammengefasst.

Tabelle 12: Differentiell exprimierte Gene, die mit dem Aminosäuretransport aus der Umgebung in die Bakterienzelle korrelieren.

Aminosäure Transport		*Log ₂ FC	
Gene	Beschreibung	1 Woche	4 Wochen
<i>glnP</i>	glutamine ABC transporter permease GlnP	2.23	n.d.e.
<i>hisP</i>	histidine ABC transporter ATP-binding protein HisP	1.84	n.d.e.
<i>yecC</i>	L-cystine ABC transporter ATP-binding protein YecC	2.61	2.40
<i>argT</i>	lysine/arginine/ornithine ABC transporter substrate-binding protein ArgT	2.88	n.d.e.
<i>artJ</i>	arginine ABC transporter substrate-binding protein	2.86	n.d.e.
<i>artM</i>	arginine ABC transporter permease ArtM	2.55	n.d.e.
<i>artP</i>	arginine ABC transporter ATP-binding protein ArtP	2.09	n.d.e.
<i>artQ</i>	arginine ABC transporter permease ArtQ	3.34	n.d.e.
<i>cycA</i>	D-serine/D-alanine/glycine transporter	1.53	n.d.e.
<i>sstT</i>	serine/threonine transporter SstT	2.07	n.d.e.

*n.d.e = not differentially expressed (nicht differentiell exprimiert)

Da die Gene für Aminosäure-Aufnahme nach 1 Woche hochreguliert wurden, wurde angenommen, dass nach 4 Wochen keine freien Aminosäuren mehr zur Verfügung stehen. Um den Gehalt an Aminosäuren zu untersuchen, wurde die Konzentration freier Aminosäuren im AL Boden untersucht. Dabei konnte der Gehalt an Aminosäuren mit der Hochregulierung von Transportsystemen und Biosynthese von Aminosäuren korreliert werden. Die Ergebnisse der Analyse sind in **Tabelle 13** dargestellt.

Tabelle 13. Aminosäureanalyse von Alluvial Lehm.

Aminosäure	Konzentration [mg/g AL]	Aminosäure	Konzentration [mg/g AL]
Alanin	0.2	Lysin	0.2
Arginin	0.1	Methionin	0.04
Asparaginsäure	0.6	Phenylalanin	0.2
Cystein	0.1	Prolin	0.2
Glutaminsäure	0.5	Serine	0.2
Glycin	0.4	Threonin	0.2
Histidin	0.1	Tryptophan	<0.1
Isoleucin	0.1	Tyrosine	0.04
Leucin	0.2	Valin	0.2

Die Konzentration von allen Aminosäuren bis auf Methionin, Tyrosin und Tryptophan liegt über 0,1 mg/g AL-Boden. Dementsprechend war die Aufnahme von Methionin, Tyrosin und Tryptophan nicht hochreguliert. Im Gegensatz dazu wurden aber Gene für die Biosynthese von z.B. Tryptophan hochreguliert.

3.2.5.3 Alternative Stickstoffquellen im Boden

Stickstoff ist ein wesentlicher Bestandteil von Aminosäuren, Coenzymen, Nucleinsäuren und Polyaminen und ist für das bakterielle Wachstum essentiell. In **Abbildung 28** ist schematisch der Abbau von verfügbaren Stickstoffquellen abgebildet.

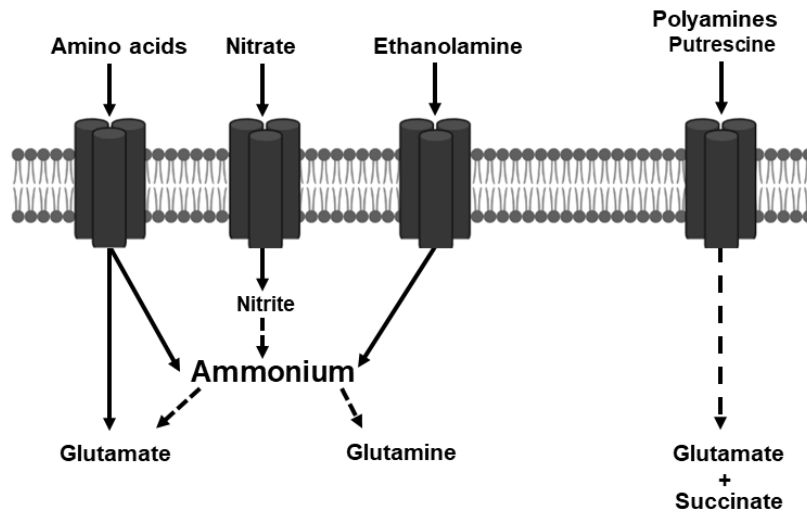


Abbildung 28: Schematisch dargestellte Wege der Stickstoffquellen, die in *E. coli* C227/11Φcu während der Persistenz in AL hochreguliert wurden.

Die Expressionsanalyse hat gezeigt, dass Gene die Enzyme zur Bildung von Ammonium und anderen N-Quellen aus Aminosäuren, Nitrat, Ethanolaminen und Polyaminen kodieren, hochreguliert waren. Die differentiell exprimierte Gene für den Metabolismus der Stickstoffquellen sind in **Tabelle 14** dargestellt.

Tabelle 14: Differentiell exprimierte Gene, die mit dem Metabolismus alternativer N-Quellen korrelieren.

Gene	Beschreibung	*Log ₂ FC	
		1 Woche	4 Wochen
Nitratreduktion zu Nitrit			
<i>narH</i>	nitrate reductase subunit beta	6.90	5.49
<i>narI</i>	respiratory nitrate reductase subunit gamma	6.40	4.64
<i>narL</i>	two-component system response regulator NarL	1.50	2.34
<i>narU</i>	nitrate/nitrite transporter NarU	5.14	4.86
<i>narW</i>	nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone	7.53	5.98
<i>narZ</i>	nitrate reductase Z subunit alpha	6.23	5.27
Reduktion von Ethanolamine			
<i>eutA</i>	ethanolamine ammonia-lyase reactivating factor EutA	2.93	3.51
<i>eutB</i>	ethanolamine ammonia-lyase subunit alpha	4.46	4.00
<i>eutC</i>	ethanolamine ammonia-lyase subunit beta	3.67	2.90
<i>eutK</i>	ethanolamine utilization microcompartment protein EutK	4.38	3.02
<i>eutL</i>	ethanolamine utilization microcompartment protein EutL	4.06	2.90
Aufnahme und Abbau von Polyaminen			
<i>potB</i>	spermidine/putrescine ABC transporter permease PotB	n.d.e.	2.16

<i>potC</i>	spermidine/putrescine ABC transporter permease PotC	n.d.e.	2.99
<i>potD</i>	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein	2.35	3.29
<i>potF</i>	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein	2.69	2.99
<i>potG</i>	putrescine ABC transporter ATP-binding subunit	3.13	2.07
<i>potH</i>	putrescine ABC transporter permease	3.09	2.44
<i>potI</i>	putrescine ABC transporter permease	3.66	3.09
<i>puuE</i>	4-aminobutyrate transaminase	2.87	n.d.e.
<i>patA</i>	putrescine aminotransferase	n.d.e.	2.77
<i>gabT</i>	4-aminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase	6.83	2.03
Abbau von Aminosäuren			
<i>tnaA</i>	tryptophanase	3.00	n.d.e.
<i>sdaA</i>	L-serine ammonia-lyase	n.d.e.	1.63
<i>sdaB</i>	L-serine ammonia-lyase II	2.01	n.d.e.

*n.d.e = not differentially expressed (nicht differentiell exprimiert)

Die Analyse hat gezeigt, dass Gene des *nar*-Operons nach 1 und 4 Wochen stark hochreguliert wurden. Dadurch wird Nitrat, welches durch die Düngung in den Boden gelangt, zu Nitrit reduziert. Nitrit kann weiter zu Ammonium abgebaut werden. Weitere alternative N-Quellen in Böden scheinen Ethanolamine, Polyamine und Aminosäuren zu sein. Die Aufnahme und der Abbau von z.B. Putrescin ist an beiden Zeitpunkten hochreguliert. Putrescin wird zunächst in 4-Aminobutyrat (GABA) umgewandelt, das weiter zu Glutamat und Succinat metabolisiert werden kann.

3.2.5.4 Alternative Kohlenstoffquellen im Boden

Die Expressionsanalyse zeigte weiterhin, dass Genen, die mit dem Verbrauch von Acetat, Laktat, Glykolat, Fettsäuren und Aminosäuren als Kohlenstoffquelle für die Energiegewinnung verbunden sind, hochreguliert wurden. **Abbildung 29** zeigt die schematisch die Verstoffwechslung von verschiedenen alternativen Kohlenstoffquellen im Boden.

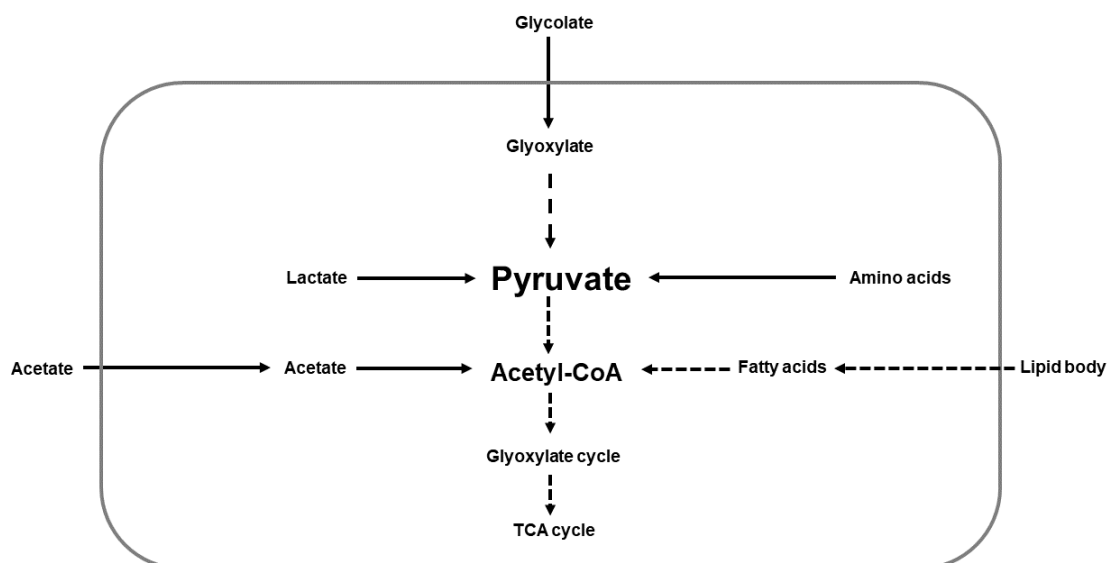


Abbildung 29: Schema der hochregulierten Gene für die Erzeugung von Pyruvat und Acetyl-CoA aus verschiedenen Kohlenstoffquellen in autoklavierten AL-Böden.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigten, dass Gene für die Aufnahme von Acetat (*actP*) und für die Umwandlung von Acetat in Acetyl-CoA (*acs*) nach 1 und 4 Wochen stark hochreguliert sind (Tabelle 15).

Tabelle 15: Differenziell exprimierte Gene, die mit dem Metabolismus vom Acetat als alternative C-Quelle korrelieren.

Gene	Beschreibung	*Log ₂ FC	
		1 Woche	4 Wochen
Acetat Umwandlung zu Acetyl-CoA			
<i>actP</i>	acetate symporter ActP	6.73	2.17
<i>acs</i>	acetate--CoA ligase	5.39	2.12
<i>ackA</i>	acetate kinase	3.25	2.96

*n.d.e = not differentially expressed (nicht differentiell exprimiert)

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass Acetat eine wichtige Kohlenstoffquelle im AL-Boden ist, und dass die Persistenz von *E. coli* O104:H4 str. C227/11Φcu durch Deletion von *acs* reduziert wird. Um diese Annahme zu prüfen, wurde eine Deletionsmutante von C227/11Φcu hergestellt und das Überleben in AL untersucht. Bodenproben von AL und autoklavierten AL wurden mit 10⁸ CFU/g Boden von *E. coli* O104:H4 str. C227/11Φcu oder der entsprechenden *acs*-Deletionsmutante beimpft. Die Proben wurden entweder bei 22°C oder 4°C inkubiert, und die CFU-Zahl am Tag der Inokulation sowie nach 1 und 4 Wochen bestimmt. Die Ergebnisse aller vier Temperatur/Boden-Kombinationen sind in **Abbildung 30** dargestellt.

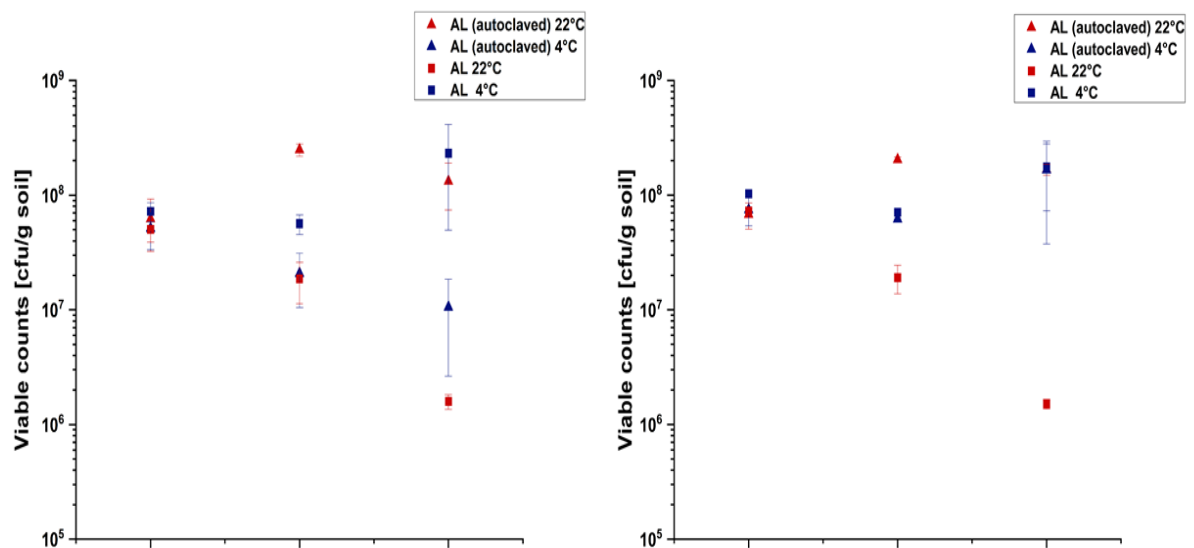


Abbildung 30: Überleben von (A) *E. coli* O104:H4 C227/11Φcu und (B) der Δ *acs* Deletionsmutante in Abhängigkeit von Bodentyp und Temperatur. 25 g AL-Boden oder autoklavierter AL-Boden wurde mit 10⁸ CFU/g beimpft und für 4 Wochen inkubiert. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) pro Gramm Boden wurde nach 0, 1 und 4 Wochen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten.

Mit den Versuchen konnten wir keine Unterschiede in der Überlebensrate zwischen C227/11Φcu (**Abb. 30A**) und der *acs*-Deletionsmutante (**Abb. 30B**) feststellen. Zwischen den Kultivierungsbedingungen gab es Unterschiede, jedoch war dann die Abnahme der CFU-Zahl zwischen Wildtyp und Mutante identisch. Die Ergebnisse reproduzierten auch die zu Beginn des Projekts durchgeführten Versuche (siehe 3.1.1). Da kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem mutierten Stamm festgestellt werden konnte, wurde angenommen, dass die Deletion die Bodenpersistenz des verwendeten EHEC-Stammes nicht beeinträchtigt.

Zusätzlich zur Acetatumbildung wurden Gene, die mit dem Glyoxylatzyklus, dem Glykolatabbau und der β -Oxidation von Fettsäuren verbunden sind, an beiden Zeitpunkten hochreguliert. Darüber scheint der Laktatabbau nach 1 Woche als weitere Energiequelle im Boden zu fungieren. Nach 4 Wochen werden die Gene für die Aufnahme von Laktat und die Umwandlung in Pyruvat nicht mehr differentiell exprimiert. Folglich wurden verschiedene Gene für weitere Kohlenstoffquellen ausschließlich nach 4 Wochen hochreguliert. Hier wurden Gene für den L-Ascorbat-Abbau wie *ulaA* ($\log_2FC = 3,19$) und *ulaG* ($\log_2FC = 3,22$) hochreguliert. Darüber hinaus wurde Xylukinase, die am Abbau von D-Xylulose beteiligt ist, nach 4 Wochen hochreguliert ($\log_2FC = 1,80$). Durch den Vergleich der Zeitpunkte 1 Woche und 4 Wochen wurde deutlich, dass Gene für die Aminosäureaufnahme (**Tabelle 12**) und den Aminosäureabbau (**Tabelle 13**) sowie Gene für die Nutzung von Laktat oder Glykolat als C-Quelle nach 4 Wochen nicht mehr differenziell exprimiert wurden. Stattdessen fanden wir nach 4 Wochen die Hochregulierung von Genen, die mit Chemotaxis und Motilität korrelieren.

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse haben gezeigt, dass der Stamm C227/11Φcu in der Lage ist, sich an die Bedingungen eines typischen landwirtschaftlichen Bodens anzupassen und bei geringer Nährstoffverfügbarkeit und unter hohen Stressbedingungen überlebt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Überleben in Böden nicht sero- oder pathotyp-spezifisch ist. Wir haben keine Hochregulierung von stammspezifischen Virulenzfaktoren gefunden. Darüber hinaus spielen vor allem allgemeine Stoffwechselwege, die in den meisten *E. coli* kodiert sind, eine Rolle für das Überleben. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, sollte die Persistenz verschiedener Serotypen analysiert werden.

3.2.6 Etablierung einer mTn5-Mutantenbank zur Ermittlung von essenziellen genetischen Faktoren für *Salmonella* in hydroponischer Anzucht

Auf Grundlage des hier etablierten Versuchsaufbaus zur hydroponischen Infektion von Salatpflanzen und den ersten Hinweisen, dass unter den verschiedenen Anzuchtbedingungen und möglichen Umweltbedingungen viele verschiedene Gene in der Infektion involviert sind, wurde ein Protokoll entwickelt, welches eine schnelle und umfangreiche Analyse aller Gene von *Salmonella*

enterica ermöglicht. Hierfür wurde eine *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) mTn5-Mutantenbank erstellt. Diese umfasst Deletionen in allen Genen des Chromosoms von *S. Typhimurium*. Diese sind durch das eingeführte Transposom individuell und auf eindeutiges Gen zurückführbar. Der Ablauf dieses Protokolls ist schematisch in **Abbildung 31** dargestellt. Die hergestellte mTn5-Mutantenbank wird für Kolonisierung von Salatpflanzen eingesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 9 Tagen werden die Wurzeln gewaschen um nicht-gebundene Salmonellen zu entfernen. Die gebundenen Salmonellen werden in einem Vollmedium angereichert und die genomische DNA mittels des „NucleoSpin Microbial DNA Mini kit for DNA from microorganisms“ von Machery-Nagel extrahiert. Dies passiert zudem zusätzlich für die Ausgangs mTn5-Mutantenbank, als auch für das eingesetzte Inokulum am Tag 0 und extrahierten Proben vom Tag 9. Die extrahierte genomische DNA wird weiter aufbereitet für die anschließende Sequenzierung mittels der *Next-Generation Sequencing*, Methode Nanoporen Sequenzierung. Die erhaltenen Daten können vergleichend verwendet werden, um auszumachen, welche deletierten Gene zu einem Kolonisierungsvorteil dienen, und welche deletierten Gene einen Nachteil in der Kolonisierung der Rhizosphäre von Salatpflanzen aufweisen. Bisher konnte im Verlauf dieses Projekts die mTn5- Mutantenbank erstellt werden, erste Kolonisierungsexperimente an hydroponisch angezogenen Kopfsalatpflanzen durchgeführt werden und genomische DNA extrahiert werden. Mit der Endphase von *plantinfect-2* stehen wir nun kurz vor der Sequenzierung unserer Proben. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse kann die Kolonisierung der Rhizosphäre durch *S. Typhimurium* im Detail nachvollzogen werden und möglicherweise Pflanzenschutzmaßnahmen ergriffen werden.

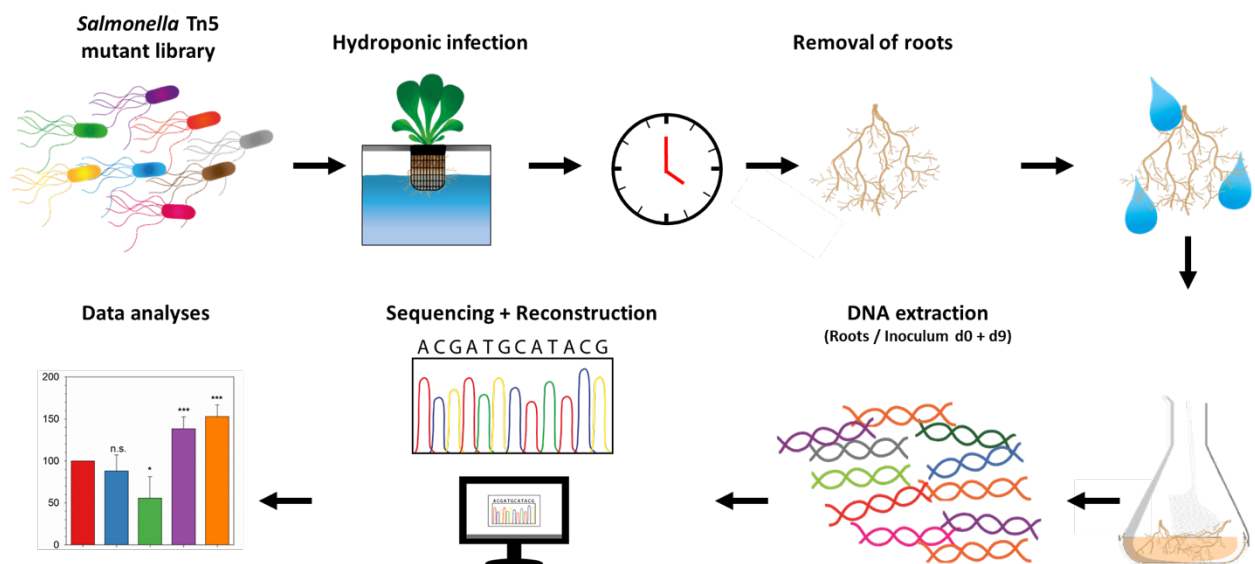


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Ablaufes zur Sequenzierung-basierter Analyse der Kolonisierung der Rhizosphäre von Salatpflanzen durch Salmonellen.

3.2.7 Besiedlung von Kulturpflanzen durch EHEC

Im vorangegangenen Projekt *plantinfect* konnte gezeigt werden, dass EHEC an die Wurzeln von Kulturpflanzen adhären und in diese internalisieren kann. In *plantinfect-2* sollte nun geklärt werden, ob internalisierte Bakterien die essbaren Teile von Feldsalat besiedeln. Dazu wurden sterile Feldsalat-Samen in autoklaviertem AL- oder DS-Böden oder in MS-Agar kultiviert und nach 3 Wochen mit *E. coli* O104:H4 str. C227/11Φcu inokuliert. Nach 2, 4 und 8 Wochen wurden die Phyllosphäre des Feldsalats wie unter 2.4 beschrieben auf die Besiedlung mit EHEC-Bakterien untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 32** dargestellt.

Diluvial Sand					
Woche	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Replik 4	ΣKbE/g
2	-	0	0	2.5×10^1	8.0
4	0	0	0	0	0
8	2.0×10^3	0	0	0	5.0×10^2

Anzahl an Proben: 22
Positive Proben: 2
→ Wiederfindungsrate: 9%

Alluvial Lehm					
Woche	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Replik 4	ΣKbE/g
2	-	0	0	0	0
4	1.3×10^1	0	0	1.3×10^1	6.3
8	0	0	0	6.9×10^3	5.0×10^2

Anzahl an Proben: 22
Positive Proben : 3
→ Wiederfindungsrate: : 13.5%

MS Agar					
Woche	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Replik 4	ΣKbE/g
2	-	3.6×10^3	0	1.1×10^3	1.6×10^3
4	2.5×10^1	0	1.5×10^2	0	4.4×10^1
8	0	0	0	0	0

Anzahl an Proben: 22
Positive Proben : 6
→ Wiederfindungsrate: 27%

* Technische Replikate waren beide positiv

Abbildung 32: Besiedlung von Feldsalat (*V. locusta*) durch *E. coli* O104:H4 str. C227/11Φcu. Die Tabellen zeigen die berechneten CFU-Zahlen der vier biologischen Replikate (mit je zwei technischen Replikaten) sowie den Mittelwert zu dem jeweiligen Zeitpunkt. Ausgehend von der Anzahl der positiven Proben wurde die Wiederfindungsrate in Bezug auf die Gesamtzahl der untersuchten Proben bestimmt.

Wie in der **Abbildung 32** dargestellt, wurden unter allen getesteten Bedingungen positive Proben gefunden. Damit haben die durchgeführten Pflanzenversuche gezeigt, dass der getestete EHEC-Stamm die essbaren Teile von Feldsalat unter den gewählten Bedingungen besiedeln kann. Die höchste Wiederfindungsrate wurde für Feldsalat, der in MS-Agar kultiviert wurde, gefunden. Auch bei den weiteren Proben konnte gezeigt werden, dass der getestete EHEC-Stamm ausgehend von kontaminiertem Boden die essbaren Teile von Feldsalat besiedeln kann. Dabei wurde im Falle von positiven Proben, die beschriebene Infektionsdosis von 10 bis 100 Bakterien überschritten.

3.3 Rolle des Ernährungszustands und der Temperatur auf die Besiedlung der Pflanze (AP3)

3.3.1 Einfluss von pflanzlichem Nährstoffmangel auf die Kolonisierung und Persistenz von *Salmonella enterica*

Nährstoffe spielen eine wichtige Rolle für die Gesundheit und das Wachstum von Pflanzen. Ein wichtiger Faktor, der die Resistenz der Pflanzen gegenüber Krankheitserregern beeinflusst, ist daher der Ernährungszustand. Nährstoffmangel verursacht Stress und führt zu Änderungen in den pflanzlichen Abwehrreaktionen. In diesem Arbeitspaket wurden die Auswirkungen von Nährstoffmangel auf die Kolonisierung von Kulturpflanzen mit Salmonellen und deren Persistenz untersucht. Einer dieser wichtigen Mikronährstoffe ist Eisen (Fe), das sowohl für Pflanzen als auch für Bakterien essenziell ist. Obwohl Eisen das am vierthäufigsten vorkommende Element in der Erdkruste ist, ist seine Bioverfügbarkeit in aerober Umgebung sehr gering. Frühere Ergebnisse von *plantinfect* zeigten, dass *Salmonella* im Kopfsalat die Expression von Eisenhomöostasis-assoziierten Genen verändert. Es ist auch zu erwähnen, dass Eisen eine wichtige Voraussetzung für die Virulenz von *Salmonella* darstellt. Es galt zu untersuchen, ob Eisenmangel die Kolonisierungsrate durch HPB beeinflusst. Unsere Hypothese war, dass Eisenmangel die Fähigkeit der Pflanze mindert, auf die Besiedlung durch *Salmonella* zu reagieren.

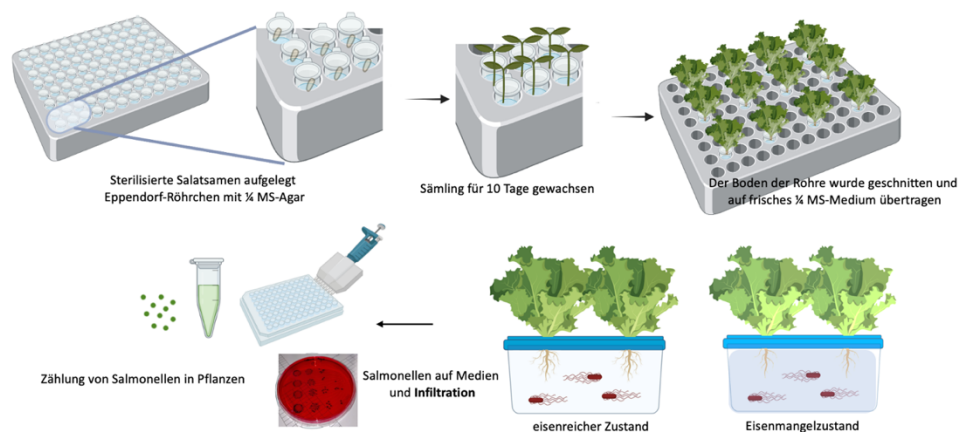


Abbildung 33: Versuchsaufbau eines kontrollierten sterilen Hydrokulturversuchs von Kopfsalat (*L. sativa*), zur Bewertung der Auswirkungen von Eisenmangel auf die Persistenz und Kolonisierung von *Salmonella* in Salat.

Um diese Aspekte zu untersuchen, wurden sowohl physiologische als auch genetische Ansätze verwendet. Zunächst wurde in einem hydroponischen System (*hydroponics*) mit sterilisierten Salatsamen gearbeitet. Diese wurden für die Anzucht der Salatpflanzen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt mit ¼ MS-Agar ausgesät. Nach zehn Tagen wurde die Spitze der Reaktionsgefäße abgeschnitten und die Röhrchen wurden in frisches ¼ MS-Medium umgesetzt, um die Wurzelbildung

der Salatpflanzen im hydroponischen System zu ermöglichen. Nach einer weiteren Woche wurden die Pflanzen in eisenreiche (Fe+; 40µM FeEDTA) oder eisenarme (Fe-) Bedingungen aufgeteilt. Eine Woche später wurden beide Eisenmedientypen mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm 14028s (*S. Typhimurium* 14028s) mit einer Konzentration (OD_{600}) von 0,1 inokuliert und für eine weitere Woche kultiviert. Um die Besiedlungsrate von Salatpflanzen durch *Salmonella* unter Fe- und Fe+ Bedingungen zu ermitteln, wurden die Blätter der Pflanzen beprobt. Parallel wurden Blätter mit *S. Typhimurium* 14028s ($OD_{600} = 0,01$) infiltriert und über einen Zeitraum von drei Wochen beprobt. Die Persistenz von *Salmonella* in den Blättern wurde zwischen Pflanzen verglichen, die unter eisenlimitierenden (Fe-) oder eisenreichen (Fe+) Bedingungen kultiviert wurden (**Abb. 34**).

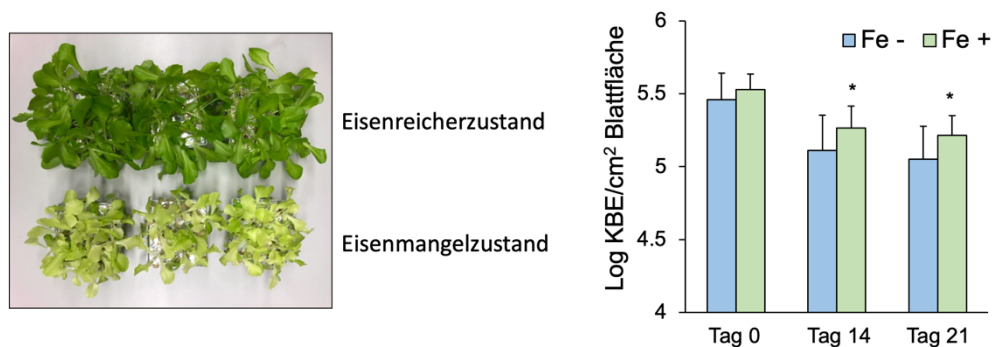


Abbildung 34: Eisenmangel hat Einfluss auf die Persistenz von *Salmonella* in Salat (*L. sativa*). Zwischen Fe+ (Kontrolle) und Eisen-defizienten (Fe-) Pflanzen wurden signifikanten Unterschiede in der Persistenz von *Salmonella* (log KBE/cm² Blatt) über den Zeitraum von 3 Wochen festgestellt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) von unabhängigen biologischen Replikaten dar. Ein Stern (*) repräsentiert dabei einen statistischen Unterschied bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ im Students *t*-Test. Es wurden repräsentative Bilder von Kopfsalat unter beiden Wachstumsbedingungen gezeigt. Die Bilder wurden zwei Wochen nach der Infiltration mit *S. Typhimurium* 14028s aufgenommen.

Pflanzen die unter eisenlimitierenden Bedingungen (Fe-) kultiviert wurden zeigten einen deutlich unterschiedlichen Phänotyp als Pflanzen, welche unter Kontrollbedingungen (Fe+) angezogen wurden. Die Kontrollpflanzen waren grün und hatten entwickelte Blätter, während die eisendefizienten Salatpflanzen (Fe-) Chlorosen zeigten und kleinere Blätter hatten. Nach der Infiltration konnte *Salmonella* mit ca. 10^5 CFU/cm² der Blattoberfläche nachgewiesen werden. Die Koloniezahl war bis 21 Tage nach der Infiltration relativ stabil. Dennoch beobachteten wir nach 14 Tagen

Unterschiede in der Persistenz von Salmonellen in den infiltrierten Blättern eisendefizienter Pflanzen, da die bakterielle Population geringer war als in Blättern der Kontrollpflanzen. Dieser statistisch signifikante Unterschied war auch 21 Tage nach der Infiltration noch vorhanden (**Abb. 34**).

Um den Einfluss des Ernährungszustandes der Pflanze auf die Kolonisierungsrate mit *Salmonella* zu bestimmen, wurde im hydroponischen System die Kolonisierung über das Wurzelsystem in eisendefizienten (Fe-) Salat und Kontrollpflanzen (Fe+) in vier unabhängigen Experimenten untersucht. Pflanzen, die unter eisenlimitierenden und Kontrollbedingungen wuchsen, wurden für eine Woche in frische Flüssigmedien überführt, die mit Salmonellen in einer Endkonzentration von OD₆₀₀ 0,1 inokuliert wurden. Die Kolonisierungsrate der Pflanzen mit *Salmonella* wurde nach einer Woche bestimmt (**Tabelle 16**). Im ersten Versuch zeigten die Kontrollpflanzen mit 65% eine höhere Kolonisierungsrate mit *Salmonella* als eisendefiziente Pflanzen mit 40%, während im zweiten Versuch gegenteilige Ergebnisse beobachtet wurden und die Kolonisierungsrate von eisendefizientem Salat höher war (55%) als in Kontrollpflanzen (35%) (**Tabelle 16**). Ähnlich wie im ersten Versuchsdurchgang war die Kolonisierungsrate im dritten (18,06%) und vierten (2,775%) Versuch in Kontrollpflanzen höher als in eisendefizienten Pflanzen (5,88% bzw. 0%). Da die Kolonisierungsrate zwischen einzelnen Experimenten eine hohe Variabilität aufwies, war es nicht möglich festzustellen ob die Verfügbarkeit von Eisen in Salatpflanzen einen Einfluss auf die Kolonisierung mit *Salmonella* über das Wurzelsystem hat. Es ist noch unklar, ob diese Unterschiede auf den Versuchsaufbau zurückzuführen sind oder ob die Eisenversorgung keinen Einfluss auf die Kolonisierung mit *Salmonella enterica* hat. Um diese offene Frage zu klären, sollte diese Versuchsreihe wiederholt werden.

Tabelle 16: Kolonisierungsrate von *Salmonella* Typhimurium 14028s in eisendefizientem (Fe-) Salat und Kontrollpflanzen (Fe+), welche im hydroponischen System kultiviert wurden. Aufgrund der hohen Variabilität der Kolonisierungsrate zwischen den Versuchsdurchgängen konnte keine klare Aussage getroffen werden, inwiefern die Verfügbarkeit von Eisen während des Wachstums von Salatpflanzen die Kolonisierung von Salmonellen über das Wurzelsystem beeinflusst. Das Experiment wurde in vier unabhängigen Durchgängen durchgeführt.

Versuch	Pflanzen Eisenstatus	Anzahl der Salat Pflanzen	Anzahl besiedelte Pflanzen	Besiedelte Pflanzen (%)
Versuch 1	Fe+	43	28	65
	Fe-	40	16	40
Versuch 2	Fe+	65	23	35
	Fe-	63	35	55
Versuch 3	Fe+	71	13	18,3
	Fe-	71	4	6,3
Versuch 4	Fe+	71	2	2,8
	Fe-	71	0	0

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch die Pflanze ist Teil der pflanzlichen Abwehr gegenüber Krankheitserreger. Eisen ist ein wesentlicher Bestandteil zahlreicher Enzyme, wie Peroxidasen, Katalasen und Eisenreduktasen, die eine wichtige Rolle im antioxidativen System der Pflanze spielen. Unsere Hypothese war, dass Eisenmangel die Fähigkeit der Pflanze auf Krankheitserreger, einschließlich *Salmonella enterica*, zu reagieren beeinträchtigt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden sterile Salatpflanzen unter eisenlimitierenden (Fe-) oder Kontrollbedingungen (Fe+) aufgezogen und mit dem flg22-Peptid aus bakteriellem Flagellin behandelt. Die ROS-Produktion in Reaktion auf die Behandlung mit flg22 wurde mit Hilfe von Luminol in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gemessen. Aus den Salatblättern wurden 5 mm große Blattscheiben ausgestanzt und in 96-well Mikrotiterplatten gegeben (siehe unten). Die Blattscheiben wurden anschließend mit flg22 behandelt und die relative Fluoreszenz gemessen. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Wiederholungen sind in **Abbildung 35** dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass Kopfsalat auf flg22 mit der Produktion von ROS reagiert. Darüber hinaus ist die Aktivität der ROS in den eisendefizienten Pflanzen (Fe-) über einen längeren Zeitraum höher als in Kontrollpflanzen (Fe+), was auf eine verringerte Aktivität des antioxidativen Systems der Pflanze und damit auf eine verstärkte Immunreaktion schließen lässt. Um zu verstehen, warum *Salmonella* in eisendefizienten Pflanzen trotz verstärkter Immunreaktionen überleben kann, sind weitere Untersuchungen notwendig.

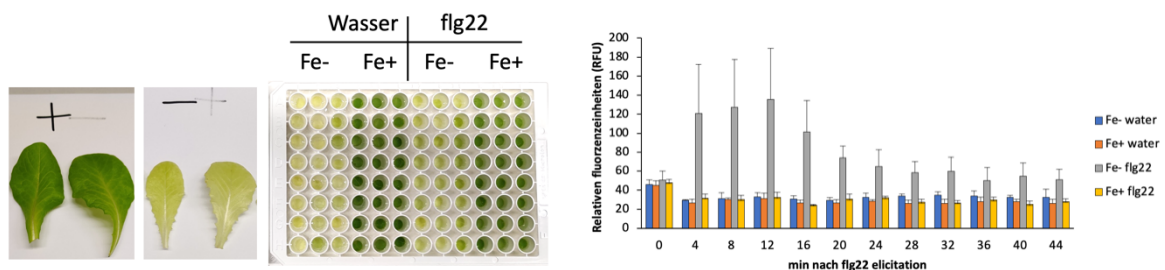
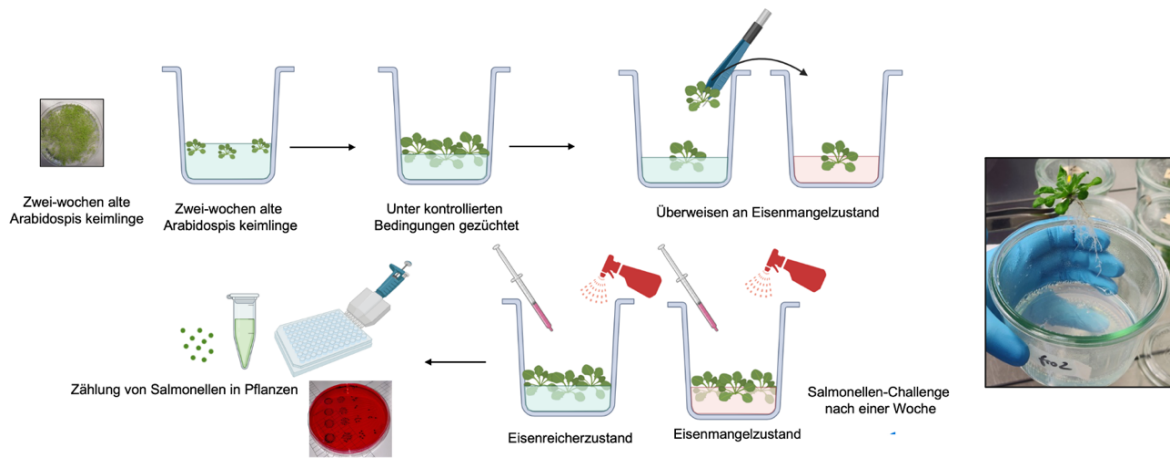


Abbildung 35: Gezeigt sind die Ergebnisse unabhängiger Experimente zur Untersuchung der ROS-Produktion der Kontrolle (Fe+) und eisendefizienten Salatblättern nach Anregung mit dem flg22 Peptid, welches aus 22 konservierten Peptiden bakteriellen Flagellins besteht oder mit Wasser (Kontrolle). Dargestellt ist die Lichtproduktion in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) mit Standardabweichung (n=24) über die Zeit nach Zugabe von flg22 oder Wasser als Kontrolle.

Für die Untersuchung des Einflusses der Eisenverfügbarkeit auf die Persistenz von *Salmonella* auf genetischer Ebene, wurde der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* verwendet. Aufgrund der Verfügbarkeit von *Arabidopsis*-Mutanten und der Menge an bereits publizierten Studien ließen sich die Experimente unmittelbar durchführen und gut mit anderen Ergebnissen vergleichen. Wir verwendeten die *Arabidopsis*-Mutanten: *nramp1-2*, *nramp2-3*, *irt1*, *irt1-2* und *fro2*, in denen Gene, die eine entscheidende Rolle bei Eisentransport, -stoffwechsel und -homöostase spielen, mutiert

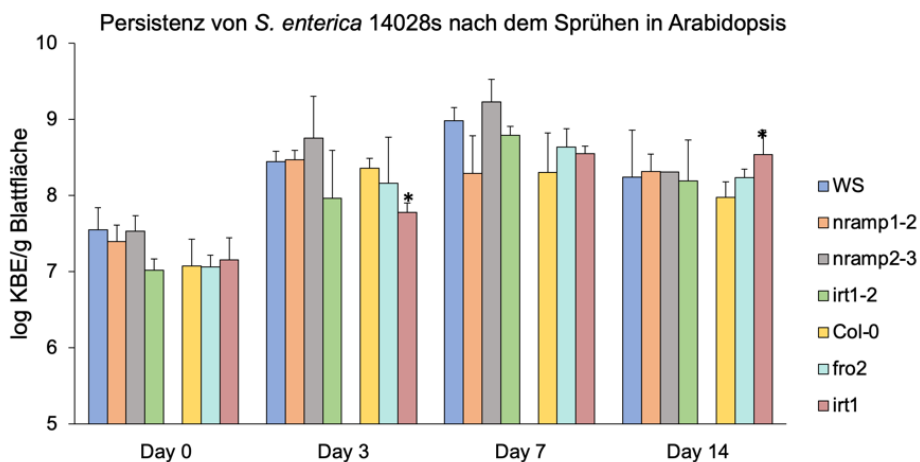
sind (**Abb. 35**). Als Kontrolle dienten die entsprechenden Wildtypen WS und Col-0. Die Samen der *Arabidopsis*-Wildtypen und Mutanten wurden oberflächensterilisiert und auf ½ MS-Agar angezogen. Nach zwei Wochen wurden die Keimlinge für weitere drei Wochen unter kontrollierten



Bedingungen auf frischen ½ MS-Agar in Glasgefäßen umgesetzt. Danach wurden einige Mutanten (*irt1*, *irt1-2*, *fro2*) auf eisenlimitierende Medien umgesetzt. Anschließend wurden alle Pflanzen mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm 14028s (*S. Typhimurium* 14028s) in einer Suspension von OD₆₀₀ 0,1 ($\approx 10^6$ CFU/mL) besprüht, und die Zellzahl der Salmonellen wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen bestimmt.

Abbildung 36: Versuchsaufbau des Experiments zur Bewertung der Auswirkungen von Eisenmangel auf die Persistenz und Kolonisierung von *S. Typhimurium* 14028s. *Arabidopsis*-Wildtyp und Mutanten, welche eine Rolle beim Eisentransport und -stoffwechsel spielen, wurden in Fe⁺ oder Fe⁻ Medien angezogen und mit Salmonella behandelt (Sprühinokulation).

Die Salmonellen waren in der Lage in allen Wildtypen und Mutanten von *Arabidopsis* zu persistieren, da die Zellzahlen auch nach zwei Wochen stabil waren. Nach dem Besprühen lag die Zellzahl von *Salmonella* in *Arabidopsis* anfänglich bei ca. log 7 CFU/g Blattgewicht und stieg nach 3 Tagen um eine logarithmische Einheit an. Im Vergleich zum Wildtyp Col-0 war die *Salmonella* Population in den Blättern der *irt1-1* Mutante nach drei Tagen deutlich geringer. Es gab jedoch



keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten hinsichtlich der Persistenz von *Salmonella* nach 7 Tagen. An Tag 14 war die Zellzahl der Salmonellen in den Blättern der *irt1-1* Mutante im Vergleich zum Col-0 Wildtyp signifikant höher, wobei dieser Unterschied nicht zwischen dem Wassilewskija (WS) Wildtyp und der entsprechenden *irt1-2* Mutante beobachtet wurde (**Abb. 37**).

Abbildung 37: Persistenz von *S. Typhimurium* 14028s auf *Arabidopsis*. *Arabidopsis* Wildtyp und Mutanten, die mit Eisentransport und -stoffwechsel in Verbindung stehen, wurden in Gläsern angezogen und mit *S. Typhimurium* behandelt. Die CFU-Zahl wurde während 2 Wochen bestimmt. Fehlerbalken stellen die SD von vier biologischen Replikaten dar. * bedeutet $p < 0,05$ im Student's *t*-test.

In einem Parallelexperiment wurde *S. Typhimurium* 14028s in Blätter von *Arabidopsis* infiltriert, die in Boden angezogen wurden. *Arabidopsis*-Samen wurden oberflächensterilisiert und zwei Wochen lang in ½ MS-Agar angezogen. Anschließend wurden die zwei Wochen alten Keimlinge in eine Mischung (2:1) aus Perlit und Substrat umgesetzt. Die Jungpflanzen wurden weitere fünf Wochen unter kontrollierten Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden ihre Blätter mit *S. Typhimurium* 14028s mit einer OD₆₀₀ von 0,01 infiltriert und die Persistenz der Salmonellen wurde über einen Zeitraum von einer Woche untersucht. Von jedem Blatt wurden vier Blattscheiben entnommen und in 1 ml 10 mM MgCl₂ homogenisiert. Das homogenisierte Blattextrakt wurde seriell verdünnt und auf XLD-Platten, die das Antibiotikum Rifampicin enthielten, getüpfelt und bei 37°C inkubiert. Die Kolonien auf den Platten wurden am nächsten Tag gezählt.

Salmonella enterica war in *Arabidopsis* Wildtypen und Mutanten persistent, die CFU-Zahlen waren bis eine Woche nach Infiltration stabil. Anfangs lag die Zellzahl der Salmonellen bei log 5 CFU/cm² Blattfläche. *Salmonella* CFU-Zahlen waren in Wildtyp und allen Mutanten eine Woche nach der Infiltration stabil und leicht geringer im Vergleich zu Tag 0. Allerdings wiesen die *fro2* und *ysl* Mutanten im Vergleich zu Col-0 (Wildtyp) eine signifikant höhere bakterielle Population auf, während *nramp1-2* im Vergleich zu WS (Wildtyp) eine geringere bakterielle Besiedlung aufwies (**Abb. 38**).

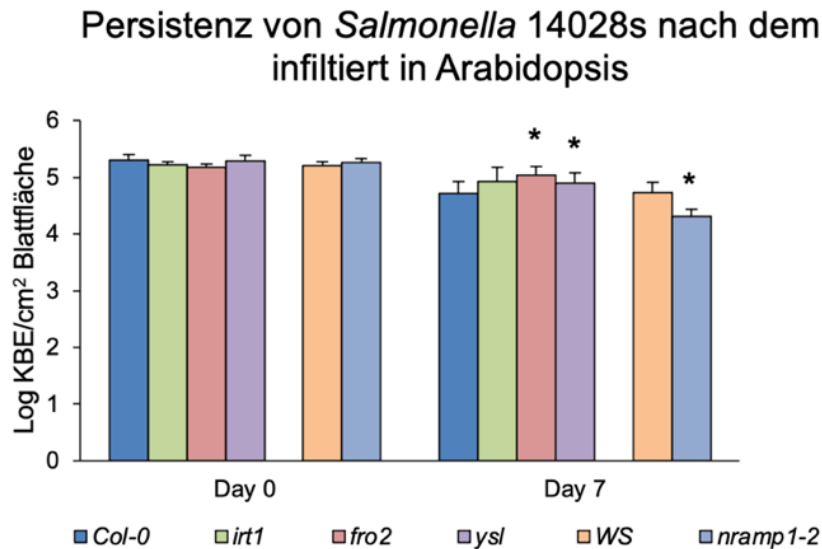


Abbildung 38: Persistenz von *S. Typhimurium* 14028s nach Infiltration in Substratgewachsenen *Arabidopsis*. Wildtyp und Mutanten, die mit Eisentransport und -stoffwechsel in Verbindung stehen, wurden im Substrat angezogen und mit *S. Typhimurium* 14028s infiltriert. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichung (SD) von zehn biologischen Replikaten dar. * bedeutet $p < 0,05$ im Student's *t*-test.

3.3.2 Einfluss von Kalkung auf das Überleben von *Salmonella enterica*

Im Rahmen des Projektes wurde gezeigt, dass *Salmonella* in Feldböden, die gekalkt wurden besser persistiert im Vergleich zu nicht gekalkten Böden (vgl. 3.1.1). Der Einfluss der Kalkung auf die Überlebensrate von *Salmonella* wurde daher für verschiedene landwirtschaftlich genutzte Böden (**Tabelle 17**) nochmals untersucht. Die Böden aus Halle (Julius Kühn Lehr- und Versuchsstation der Martin-Luther-Universität-Halle-Wittenberg), HA+CaO und HA+P/Mg+CaO waren bereits im Feld vor der Entnahme der Bodenproben mit CaCO₃ (umgerechnet 20 dt CaO/ha) gekalkt, während die Böden HA und HA+P/Mg nicht gekalkt wurden. Die Entnahme des Bodens im Feld erfolgte direkt nach der Kalkung. Zu Beginn des Experiments wurden alle Böden zusätzlich mit 0; 0,5 g; 5 g oder 50 g CaCO₃/kg Boden behandelt. Zusätzlich wurden die Böden DS und BS in die Untersuchungen einbezogen, um zu prüfen, ob der Effekt der Kalkung auf die Überlebensrate der Salmonellen unabhängig vom Bodentyp ist. Die gesiebten Böden wurden in Zentrifugenröhrchen gegeben, mit *S. Typhimurium* 14028s inokuliert und bei 20°C inkubiert. Die Zellzahl von *Salmonella* wurde in regelmäßigen Abständen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss der unmittelbaren Kalkung auf die Persistenz von *Salmonella* in allen Böden, außer DS und die Böden (HA+CaO; HA+P/Mg+CaO), die zuvor im Feld gekalkt wurden (**Abb. 39**). Kalkung der Böden vor der Applikation von *Salmonella* erhöhte deren Überlebensdauer in diesen Böden (**Abb. 39**). Im weiteren Verlauf der Auswertung haben wir uns auf die Böden aus Halle (HA) (vgl. **Tabelle 17**) konzentriert, um die Unterschiede über die Zeit deutlicher herauszuarbeiten.

Tabelle 17: Ausgewählte Bodenarten zur Untersuchung des Einflusses von Kalkung auf die Persistenz von *S. Typhimurium* 14028s. Die Felder mit den Böden HA+P/Mg und HA+P/Mg+CaO wurden vor dem Versuch mit P und Mg gedüngt und die Felder mit den Böden HA+CaO und HA+P/Mg+CaO wurden mit 20 dt CaO/ha gedüngt. [(h): hell, S: Sand, L: Lehm, s: sandig, l: lehmig].

	Boden/Boden Management	Herkunft	Bodentyp	pH	Abkürzung
1	DS	Großbeeren	(h) S	7,4	DS
9	BS1 - ungepflügt	JKI Dahnsdorf	(h) IS	5,8	BS
10	HA1 - ungedüngt	Halle	(h) sL	5,2	HA
11	HA1 - 20 dt CaO/ha	Halle	(h) sL	7,1	HA+CaO
12	HA1 - +P +Mg	Halle	(h) sL	5,2	HA+P/Mg
13	HA1 - +P +Mg, 20 dt CaO/ha	Halle	(h) sL	7,1	HA+P/Mg+CaO

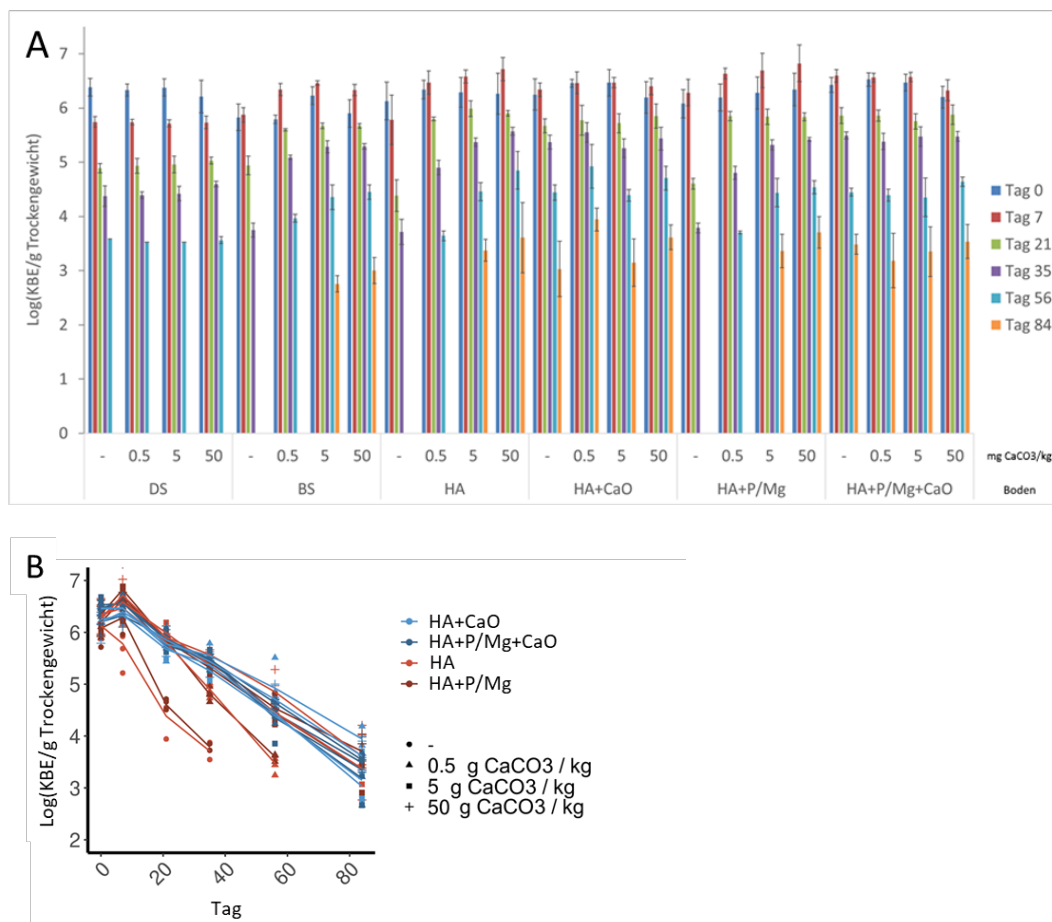


Abbildung 39: Einfluss von Kalkung auf die Überlebensdauer von *S. Typhimurium* 14028s in verschiedenen Böden über einen Zeitraum von 84 Tagen. Alle Böden wurden mit 0; 0,5; 5 und 50 mg CaCO₃/g Boden zu Versuchsbeginn gekalkt. Die Böden 11 (HA-1 20 dt CaO/ha) und 13 (HA-1 +P +Mg dt CaO/ha) wurden bereits zuvor auf dem Feld gekalkt (siehe **Tabelle 17**). A: Balkendiagramm mit allen getesteten Böden. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von 4 Replikaten. B: Zeitliche Abnahme der CFU in Böden aus Halle (HA) im Vergleich. Punkte repräsentieren die einzelnen Wiederholungen, Linien repräsentieren die Mittelwerte.

Um zu beurteilen, ob die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft im Boden von der Kalkung beeinflusst wird und damit möglicherweise die Persistenz von *Salmonella*, wurden 0, 21, und 56 Tage nach der Kalkung Bodenproben entnommen, die gesamt-DNA extrahiert und die mikrobielle Gemeinschaft anhand der 16S rRNA Genfragmente analysiert. In allen Bodenproben ist eine hohe relative Abundanz insbesondere der Phyla Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria und Firmicutes zu beobachten (**Abb. 40**).

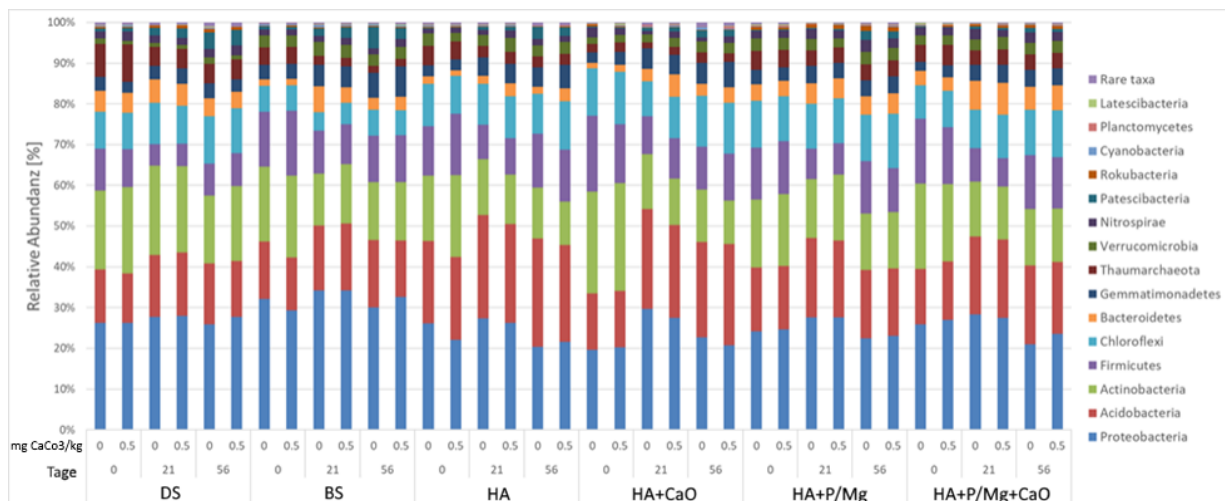
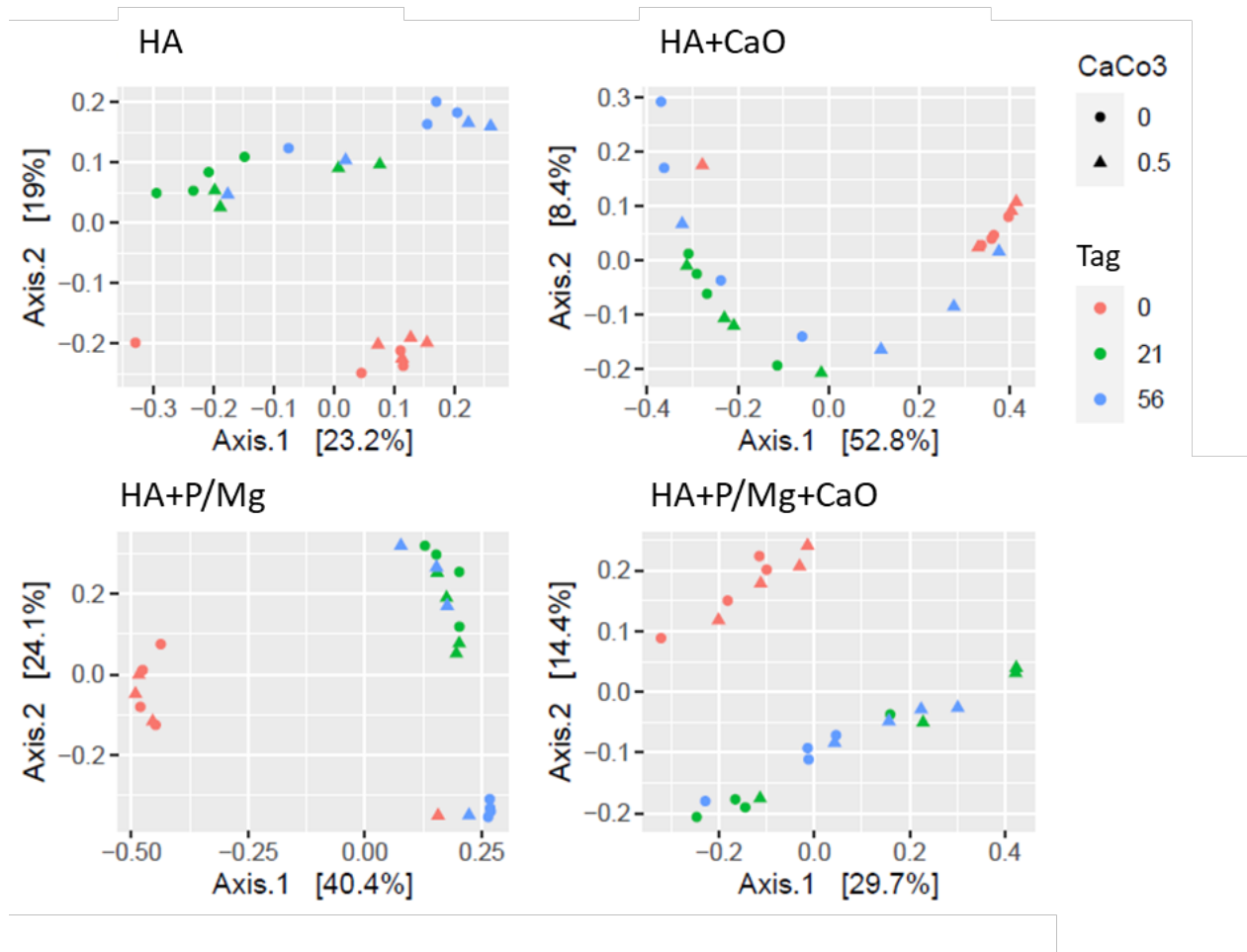


Abbildung 40: Relative Abundanz prokaryotischer Phyla in Böden. Gesamt DANN aus Böden nach einer Kalkung mit 0,5 mg CaCO₃/kg oder ohne Kalkung nach 0, 21 und 56 Tagen Inkubation bei 20°C wurde extrahiert und 16S rRNA Amplikon Sequenzierung genutzt um die prokaryotische Gemeinschaft zu charakterisieren.

Weitere Analysen der 16S rRNA-Genfragmente weisen deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Böden auf (**Abb. 41**). Während der Unterschied zwischen den Böden auch in einer PERMANOVA hoch signifikant war, fiel der Unterschied zwischen nachträglich gekalkten Böden weniger deutlich aus. In einer PCoA (**Abb. 41**), durchgeführt mit den einzelnen Böden ist zu erkennen, dass der Zeitpunkt eine große Rolle für die Zusammenstellung der prokaryotischen Gemeinschaft spielt. Diese Beobachtung konnte auch durch eine PERMANOVA Analyse bestätigt werden.



adonis2(formula=data~SoilType*DPI*CaCo3,data=Samp,permutations=999)						
	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)	
SoilType	3	7.4525	0.31673	22.5171	0.001	***
DPI	2	1.8537	0.07878	8.4012	0.001	***
CaCo3	1	0.3362	0.01429	3.0473	0.016	*
SoilType:DPI	6	3.7324	0.15863	5.6385	0.001	***
SoilType:CaCo3	3	0.5966	0.02536	1.8025	0.036	*
DPI:CaCo3	2	0.3563	0.01514	1.6148	0.106	
SoilType:DPI:CaCo3	6	1.2583	0.05348	1.901	0.004	**
Residual	72	7.9433	0.33759			
Total	95	23.5294		1		

Abbildung 41: PCoA basierend auf der Bray-Curtis Unähnlichkeit der mikrobiellen Gemeinschaften in den untersuchten Böden. Die unterschiedlichen Böden sind in verschiedenen Farben dargestellt und die Symbole stehen für Proben mit einer Nachträglichen Kalkung von 0 oder 0,5 mg CaCO₃/kg Boden.

Während der weitergehenden Analyse ist aufgefallen, dass es einige bakterielle Taxa gibt, die sehr eindeutig bestimmten Behandlungen zugeordnet werden können (**Abb. 42**). Der Einfluss der vorherrschenden Mikroorganismen im Boden wurde in Abhängigkeit von der Kalkung im Feld (HA+CaO) im Vergleich zum nicht gekalkten Boden (HA) in einem weiteren Mikrokosmos-Versuch

untersucht. Die mikrobiellen Gemeinschaften der Böden HA und HA+CaO wurden ausgewaschen und in unterschiedlichen Verhältnissen (0/10, 1/9, 5/5, 9/1 und 10/0) in autoklavierten DS-Böden (2 mm gesiebt; $WHC_{MAX} = 50\%$) inokuliert (**Abb. 43**).

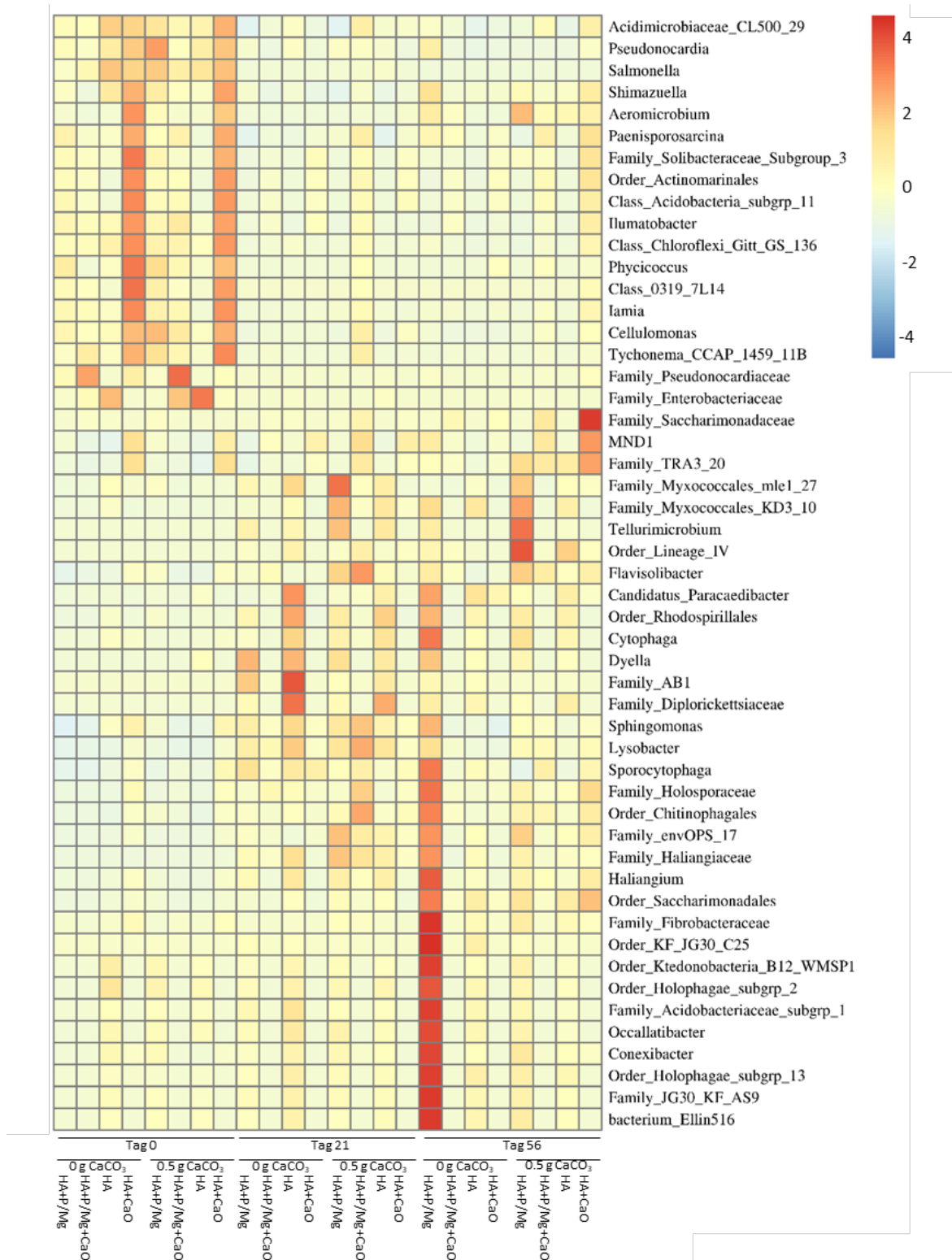


Abbildung 42: Differentielle Abundanz von bakteriellen Taxa. Die Differenzen wurden errechnet mit limma und ALR normalisierten Daten.

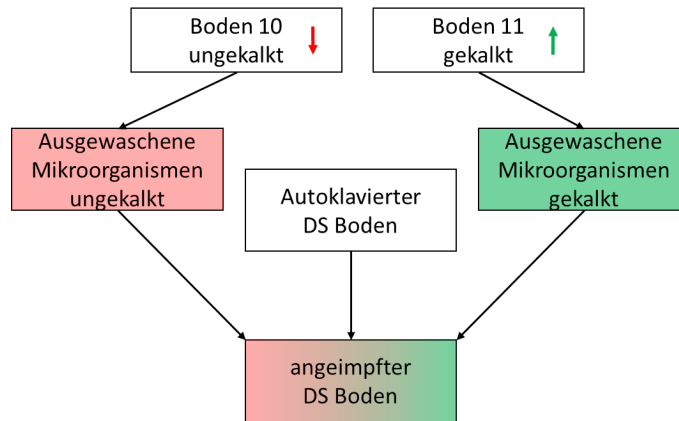


Abbildung 43: Versuchsdesign. Die isolierten mikrobiellen Gemeinschaften der Böden HA (nicht gekalkt) und HA+CaO (im Feld gekalkt) wurden ausgewaschen und autoklavierter DS-Boden in unterschiedlichen Verhältnissen mit diesen Gemeinschaften inokuliert.

Geprüft wurde die Hypothese, ob die mikrobiellen Gemeinschaften des gekalkten Bodens die Persistenz von Salmonellen unabhängig von anderen Bodenparametern verbessert. Um eine gleichbleibende totale Abundanz der mikrobiellen Gemeinschaften sicherzustellen wurden die Gemeinschaften aus der gleichen Menge Boden extrahiert und in autoklavierten DS-Boden inokuliert. Als Kontrolle diente der autoklavierte DS-Boden ohne Inokulation von isolierten mikrobiellen Gemeinschaften. Zu den so vorbereiteten Proben wurden Salmonellen mit einer Zellzahl von 10^6 CFU/g Boden gegeben und nachfolgend die CFU/g Trockengewicht des Bodens über 49 Tage bestimmt. Bei Vergleich der Zellzahl von *Salmonella* in den Proben waren keine Unterschiede zu beobachten. Nach der Inokulation (Tag 0) betrug die Zellzahl an Salmonellen 10^6 CFU/g Trockengewicht. Nach einer Inkubationszeit von 49 Tagen war in allen Proben eine Zellzahl von weniger als 10^3 CFU/g Trockengewicht zu verzeichnen (**Abb. 44**).

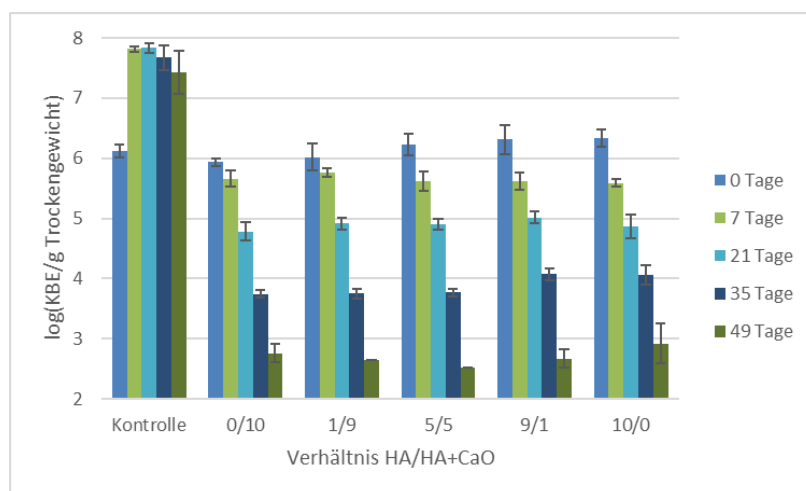


Abbildung 44. Persistenz von *S. Typhimurium* 14028s in autoklavierten DS-Boden inokuliert mit isolierten Mikrobiomen aus einem gekalkten (HA+CaO) und einem nicht gekalkten (HA) Boden über einen Zeitraum von 49 Tagen. Die Balken repräsentieren die CFU-Zahl von *S. Typhimurium* 14028s und die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von 4 Replikaten.

3.3.3 Einfluss der Temperatur auf die Persistenz von *S. enterica* in Blättern von Kopfsalat

Die Ergebnisse von *plantinfect* zeigten, dass Kopfsalat (*Lactuca sativa* Kultivar Magician) in geringer Häufigkeit (0,7–1,4%) von *Salmonella enterica* über den Boden kolonisiert wird. Es stellt sich daher die Frage, welche Faktoren die Persistenz der Salmonellen innerhalb einer Pflanze nach erfolgreicher Internalisierung beeinflussen. In der ersten Phase (*plantinfect*) haben wir den Einfluss der Temperatur, als einen wichtigen Faktor des Klimawandels, auf die Persistenz verschiedener *S. enterica* Stämme in Blättern von Kopfsalat untersucht. Um der landwirtschaftlichen Praxis robuste Empfehlungen geben zu können, ist es notwendig diese Untersuchungen weiter zu führen. Für die Experimente in Phase 2 wurden die *S. enterica* Stämme *S. Typhimurium* 14028s, als sehr gut charakterisierter Kontrollstamm, und *S. Senftenberg*, isoliert aus der Pflanze, ausgewählt. In den Versuchen wurde eine größere Anzahl an Wiederholungen einbezogen (**Abb. 45**). Zusätzlich wurde geprüft, ob der Gehalt an Stickstoff und Kohlenstoff in den Salatblättern mit der Überlebensfähigkeit bzw. der Dichte der Salmonellen in der Pflanze korreliert ist. Dazu wurden in allen Pflanzen die Nährstoffgehalte in den oberirdischen Pflanzenteilen anhand von zertifizierten Protokollen des Verbands deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e. V. (VDLUFA) analysiert (**Abb. 46**).

Für den Versuch wurden *Salmonella*-Suspensionen in die Blätter infiltriert. Jeweils zwei Blätter von 10 Pflanzen wurden so mit einem *S. enterica* Stämmen infiltriert und im Gewächshaus bei 21°C, 28°C sowie 14°C kultiviert (**Tabelle 18**). Die Kontrolle der jeweiligen Temperaturvarianten umfasste 5 Pflanzen, die entsprechend mit 10 mM MgCl₂ infiltriert wurden. Nach 0, 7, 14, 21 und 28 Tagen wurden Pflanzenproben genommen und die CFU-Zahl bestimmt (**Abb. 45**). Um auszuschließen, dass sich Zellen in einem „*viable but nonculturable*“-Zustand befinden, wurden spezifische *Salmonella* Gene mit einer qPCR amplifiziert, leider hat die in *plantinfect* für Bodenproben etablierte Methode keine belastbaren Ergebnisse für die Blattproben produziert (Anhang S1). Unterschiede im Phänotyp der Pflanzen in Abhängigkeit von der Temperatur wurden ebenfalls bonitiert und dokumentiert (**Abb. 46**). Die beschriebenen Experimente wurden zweimal wiederholt mit dem Resultat der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Tabelle 18: Versuchsplan: Von jeder Variante wurden je zwei Blätter von zwei Pflanzen zu 5 Zeitpunkten beprobt. In der Kontrollvariante (ohne Salmonellen-Infiltration) wurden jeweils zwei Blätter von einer Pflanze untersucht.

	14°C	21°C	28°C
MgCl ₂	5 Pflanzen	5 Pflanzen	5 Pflanzen
<i>S. enterica</i> 14028s	10 Pflanzen	10 Pflanzen	10 Pflanzen
<i>S. enterica</i> Senftenberg	10 Pflanzen	10 Pflanzen	10 Pflanzen

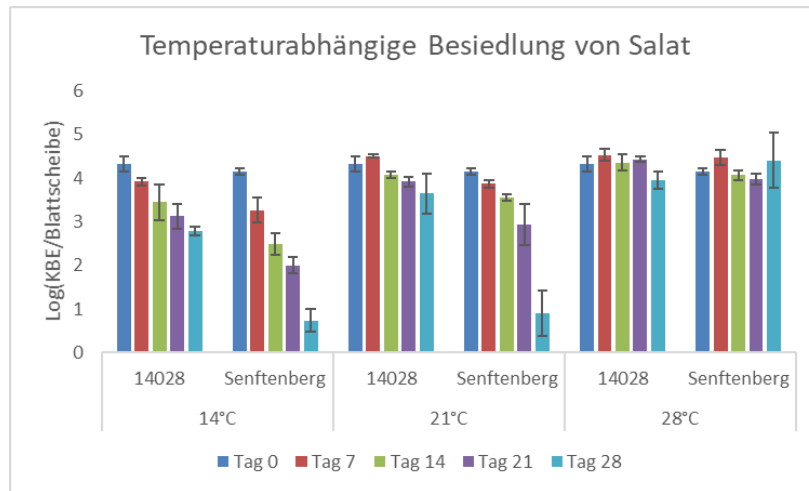


Abbildung 45: Persistenz von *S. enterica* in Blättern von Kopfsalat (*L. sativa* Magician) in Abhängigkeit von der Temperatur. Salmonella CFU-Zahlen pro cm² Blattoberfläche (CFU/cm²) wurden 0, 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Inokulation bestimmt, in Pflanzen die in 14°, 21° und 21°C kultiviert wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 2 Blättern von je 2 Pflanzen in 2 Wiederholungen (*n* = 8).

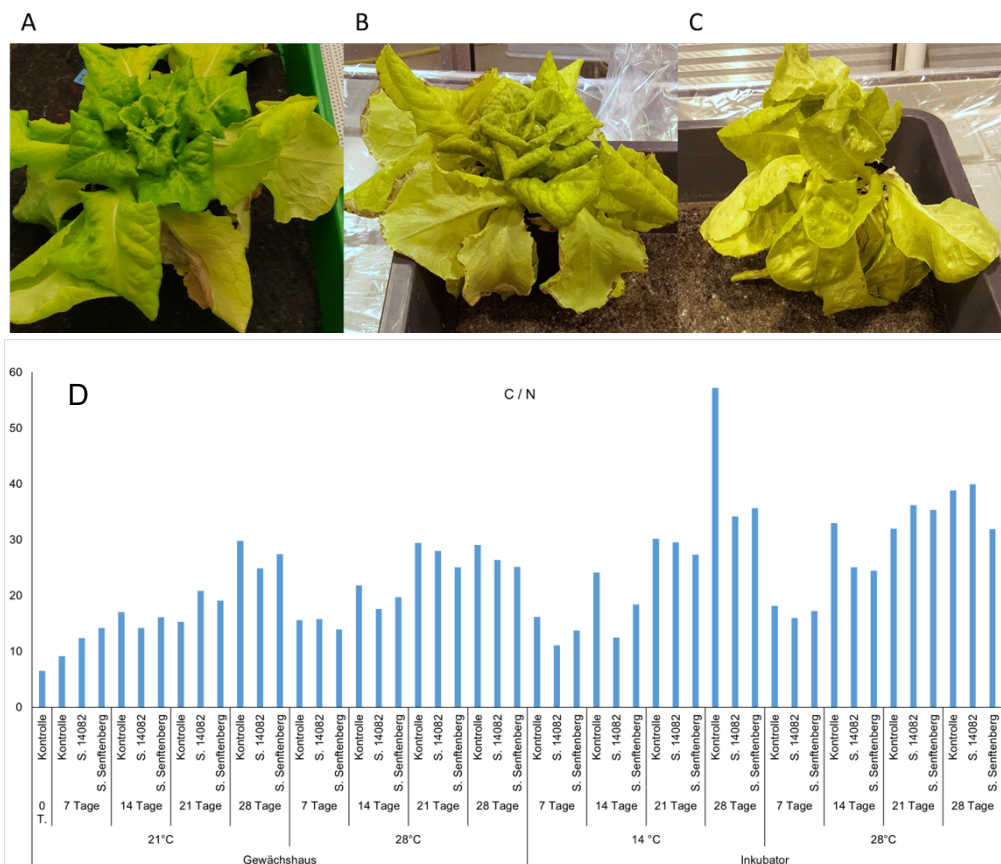


Abbildung 46: Einfluss der Temperatur auf den Phänotyp von Kopfsalat (*L. sativa*). Kopfsalat wurde in den Temperaturen von 14°C (A), 21°C (B) und 28°C (C) angezogen. D) Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff (C/N) in Salatblättern nach 7, 14, 21 und 28 Tagen in Abhängigkeit von der Temperatur (14, 21 oder 28°C).

Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss der Temperatur auf die Persistenz von *Salmonellen* in Kopfsalat (**Abb. 44**), wobei die untersuchten *Salmonella* Stämme Unterschiede in der Sensitivität gegenüber den Temperaturbedingungen aufweisen. Bei 14°C nimmt die CFU-Zahl bei beiden Stämmen über die Zeit stetig ab, während sich die Dichte der *Salmonellen* bei 28°C in den Blättern kaum veränderte. Im Vergleich zu *S. Typhimurium* 14028s war die Persistenz von *S. Senftenberg* bei 28°C geringer. Die Infiltration von Salat mit *Salmonella* führte zu sichtbaren Symptomen an den Blättern, die bei höheren Temperaturen nach der Infiltration mit *S. Senftenberg* stärker ausgeprägt waren (**Abb. 47**).

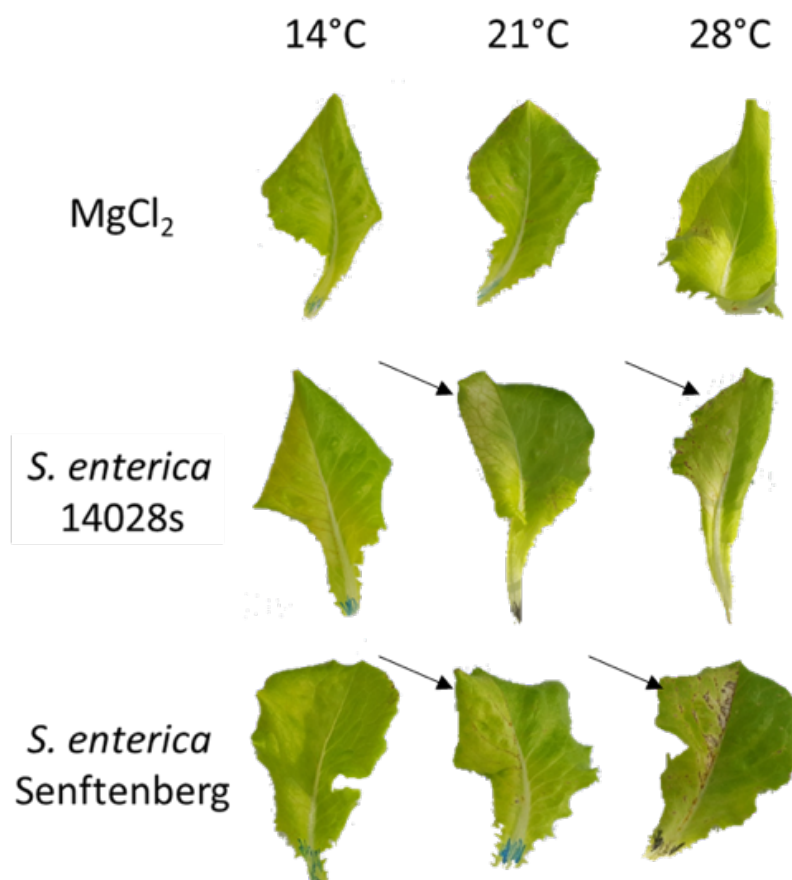


Abbildung 47: Symptomausprägung an Blättern von Kopfsalat (*L. sativa*) nach Infiltration mit *Salmonella*. Linke Blatthälfte wurde infiltriert, Pflanzen wurden in 14°C, 21°C oder 28°C kultiviert. Die Symptome sind bei höheren Temperaturen und nach Infiltration mit *S. Senftenberg* im Vergleich zu *S. Typhimurium* 14028s stärker ausgeprägt (Pfeile).

Um auszuschließen, dass die Bedingungen im Gewächshaus bzw. im Inkubator einen Einfluss auf die Persistenz von *Salmonellen* in Salatblättern haben, wurde die Persistenz von *Salmonella* bei 28°C in Pflanzen die im Gewächshaus oder im Inkubator angezogen wurden, verglichen (T-Test $p > 0.05$) (**Abb. 48**).

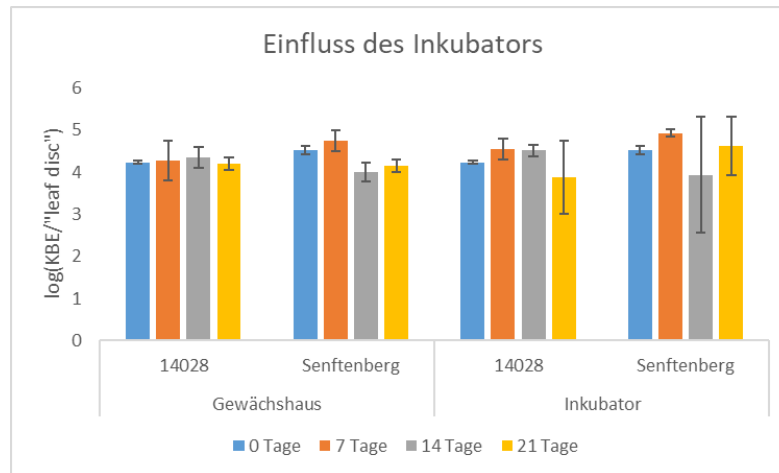


Abbildung 48: Persistenz von *S. enterica* in Blättern von Kopfsalat (*L. sativa*) bei 28°C in Abhängigkeit von der Kultivierung im Gewächshaus oder im Inkubator. Die CFU-Zahl der Salmonellen in den Blättern [$\log(\text{CFU}/\text{leaf disc})$] wurde nach 0, 7, 14, 21 und 28 Tagen bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 2 Blättern von je 2 Pflanzen ($n = 4$).

3.3.4 Einfluss der Temperatur auf die Besiedlung von Salat durch Humanpathogene

In *plantinfect* erfolgten bereits Proteomanalysen von Salmonellen in Abhängigkeit von der Temperatur bei Anzucht in Vollmedium (LB) und Minimalmedium (PCN, 1 mM P_i , pH 7,4) (Elpers et al. 2022). Die ausgewählten Temperaturbedingungen erfolgten unter Berücksichtigung der Temperaturbedingungen während der Kultivierung und Prozessierung verschiedener Salatsorten (8°C, 12°C, 16°C, 20°C im Vergleich zu 37°C, als humaner Wirt). Dazu wurde zunächst die Wachstumskinetik von *S. Typhimurium* unter den verschiedenen Bedingungen untersucht (**Abb. 49**). Proben aus der gleichen Wachstumsphase wurden für die Proteomanalysen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass niedrigere Temperaturbedingungen das Wachstum von Salmonella verzögern. Da es in der spät-logarithmischen Phase kommt es bei 37°C in LB-Medium zu der Expression von Virulenzfaktoren, die für die Invasion von Epithelzellen essentiell sind, wurde diese Wachstumsphase gewählt.

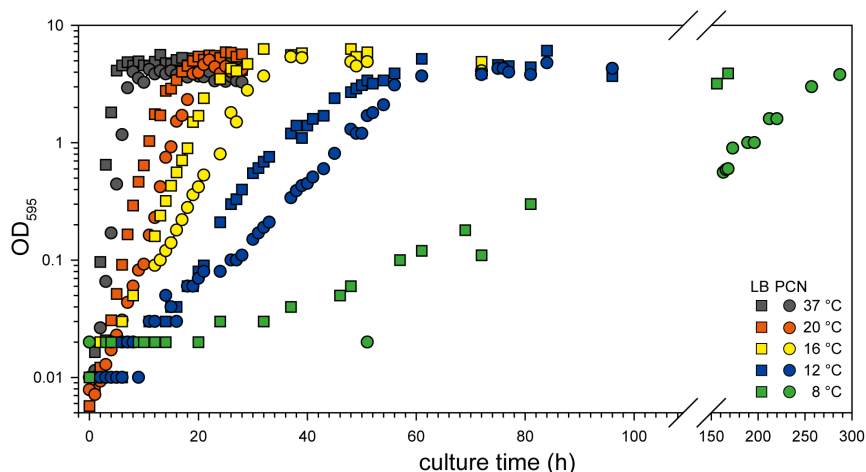


Abbildung 49: Wachstumskinetik von *S. Typhimurium* in LB- oder PCN-Medien (1 mM P_i, pH 7,4) bei 8°C, 12°C, 16°C, 20°C oder 37°C. *S. Typhimurium* wurde über Nacht bei 37°C in LB- oder PCN-Medium angezogen, und in 100 ml frisches LB- oder PCN-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,01 inokuliert. Die OD₆₀₀ wurde in Intervallen bestimmt, bis kein weiterer Anstieg der OD₆₀₀ mehr beobachtet werden konnte. Abbildung aus Elpers *et al.* (2022).

Überraschenderweise konnte die Anwesenheit von Flagellen- und Motilitätsassoziierten Proteinen auch bei der niedrigeren Anzuchttemperatur (12°C) gezeigt werden (**Abb. 50, Abb. 51**). Es wurde beobachtet, dass nach Anzucht in PCN-Minimalmedium bei 12°C sowohl die Proteine vorhanden sind, die mit der Flagelle an sich, mit deren Energetisierung, als auch mit Chemotaxis assoziiert werden (**Abbildung**). Die Ergebnisse deuten auf eine funktionelle Flagelle hin. Daher liegt der Fokus auf den weiteren Untersuchungen zur Flagelle und der damit assoziierten Motilität und dessen Auswirkung auf die Kolonisierung und Adhärenz an Salatpflanzen.

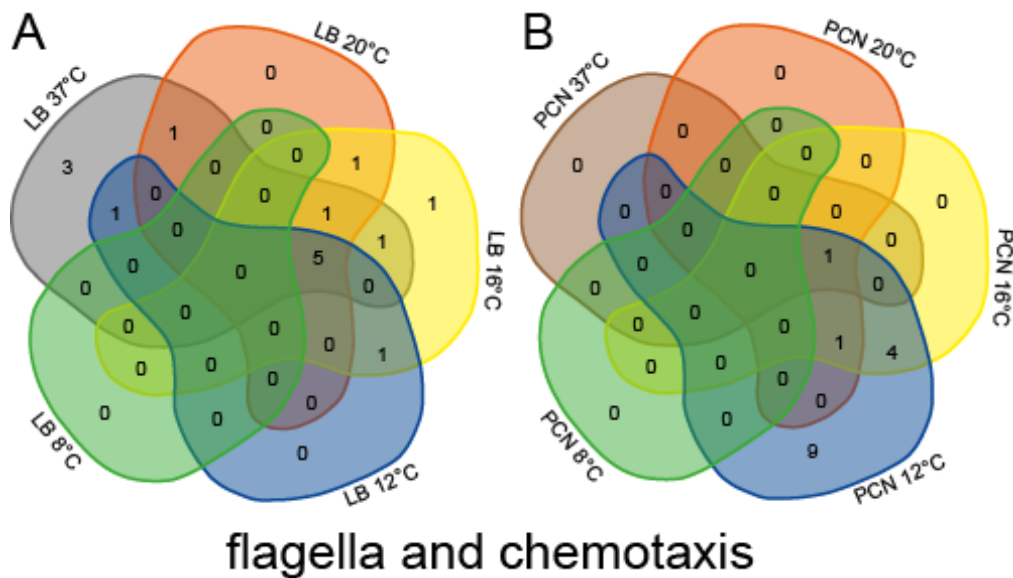


Abbildung 50. Häufigkeit vorkommender Chemotaxis- und Flagellen-Proteine von *S. Typhimurium* bei Anzucht in LB- oder PCN-Medium (1 mM P_i, pH 7,4) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Proteine wurden hinsichtlich ihres Vorkommens in den verglichenen Gruppen analysiert. Die Proteomdaten wurden anschließend durch Vergleich mit Gen-Ontologie-Gruppen (Ashburner *et al.*, 2000, The Gene Ontology, 2019) analysiert, wie hier für die Anzahl der Flagellen und Chemotaxis-assoziierten Proteine in Venn-Diagrammen gezeigt (A, LB; B, PCN). Modifizierte Abbildung nach Elpers *et al.* (2022).

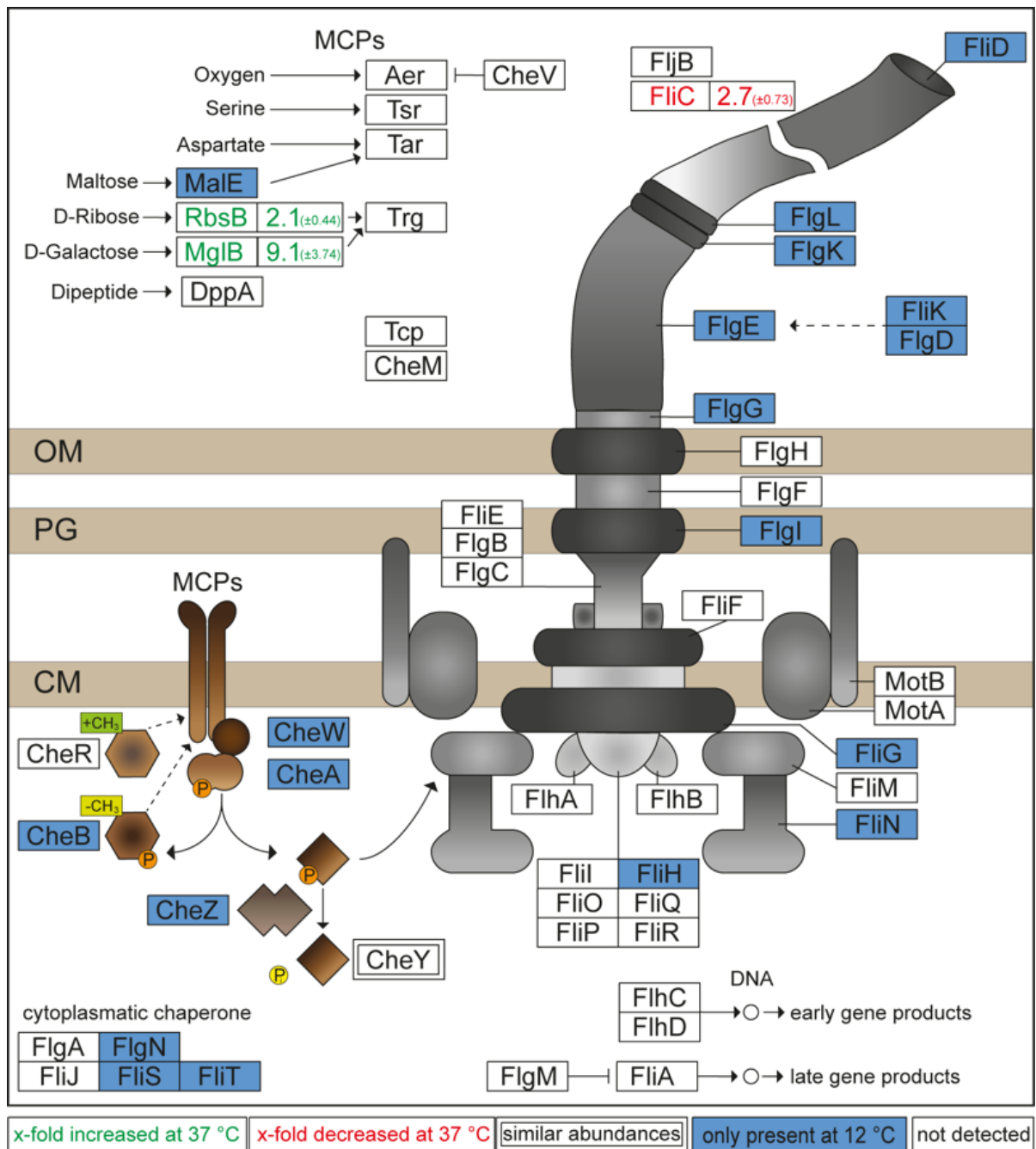


Abbildung 51: Das Wachstum von *S. Typhimurium* in PCN-Medium (1 mM P_i, pH 7,4) bei 12°C beeinflusst die Mengen an Flagellen- und Chemotaxis-assoziierten Proteinen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Proteomanalyse von *S. Typhimurium*, die in PCN-Medium bei 12°C im Vergleich zu 37°C gewachsen sind. Die Veränderungen der Proteinhäufigkeiten sind wie folgt angegeben: blaues Kästchen, ausschließlich in *S. Typhimurium*, die bei 12°C gewachsen sind; weißes Kästchen, nicht nachgewiesen in *S. Typhimurium*, die bei 37°C und 12°C gewachsen sind; grüne Schrift, höhere Häufigkeit in *S. Typhimurium*, die bei 37°C im Vergleich zu 12°C gewachsen sind; rote Schrift, geringere Häufigkeit in *S. Typhimurium*, die bei 37°C im Vergleich zu 12°C gewachsen sind. Die Zahlen geben die x-fache Veränderung der Proteinhäufigkeit an. Doppelt umrahmte Proteine zeigen ähnliche Häufigkeiten in beiden Proben an. Die Abbildung basiert auf den KEGG-Daten "*Flagellar Assembly*" und "*Bacterial Chemotaxis*" von *S. Typhimurium* (Kanehisa & Goto, 2000). Abbildung aus Elpers *et al.* (2022).

Um die Funktionalität und Morphologie der Flagelle bei 12°C genauer zu beleuchten, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

Die Flagelle wurde mit Hilfe von *flagella Stain* angefärbt, sodass sie in Durchlichtmikroskopie detektiert werden kann (**Abb. 52B**). Die Strukturen, die auf den Salmonellen detektiert werden konnten, die bei 12°C in PCN-Medium angezogen wurden, erschienen filigraner und kürzer im Vergleich zu den bisher bekannten Flagellen, die bei 37°C in LB-Medium gebildet werden. Zudem zeigte sich, dass pro Bakterium nur eine Flagellen-artige Struktur vorhanden ist. Dieses Bild der Singularität konnte auch bei Salmonellen, angezogen bei 12°C in LB-Medium, beobachtet werden. Hier erschien die Flagellen-artige Struktur jedoch ähnlich breit, wie Flagellen, die bei 37°C gebildet werden. Die Transmissionselektronenmikroskopie lieferte eine höhere Auflösung der Temperatur-abhängigen Flagellen (**Abb. 53**). Die zuvor mittels *flagella Stain* visualisierten dünneren Flagellen bei Anzucht in PCN-Medium bei einer Temperatur von 12°C konnten auch mit mittels Transmissionselektronenmikroskopie bestätigt werden. Eine Quantifizierung mittels der Software FIJI erlaubte den Vergleich der Längen der Flagellen-Filamente auf den Bakterienoberflächen, als auch die Anzahl an Flagellen auf den Bakterien (**Abb. 54A**). Die durchschnittliche Länge der Flagellen-Filamente betrug für Bakterien angezogen in LB-Medium bei 37°C 5,14 µm. Im Vergleich zeigten die Flagellen der Bakterien angezogen in LB-Medium bei 12°C mit einer durchschnittlichen Länge von 4,88 µm keinen signifikanten Unterschied. Allerdings konnte für Flagellen auf Bakterien angezogen in PCN-Medium bei 12°C durchschnittlich nur 2,68 µm lange Flagellen-Filamente beobachtet werden, sodass hier ein signifikanter Unterschied besteht.

Die Anzahl der Flagellen-Filamente zeigt, dass Bakterien angezogen im LB-Medium bei 37°C durchschnittlich 4,75 Flagellen aufweisen, wohingegen Bakterien angezogen im LB-Medium, als auch im PCN-Medium bei 12°C lediglich durchschnittlich 1,5 Flagellen besitzen. Dies stellt eine signifikante Verringerung der Zahl der Flagellen-Filamenten pro Bakterium dar, im Vergleich zu Bakterien angezogen bei 37°C in LB-Medium. Bakterien angezogen in PCN-Medium bei 37°C konnten in dieser Analyse nicht berücksichtigt werden, da zu wenige Bakterien ausgemacht werden konnte, die eine Flagelle auf der Oberfläche trugen. Zur Bestimmung des Durchmessers der Flagellen-Filamente wurden abgescherte gereinigte Flagellen verwendet, um eine größere Probenanzahl zu erhalten. Die abgescherten Flagellen-Filamente wurden, wie zuvor die Bakterien, mittels Transmissionselektronenmikroskopie visualisiert und mit Hilfe von FIJI analysiert.

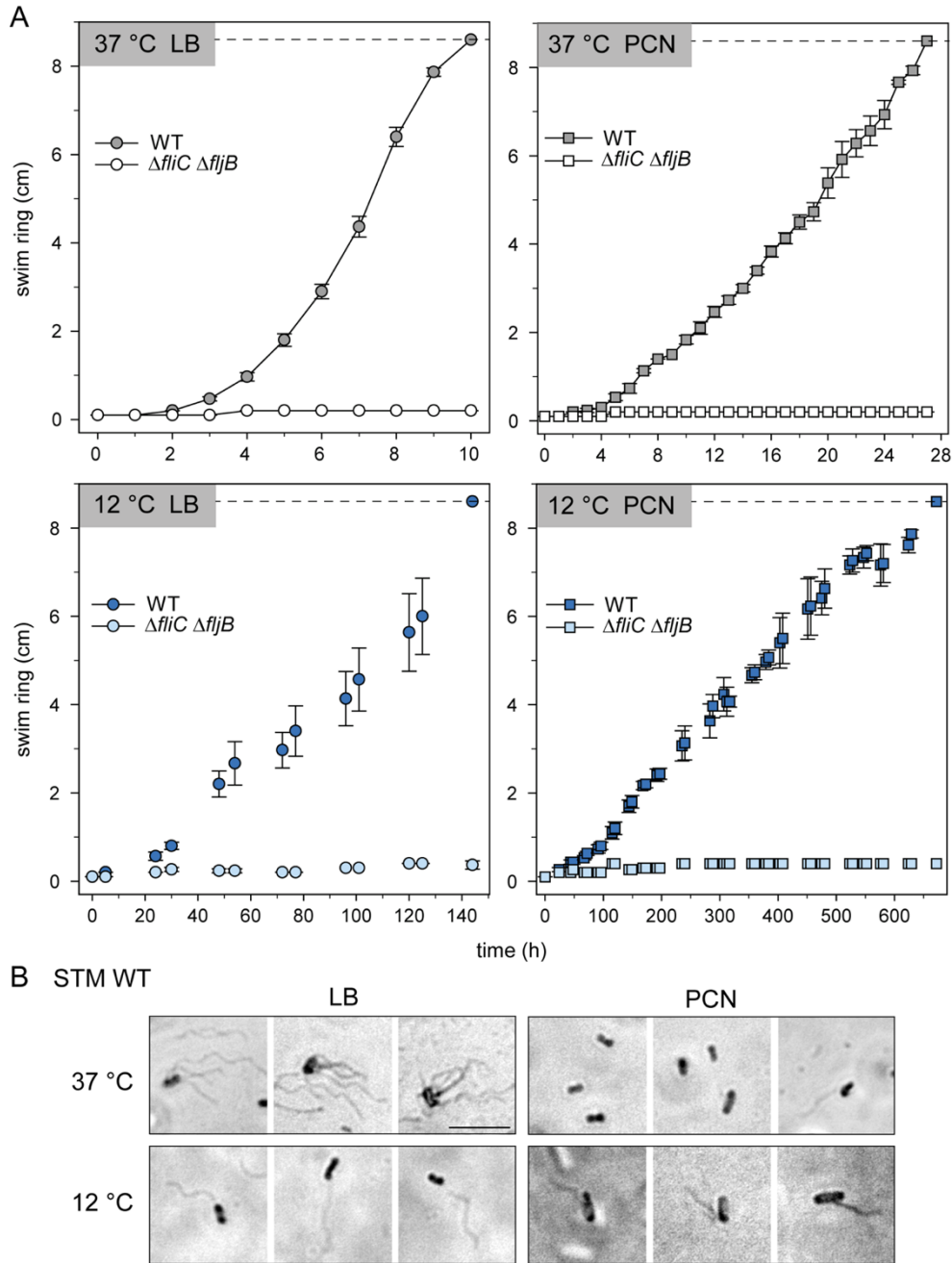


Abbildung 52: (A) Untersuchung des Schwimmverhaltens mittels Schwimmagarplatten und (B) Mikroskopische Analyse des *flagella* Stains von *S. Typhimurium* und *S. Typhimurium* $\Delta fliC \Delta fljB$ angezogen in LB- oder PCN-Medium (1 mM P_i , pH 7,4) bei 37°C oder 12°C. (A) LB- oder PCN-Schwimmagarplatten wurden mit 1 μ l Kulturen von *S. Typhimurium* oder *S. Typhimurium* $\Delta fliC \Delta fljB$ beimpft und bei 12°C oder 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Durchmesser der Schwimmringe bestimmt. Abgebildet sind Mittelwerte von mindestens drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung. (B) Gezeigt sind beispielhaft drei Ausschnitte aus einem biologischen Replikat zur Visualisierung der potentiellen Flagelle auf der bakteriellen Oberfläche mittels *flagella* stain bei 100-facher Vergrößerung mit Öl. Die bakteriellen Kulturen wurden zuvor 1:2 in Phosphatpuffer (PBS) verdünnt. Maßstabsbalken beträgt 20 μ m. Abbildung aus Elpers *et al.* (2022).

Die abgescherten Flagellen aus den Subkulturen in LB-Medium bei 37°C wiesen einen Durchmesser von 23,4 nm auf (**Abb. 54B**). Vergleichend dazu zeigten die Flagellen, abgeschert aus Subkulturen in PCN-Medium bei 37°C, einen leicht verringerten Durchmesser von 22.1 nm, der damit signifikant verschieden ist. Abgescherte Flagellen aus Subkulturen in PCN-Medium bei 12°C wiesen einen Durchmesser von 17,5 nm, abgescherte Flagellen aus Subkulturen in LB-Medium bei 12°C sogar nur einen Durchmesser von 14,7 nm auf. Damit sind die Flagellen aus den 12°C Subkulturen höchst signifikant verschieden im Vergleich zu den Flagellen aus der Subkultur in LB-Medium bei 37°C. Es konnten somit die anfänglichen Beobachtungen mittels *flagella stain* auch mit einer hochauflösenden Technik bestätigt werden, dass sowohl das Medium, als auch die verringerte Temperatur einen Einfluss auf die Zahl der Flagellen-Filamenten, deren Länge und Durchmesser haben kann.

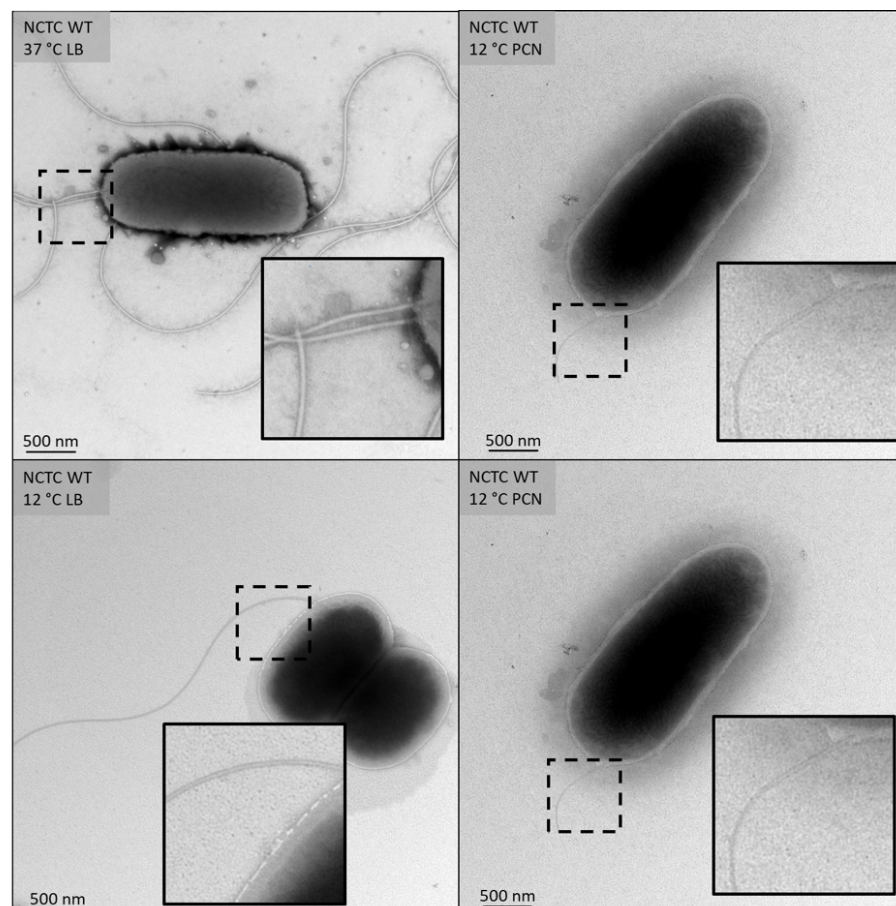


Abbildung 53: Visualisierung der Flagelle von *S. Typhimurium* nach Anzucht in LB- oder PCN-Medium (1 mM P_i , pH 7,4) bei 37°C oder 12°C mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Die entsprechend angezogenen Subkulturen von *S. Typhimurium* wurden auf Formvar/Carbon Grids aufgetragen (5 μ L, 5 min), die zuvor mittels *easyGlow* Oberflächen-behandelt wurden. Zur besseren Kontrastierung wurde eine Negativfärbung mittels 1% PTA (*phosphotungstic acid*) für 1 min. durchgeführt. Die Visualisierung wurde mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskop Zeiss LEO 920, bei 80 kV und einer Vergrößerung von 5.000 durchgeführt. Maßstabsbalken beträgt 500 nm.

Des Weiteren war von großem Interesse, welchen Einfluss die optisch veränderten Flagellen auf die Motilität für *Salmonella* haben. Durch Schwimmgagarplatten konnte gezeigt werden, dass unter allen vier Anzuchtbedingungen *S. Typhimurium* zur Motilität fähig ist und die vorhandenen Flagellen auf der Bakterienoberfläche funktionell sind (**Abbildung 5A**). Dazu wurde die Ausbildung eines Schwimmrings über die Zeit gemessen. Als Kontrolle diente *S. Typhimurium* $\Delta fliC \Delta fljB$, der keine Flagelle mehr aufweist und somit nicht mobil ist. Die Ausbreitung des Schwimmrings war Temperatur- und Mediums-abhängig. *S. Typhimurium* aus PCN-Subkulturen zeigte eine langsamere Schwimringbildung bei 37°C im Vergleich zu *S. Typhimurium* aus LB-Subkulturen bei 37°C. Durch die verringerte Temperatur von 12°C, verzögerte sich die Schwimringbildung zusätzlich.

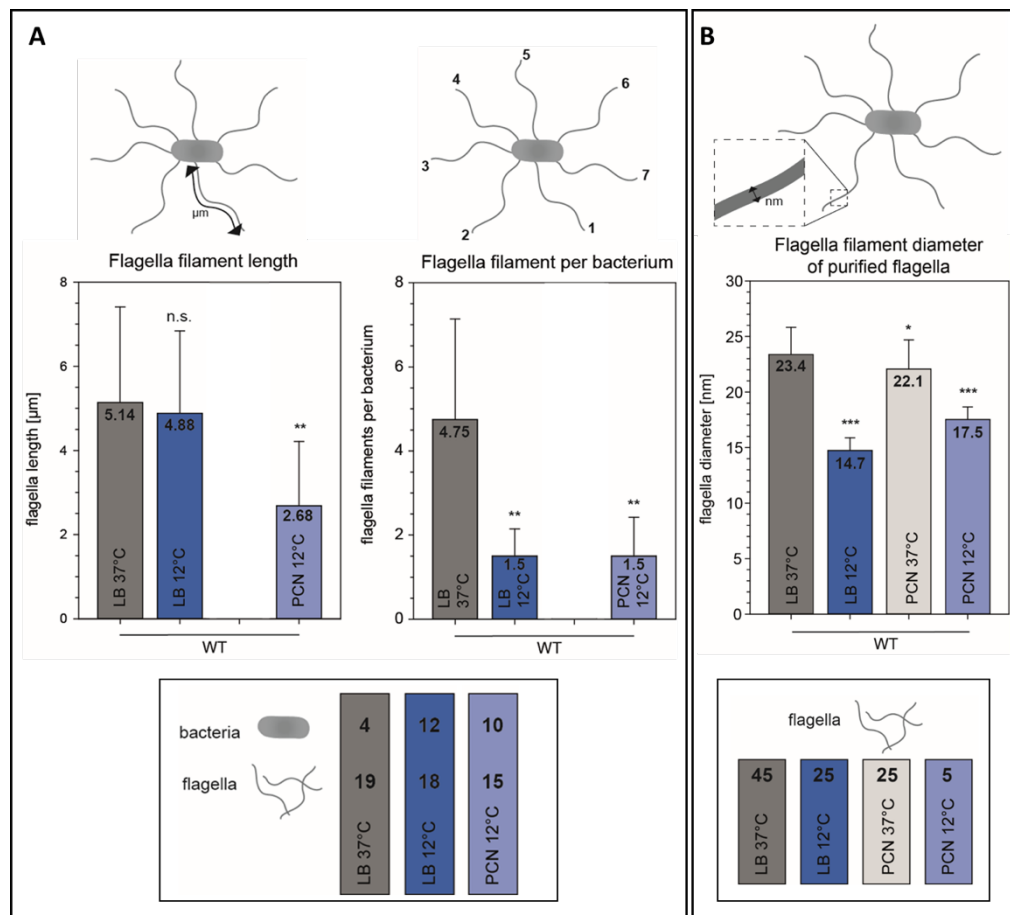


Abbildung 54: Strukturelle Analyse der vorhandenen Flagellen Filamente nach Anzucht in LB-Vollmedium und PCN-Minimalmedium (1 mM P_i , pH 7,4) bei 37°C und 12°C mittels Transmissionselektronenmikroskopie. (A) Bestimmung der Länge der Flagellen Filamente, sowie dessen Anzahl pro Bakterien durch Visualisierung von Bakterien mit entsprechenden Flagellen auf der Bakterienoberfläche. (B) Bestimmung des Durchmessers der Flagellen Filamente von abgescherten und gereinigten Flagellen Filamenten. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Student's *t*-Test berechnet und sind wie folgt angegeben: n.s., nicht signifikant; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

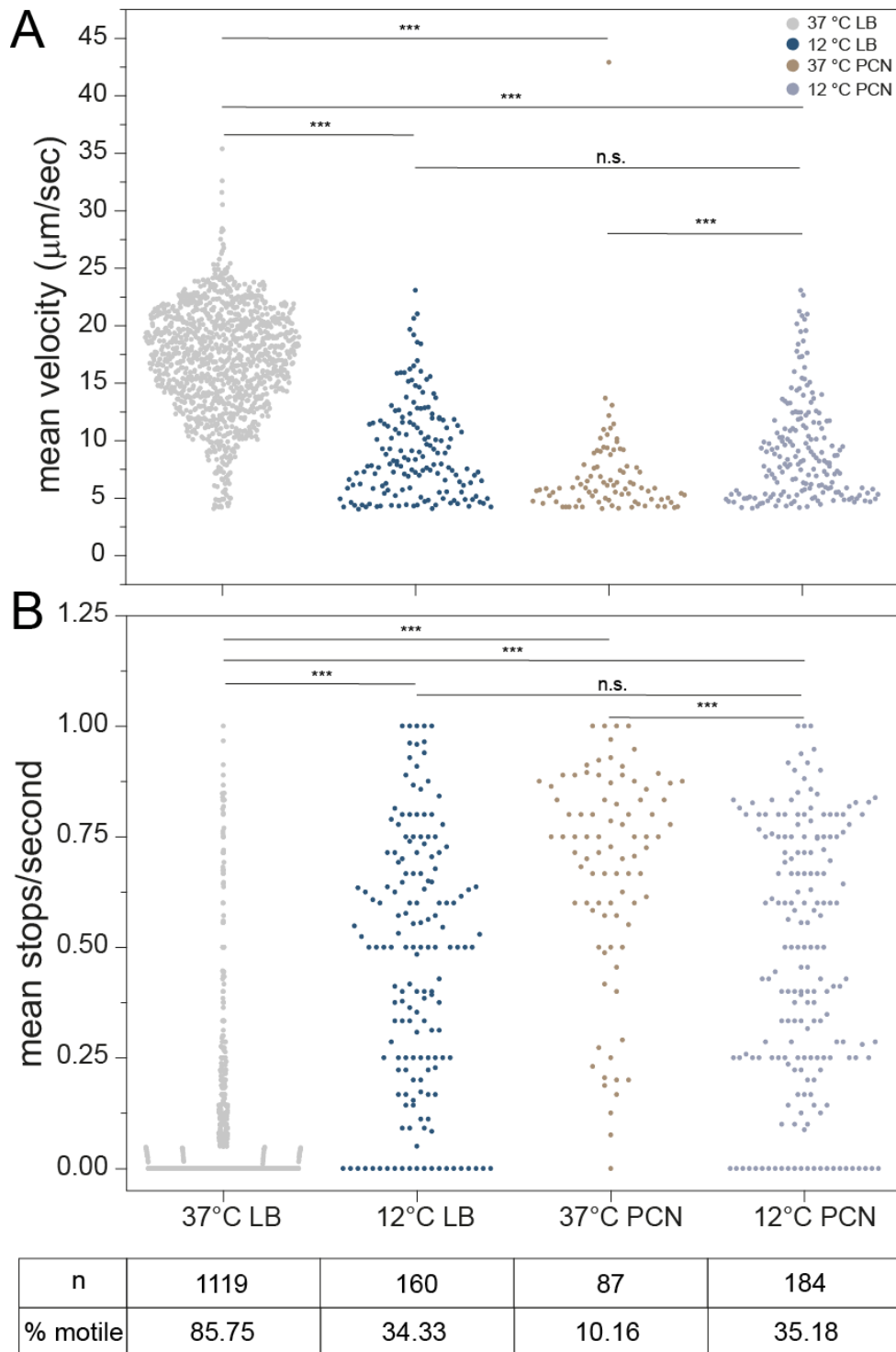


Abbildung 55: Einzelzellanalysen des Schwimmverhaltens von *S. Typhimurium* angezogen in LB- oder PCN-Medium (1 mM P_i , pH 7,4) bei 37°C und 12°C. (A) Mittlere Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{sec}$ für alle vier Kulturbedingungen, nur für schwimmende Bakterien (mittlere Geschwindigkeit $> 4 \mu\text{m}/\text{sec}$) wurden in die Analyse einbezogen. (B) Durchschnittliche Anzahl an Stopps pro Sekunde für alle vier Kulturbedingungen, nur für schwimmende Bakterien (mittlere Geschwindigkeit $> 4 \mu\text{m}/\text{sec}$). Tabelle zeigt Gesamtzahl aller untersuchten Bakterien pro Anzuchtbedingung (motil und nicht-motil), sowie den prozentualen Anteil motiler

Bakterien. Dargestellt ist die Verteilung eines biologischen Replikats. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Student's *t*-Test berechnet und sind wie folgt angegeben: n.s., nicht signifikant; ***, $p < 0,001$.

Zur detaillierten Analyse der Motilität wurden durchlichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt von *S. Typhimurium* nach Anzucht in LB- und PCN-Medien bei 37°C und 12°C die das jeweilige Motilitätsverhalten zeigen. Als Kontrolle diente der Flagellen-defiziente und nicht motile Stamm *S. Typhimurium* $\Delta fliC \Delta fljB$. Die so erhaltenen Videosequenzen konnten mit Hilfe von FIJI und des *plug in TrackMate* ausgewertet werden (**Abb. 55**). Der Stamm *S. Typhimurium* $\Delta fliC \Delta fljB$ zeigte eine gemessene durchschnittliche Geschwindigkeit von unter 4 $\mu\text{m}/\text{sec}$, welche auf die Brownsche Molekularbewegung zurückzuführen ist. Daher wurden nur Bakterien als motil angenommen, die eine durchschnittliche Geschwindigkeit über 4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ zeigten. Im Weiteren wurden Schwimmstrecken in die Analyse einbezogen, die mindestens über vier zusammenhängende Bildpunkte zu verfolgen waren. Es wurden pro Anzuchtbedingung 87 bis 1.119 einzelne Bakterien untersucht.

Es zeigte sich, dass bei 12°C angezogene Salmonellen lediglich eine motile Population von 34% bis 35% aufwies. Im Vergleich, sind Salmonellen aus 37°C im LB-Medium zu 85% motile. Auch konnte beobachtet werden, dass die Durchschnittsgeschwindigkeit signifikant verringert ist und die Anzahl der durchschnittlichen Stopps pro Sekunde erhöht. Diese Beobachtung konnte auch für die Motilität von Salmonellen angezogen in PCN-Medium bei 37°C gemacht werden, welche im Vergleich zu 12°C und PCN-Medium sogar noch gravierender ausfiel (verringerte Durchschnittsgeschwindigkeit und erhöhte Anzahl an Stopps pro Sekunde). Allerdings zeigten sich auch nur 10% der Population motil nach Anzucht in PCN-Medium bei 37°C, was sich wiederum mit der Beobachtung in der Transmissionselektronenmikroskopie deckt. Diese Analysen zeigen, dass die vorhandenen Flagellen bei einer Temperatur von 12°C zu motilen Bakterien führt, ihr Motilitätsverhalten und die Morphologie der Flagelle allerdings verändert sind.

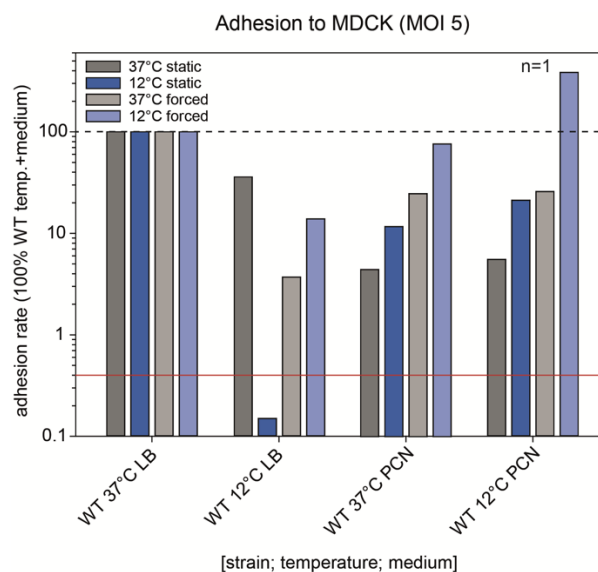


Abbildung 56: Adhäsion von *S. Typhimurium* an polarisierte Epithelzellen (MDCK-Zellen). MDCK Zellen wurden 1 h vor Experimentbeginn mit Cytochalasin D behandelt zur Inhibition von Aktin-Polymerisationen, um eine Invasion von Salmonellen in die Zellen zu verhindern. Die Infektion mit *S. Typhimurium*, die in LB- oder PCN-Medien (1 mM P_i , pH 7,4) bei 12°C oder 37°C kultiviert wurden, wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5 eingesetzt. Nach 1 h wurden nicht-adhärenente Salmonellen durch Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die MDCK-Zellen mit 0,5% Desoxycholat in PBS lysiert. Adhärenente Salmonellen wurden durch Ausplattieren des Lysats auf MH-Agarplatten quantifiziert. Die Adhäsionsraten wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Inokulum bestimmt und jeweils auf 100% des *S. Typhimurium* bei 37°C in LB-Medium und entsprechendem Inkubationsbedingungen normiert. Die rote Linie stellt die Detektionsgrenze dar.

Im Weiteren wurden diese Veränderungen in Bezug auf die Virulenzleistung bei der Infektion des Wirtes untersucht. Hierfür wählten wir das Adhäsionsexperiment an polarisierten Epithelzellen, die das native Infektionsgeschehen im bisher klassischen Säugerwirt repräsentieren soll. Dazu verwendeten wir MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) Zellen. Das Adhäsionsexperiment von *S. Typhimurium* an MDCK Zellen nach Anzucht in LB- oder PCN-Medien bei 37°C und 12°C zeigte eine tendenziell verringerte Adhäsion im Vergleich zu in LB-Medium bei 37°C angezogenem *S. Typhimurium* (**Abb. 56**). Lediglich *S. Typhimurium* in PCN-Medium kultiviert bei 12°C zeigte eine erhöhte Adhäsion bei einer Inkubationstemperatur von 12°C und nach vorheriger Zentrifugation. Dies könnte zunächst darauf hinweisen, dass die morphologisch andersartige Flagelle zu einer besseren Bindung an MDCK-Zellen führt, wenn die in ihrer Motilität eingeschränkten Bakterien durch die Zentrifugation direkt an die Zelloberfläche gebracht werden. Da dies nur bei einer Infektionstemperatur von 12°C beobachtet werden konnte, muss diese einen weiteren Einfluss auf die Bindung der 12°C Flagelle im PCN-Medium aufweisen. Dieser Phänotyp müsste aber in weiteren Replikaten überprüft werden. Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass, wie schon in den Proteomdaten zuvor ersichtlich, nicht nur die Expression der Flagelle zwischen den verschiedenen Anzuchtbedingungen variiert, sondern auch viele weitere Virulenzfaktoren, die einen Einfluss auf die Adhäsion haben könnten.

Das Adhäsionsexperiment an Kopfsalatblättern zeigte eine verringerte Adhäsion bei einer Inkubationstemperatur von 12°C im Vergleich zur Raumtemperatur (RT) und zu *S. Typhimurium* in LB-Medium bei 37°C (**Abb. 57**). Die Adhärenz von Salmonellen angezogen bei 12°C zeigt keine Veränderung in der Adhärenz bei RT (LB-Medium) oder nur geringfügig verringerte Adhärenz (PCN-Medium). Wohingegen Salmonellen angezogen bei 37°C in PCN-Medium eine deutlich reduzierte Adhäsion aufweisen. Wie auch schon zuvor, bedarf es hier weiterer Replikate, sowie muss das Expressionsmuster weiterer Virulenzfaktoren mit in Betracht gezogen werden.

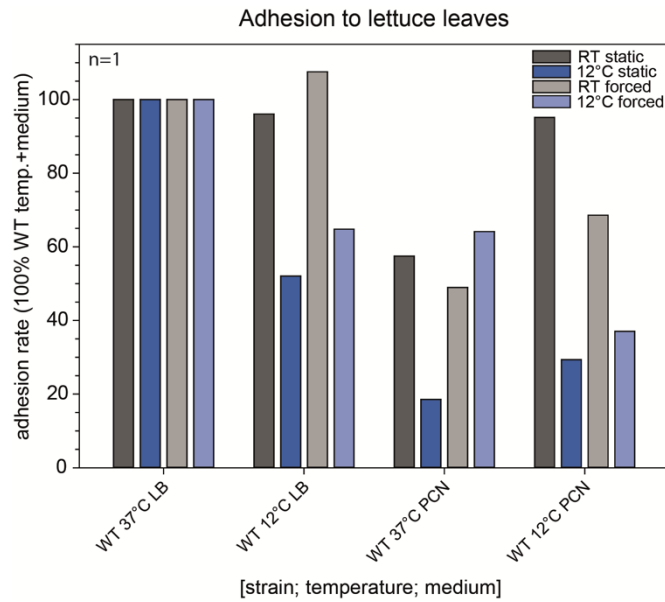


Abbildung 57: Adhäsion von *S. Typhimurium* an der adaxialen Blattseite von Kopfsalat (*L. sativa*).

Der Kopfsalat wurde unter aseptischen Bedingungen für 4 Wochen angezogen. Benötigte Blattscheiben wurden direkt vor dem Experiment ausgestochen und mit *S. Typhimurium* angezogen in LB- oder PCN-Medium (1 mM Pi, pH 7,4) bei 37°C und 12°C inokuliert. Die Inkubation fand für 1 h unter statischen Bedingungen oder nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min. bei 500 g (Herstellung eines direkten Kontakts der Salmonellen mit der Blattoberfläche) und bei RT oder 12°C statt. Nicht-adhärenente Salmonellen wurden mittels Waschens mit PBS entfernt, Blattscheiben homogenisiert und das Homogenat auf MH-Agarplatten ausplattiert. Die Adhäsionsrate wurde mit Hilfe der CFU-Zahl ermittelt und auf den *S. Typhimurium*, angezogen in LB-Medium bei 37°C unter den entsprechenden Experiment-Bedingungen normiert.

3.4 Generationenübergreifende Übertragung von Humanpathogenen (AP4)

In der Praxis ist nicht auszuschließen, dass während der Vegetation, Blüten und somit auch Samen bzw. Früchte mit humanpathogenen Bakterien (HPB) besiedelt werden. Dies hat eine potentielle Weitergabe der HPB auf die nächste Pflanzengeneration zur Folge. Um dies Möglichkeit zu untersuchen wurden Bockshornklee, Kresse und Tomaten als Modellpflanzen ausgewählt, da Keimlinge bzw. Früchte dieser Kulturpflanzen üblicher Weise roh verzehrt werden. In der **Tabelle 19** sind die genutzten *S. enterica* Serovare, deren Herkunft und die Anzahl der untersuchten Pflanzen aufgelistet. Die Blüten von Bockshornklee- und Kressepflanzen wurden mit *Salmonella*-Suspensionen inokuliert und anschließend bis zur Samenreife im Gewächshaus kultiviert. In keinen der Samen oder Keimlinge der folgenden Generation von Bockshornklee konnte *Salmonella* nachgewiesen werden. In der Kresse konnte eine Übertragung der Salmonellen von den Blüten der Mutterpflanze auf die Keimlinge der Kresse jedoch nicht ausgeschlossen werden, mehrere Proben wurden positiv auf Salmonellen getestet. Der Versuch wurde wiederholt, weil die Pflanzen keinen optimalen Wuchs aufwiesen. In der Wiederholung des Versuchs wurden keine weiteren *Salmonella*-positiven Proben gefunden.

Tabelle 19: Übertragung von *S. enterica* Serovaren durch Kresse- und Bockshornkleeb Blüten auf die Samen und sich daraus entwickelnde Keimlinge. Die Pflanzen wurden bei 20°C im Gewächshaus kultiviert. Die Präsenz von *Salomonella* wurde in 4 bis 10 Bockshornkleesamen bzw. Keimlingen und 1 bis 2 g Kresse-Samen bzw. Keimlingen mittels Anreicherung und anschließender Plattierung untersucht.

Serovar	Isoliert aus	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3			Versuch 4		
		Pflanzen (besprüht)	Proben gemörserte Samen	positive Proben	Pflanzen (gedippt)	Proben gemörserte Keimlinge 1	positive Proben	Pflanzen (gedippt)	Proben gemörserte Keimlinge 2	positive Proben	Pflanzen (gedippt)	Proben gemörserte Keimlinge 3	positive Proben
Kresse	MgCl ₂	10	5	0	8	3	0	4	0	3	0	0	
	14028 Geflügel	20	5	0	8	3	0	4	0	3	0	0	
	Senftenberg Basilikum	20	5	0	8	3	0	4	0	3	0	0	
	Szentes Kopfsalat	20	5	0	8	3	0	4	0	3	0	0	
	Infantis Basilikum				8	3	0	4	1	3	0	0	
	Infantis Umwelt				8	3	0	4	0	3	0	0	
	Newport Umwelt				8	3	1	4	1	9	0	0	
Bockshornklee	MgCl ₂	10	5	0	8	3	0	4	0	0	0	0	
	14028 Geflügel	20	5	0	8	3	0	4	0	0	0	0	
	Senftenberg Basilikum	20	5	0	8	3	0	4	0	0	0	0	
	Szentes Kopfsalat	20	5	0	8	3	0	4	0	0	0	0	
	Infantis Basilikum				8	3	0	4	0	0	0	0	
	Infantis Umwelt				8	3	0	4	0	0	0	0	
	Newport Umwelt				8	3	0	4	0	0	0	0	

In zwei weiteren Versuchen wurden zusätzlich die Blüten von Tomaten Pflanzen in *Salmonella*-Suspensionen (OD₆₀₀ von 0,1) gedippt und die Präsenz der Salmonellen wurde nach der Entwicklung der Früchte getestet. Die Proben wurden dazu aufgeteilt in Frucht, Blatt und Waschwasser. Zunächst wurde das Blatt, welches der reifen Frucht am nächsten war analysiert. Dann wurden die Früchte mit MgCl₂ gewaschen, wobei das Waschwasser aufgefangen wurde. Die Früchte wurden oberflächlich sterilisiert und homogenisiert. Alle Proben wurden durch Anreicherung in BPW und RVS und Ausplattierung auf XLD-Agar auf die Präsenz von Salmonellen getestet. In **Tabelle 20** sind die genutzten *Salmonella enterica* Serovare, deren Herkunft und die Anzahl der untersuchten Pflanzen, Früchte und Blätter aufgelistet. Es lässt sich erkennen, dass es eine Besiedlung von Tomaten Früchten mit *Salmonella* gab. In je einer Frucht, behandelt mit den *S. Thyphimurium* 14028s und *S. Senftenberg*, wurden Bakterien auch innerhalb der Frucht nachgewiesen.

Tabelle 20: Übertragung von *S. enterica* Serovaren durch Tomaten Pflanzen auf deren Früchte. Die Pflanzen wurden bei 20°C im Gewächshaus kultiviert. Die Präsenz von *Salomonella* wurde in Früchten und Blättern von 30 Pflanzen pro Serovar mittels Anreicherung und anschließender Plattierung untersucht.

Serovar	Isoliert aus	Versuch 1 + 2				
		Pflanzen (gedippt)	geerntete Früchte	positive Proben Früchte	positive Proben Blätter	positive Proben Waschwasser
MgCl ₂		30	5	0	0	0
14028 Geflügel		30	14	1	1	3
Senftenberg Basilikum		30	17	1	3	9
Szentes Kopfsalat		30	13	0	0	7
Infantis Basilikum		30	14	0	0	8
Infantis Umwelt		30	7	0	0	4
Newport Umwelt		30	13	0	0	8

3.5 Erwerb von Antibiotika-Resistenzgenen (AP5)

Die menschliche Gesundheit wird zunehmend durch das Auftreten und die Verbreitung multiresistenter Bakterienstämme bedroht. Organische Düngemittel können Antibiotika-Resistenzgene (ARG) enthalten, die auf mobilen genetischen Elementen, einschließlich Plasmiden, von Bakterien lokalisiert sein können. Durch die organische Düngung können Bakterien mit ARG in den Boden und in die Rhizosphäre (von den Pflanzenwurzeln beeinflusster Boden) und schließlich auf die essbaren Teile der Pflanze übertragen werden. Da die Rhizosphäre eine erhöhte bakterielle Vielfalt und Aktivität aufweist, ist sie ein Habitat, in welchem Konjugation und Austausch von genetischer Informationen (horizontaler Gentransfer) in erhöhter Häufigkeit vorkommen kann. Dies erhöht das Risiko, dass mobile genetische Elemente und ARG von Bakterien aus dem Boden und organischen Düngemitteln auf HPB übertragen werden. Letztlich könnte dies, bei Verzehr von Frischeprodukten, ein Problem für die Verbraucher darstellen.

Um die Konjugation bzw. Übertragung von Plasmiden auf HPB in der Rhizosphäre zu untersuchen, wurden neun *Salmonella*-Serovare, verschiedenen Ursprungs (**Tabelle 21**), in zwei Böden, in Gülle, oder in mit Gülle versetzten Boden inokuliert. Verwendet wurden unterschiedlich landwirtschaftlich bewirtschaftete Böden von verschiedenen Standorten. Dabei handelt es sich um Boden aus Halle (Boden Nr. 11, **Tabelle 6**) mit der höchsten Salmonellen-Persistenz sowie dem Boden BS1 (Boden Nr. 9, **Tabelle 6**) mit der geringsten Salmonellen-Persistenz. Nach Inokulation der *Salmonella*-Serovare wurden 4 Wochen alte Salatpflanzen in Pflanztöpfe mit den entsprechenden Böden oder Boden-Gülle Mischungen umgesetzt und für eine Woche im Gewächshaus kultiviert. Anschließend wurden Salmonellen, die ARG-haltige Plasmide von anderen Bakterien aus der Gülle oder aus der Rhizosphäre des Salats aufgenommen hatten, durch Ausplattieren auf Selektivmedien mit verschiedenen Antibiotika isoliert.

Insgesamt wurden 915 potentielle *Salmonella*-Isolate vereinzelt, die gegen ein der getesteten Antibiotika resistent waren. Antibiotikaresistenzgene (ARG) können auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden vorkommen und könnten auf diesem Weg von den verschiedenen *Salmonella*-Serovaren aufgenommen worden sein. Der überwiegende Anteil an potentiellen *Salmonella*-Isolaten wurde aus dem Boden aus Halle und der Mischung aus BS1-Böden mit Gülle isoliert (ca. 85% aller Isolate), wobei die meisten Isolate resistent gegenüber Colistin oder Gentamycin waren (**Tabelle 5**). Das einzige Antibiotikum gegen das keine resistenten *Salmonella* Isolate isoliert werden konnten war Imipenem.

In weiteren Schritten sollen antibiotikaresistente *Salmonella*-Isolate für den transkonjugativen Transfer via *biparental mating* mit *E. coli* CV601 gfp ausgewählt werden, um plasmidlokalisierte ARG in den *E. coli*-Rezipienten zu übertragen. Anschließend sollen übertragende Plasmide extrahiert werden, um diese mittels PCR-basierten Methoden auf ARG und auf Replikon-Gene zu

analysieren. Diese können zur Klassifizierung der Plasmide verwendet werden. Ziel ist es außerdem die Wirksamkeit der ARG in den Transkonjuganten *E. coli*-Stämmen gegen die entsprechenden Antibiotika in Plattendiffusionstests zu bestimmen.

Tabelle 21: Übersicht über potenzielle *Salmonella*-Isolate von neun verschiedenen Serovaren mit erworbenem ARG/MGE. Isolate wurden nach einwöchiger Inkubation mit Gülle allein oder zwei mit Gülle ergänzten Böden mit unterschiedlicher landwirtschaftlicher Praktiken-Vorbehandlung und Kopfsalat isoliert. Resistenz gegen neun verschiedene Antibiotika wurde beobachtet.

Serovar	LT2	14028s	Senftenberg	Newport	Infantis	Infantis (basil)	Infantis (TEAGASC)	Newport (TEAGASC)	Szentés	Gesamt nr. von Isolaten	Prozentsatz der gesamten Isolate
Gülle	16	9	3	18	4	0	2	10	0	62	6.78%
Halle Boden	33	74	36	35	32	48	32	37	32	359	39.23%
Halle Boden + Gülle	12	2	1	1	0	10	0	0	1	27	2.95%
BS1 Boden	0	16	2	4	0	16	1	18	0	57	6.23%
BS1 Boden + Gülle	48	70	32	49	49	54	49	26	33	410	44.8%
Gesamt	109	171	74	107	85	128	84	91	66	915	

Antibiotikum	Amp	Km	Cip	Tet	Imp	Cef	Dox	Col	Gm
Kolonienummer	136	24	26	19	0	29	41	375	265

Wir konnten feststellen, dass landwirtschaftlich genutzte Böden Bakterien enthalten, deren ARGs auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert sind, die Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika vermitteln können. Außerdem konnten wir feststellen, dass Salmonellen, die in diese Böden inokuliert wurden, in der Lage sind MGE mit ARG aufzunehmen und so Resistenzen gegen entsprechende Antibiotika erhalten. Wir konnten dadurch bestätigen, dass der Erwerb von ARGs durch menschliche Krankheitserreger in der Landwirtschaft zustande kommen kann.

4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse (FDMP)

Kolleginnen und Kollegen aus Wissenschaft, Beratung und Praxis werden die Ergebnisse des Projektes durch Veröffentlichung dieser in internationalen als auch nationalen Fachjournalen zugänglich gemacht. Ein Teil der Ergebnisse ist bereits publiziert (siehe 4.1).

Das Projekt *plantinfect-2* unterstützt die Ergebnisse des Projektes *plantinfect* und erlaubt damit robustere Aussagen bezüglich des Risikos der Besiedlung von Nutzpflanzen mit Humanpathogenen (HPB). Die Ergebnisse unterstreichen, dass Nutzpflanzen potentiell nur in einer sehr geringen Häufigkeit von HPB besiedelt werden, wobei begünstigende Risiko-Faktoren aufgedeckt wurden.

Die Untersuchungen, hinsichtlich der Fähigkeit von Salmonellen im Boden zu überleben, haben gezeigt, dass Salmonellen einschließlich des einbezogenen *E. coli* EHEC/EAEC Stammes in allen getesteten landwirtschaftlichen Böden noch nach 12 Wochen nachweisbar waren. Nach 12 Wochen wurde eine Zahl von mehr als 10-100 kultivierbaren HPB pro Gram ermittelt, die einerseits über der Infektionsdosis liegt, andererseits für die Besiedlung einer Nutzpflanze ausreichend ist. Da HPB über organische Dünger wie z.B. Gülle in den Boden eingebracht werden können, ist auf Basis dieser Ergebnisse eine Lagerung von organischen Düngern von mehr als 12 Wochen in Bezug auf eine Risikobewertung zu diskutieren. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Untersuchungen im Labormaßstab unter konstanten Bedingungen erfolgten und daher nicht auf Bedingungen in der Praxis bzw. auf gegebene schwankende Umweltbedingungen (wie z.B. der Temperatur) direkt übertragen werden können. Vergleichende Untersuchungen zur Persistenz von HPB in landwirtschaftlichen Böden, versetzt mit organischem Dünger, sind daher unter entsprechenden simulierten schwankenden Temperaturbedingungen, welche die Feldsituation reflektieren, durchzuführen. In diesem Zusammenhang ist zu überlegen, ob für Feldversuche oder weitere Gewächshausversuche nichtpathogene Surrogate eingesetzt werden können.

Die Ergebnisse weisen einen deutlichen Einfluss der Temperatur auf die Persistenz von Salmonellen im Boden als auch in der Phyllosphäre aus. Entgegen der Annahme unterstreichen die Ergebnisse zur Wachstumskinetik, dass *Salmonella* niedrigere Temperaturbedingungen überleben können und sich auch unter diesen Bedingungen, wenn auch deutlich verzögert, vermehren. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass *Salmonella* bei 12°C Virulenzfaktoren exprimieren. Damit wäre auch bei niedrigen Temperaturen eine Besiedlung einer Nutzpflanze mit *Salmonella* möglich einschließlich einer Übertragung auf den Menschen. Dies ist ebenfalls in einer Risikobewertung zu berücksichtigen.

Der in die Untersuchungen einbezogene EHEC/EAEC Stamm ist in der Lage Salatpflanzen bzw. deren essbaren Teile zu besiedeln. Obwohl die Wiederfindungsrate von HPB in kontaminierten

Bodenproben gering war (9 und 13,5%), war eine Besiedlung der Pflanze über die Wurzel gegeben. Auch diese Ergebnisse unterstreichen, dass Nutzpflanzen mit HPB über die Wurzel nur in einer geringen Häufigkeit unter kontrollierten Bedingungen besiedelt werden. Unter Freilandbedingungen könnte eine noch geringere Häufigkeit in der Besiedlungsrate gegeben sein, was jedoch zu untersuchen ist. In diesem Zusammenhang ist der Erwerb von Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) durch *S. enterica* zu erwähnen. Mikroorganismen können solche Resistenzgene untereinander austauschen bzw. weitergeben. Der potentielle Eintrag von ARGs in Agrarsysteme und damit deren potentielle Übertragung über die Wurzel auf eine Nutzpflanze und damit letztendlich auf den Menschen ist in einer Risikobewertung unbedingt zu berücksichtigen.

Die Besiedlung von Nutzpflanzen durch Salmonellen wird deutlich von den Bedingungen während der Pflanzenanzucht aber auch von dem Eintragsmedium (z.B. Gülle) von HPB beeinflusst. Ein Eintrag von HPB in ein Agrarsystem kann in der Praxis auch durch die Bewässerung erfolgen. Diese Faktoren (Eintragsmedium wie organische Dünger, Kultivierungsbedingungen der Pflanze einschließlich Temperatur und Bewässerung) sowie Kreuzkontaminationen während der Ernte stellen ein erhebliches Risiko für Kontaminationen von Nutzpflanzen mit HPB dar und sind ebenfalls in die Risikobewertung einzubeziehen.

Des Weiteren weisen die Ergebnisse der Proteomanalysen auf deutliche Veränderungen des Proteoms von *Salmonella* in Abhängigkeit von der Anzuchttemperatur hin. Dies kann möglicherweise deutlich auf das Potential von *Salmonella* Nutzpflanzen zu besiedeln auswirken. Untersuchungen zum Nachweis von EHEC an Obst und Gemüse in Deutschland seit dem Ausbruchsgeschehen von EHEC O104:H4 im Jahr 2011, haben gezeigt, dass ein geringes Kontaminationsrisiko nicht auszuschließen ist. Die Ergebnisse des Vorhabens *plantinfect-2* unterstreichen, dass dieses Risiko gegeben sein kann. Insbesondere die Lagerungszeit von organischem Dünger/Gülle als auch die Bodenbearbeitung sollten in die Diskussion der Risikobewertung einbezogen werden. Die Ergebnisse zum Einsatz von Kalk in der Bodenbearbeitung zeigen, dass die Kalkung des Bodens die Persistenz von Salmonellen im Boden positiv beeinflusst.

4.1 Projektrelevante Publikationen

Mehrere Manuskripte wurden bereits in peer-review Journalen oder Buchkapiteln veröffentlicht. Derzeit sind weitere Publikationen in Vorbereitung.

1. Detert, K. and Schmidt, H. (2021) Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 strain C227/11Φcu in agricultural soils depends on *rpoS* and environmental factors. *Pathogens* 10: 1443.
2. Detert, K., Währer, J., Nieselt K., Schmidt, H. (2023) Survival of *E. coli* O104:H4 strain C227/11Φcu in a soil microenvironment is associated with a broad time-dependent transcriptional activity of metabolic genes (in Vorbereitung)
3. Elpers L, Lüken L, Lange F, Hensel M. (2022) Factors Required for Adhesion of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to *Lactuca sativa* (Lettuce). *Microbiol Spectr.* 2022 Dec 19:e0343622. doi: 10.1128/spectrum.03436-22. Online ahead of print.
4. Elpers L, Deiwick J, Hensel M (2022) Effect of Environmental Temperatures on Proteome Composition of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Mol Cell Proteomics.* 2022 Aug;21(8):100265. doi: 10.1016/j.mcpro.2022.100265. Epub 2022 Jul 2.
5. Elpers L, Hensel M. (2022) Analysis of *Salmonella enterica* Adhesion to Leaves of Corn Salad or Lettuce. *Methods Mol Biol.* 2022;2427:167-175. doi: 10.1007/978-1-0716-1971-1_14.
6. Elpers L, Hensel M. (2022) Expression and Functional Characterization of Various Chaperon-Usher Fimbriae, Curli Fimbriae, and Type 4 Pili of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Sakai. *Front Microbiol.* 2020 Mar 20;11:378. doi: 10.3389/fmicb.2020.00378. eCollection 2020.
7. Elpers L, Kretzschmar J, Nuccio SP, Bäuml AJ, Hensel M. (2020) Factors Required for Adhesion of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to Corn Salad (*Valerianella locusta*). *Appl Environ Microbiol.* 2020 Apr 1;86(8):e02757-19. doi: 10.1128/AEM.02757-19. Print 2020 Apr 1.
8. Zarkani AA, Schikora A. (2021) Mechanisms adopted by *Salmonella* to colonize plant host. *Food Microbiol.* 2021 Oct;99:103833. doi: 10.1016/j.fm.2021.103833. Epub 2021 May 20.
9. Schikora A, Jackson RW, Van Overbeek L, Holden N. (2020) Editorial: Plants as Alternative Hosts for Human and Animal Pathogens - Second Edition. *Front Microbiol.* 2020 Jul 14;11:1439. doi: 10.3389/fmicb.2020.01439. eCollection 2020.
10. Major N, Schierstaedt J, Jechalke S, Nesme J, Ban SG, Černe M, Sørensen SJ, Ban D, Schikora A. (2020) Composted Sewage Sludge Influences the Microbiome and Persistence of Human Pathogens in Soil. *Microorganisms.* 2020 Jul 9;8(7):1020. doi: 10.3390/microorganisms8071020.
11. Zarkani AA, López-Pagán N, Grimm M, Sánchez-Romero MA, Ruiz-Albert J, Beuzón CR, Schikora A. (2020) *Salmonella* Heterogeneously Expresses Flagellin during Colonization of Plants. *Microorganisms.* 2020 May 29;8(6):815. doi: 10.3390/microorganisms8060815.
12. Schierstaedt J, Jechalke S, Nesme J, Neuhaus K, Sørensen SJ, Grosch R, Smalla K, Schikora A. (2020) *Salmonella* persistence in soil depends on reciprocal interactions with indigenous microorganisms. *Environ Microbiol.* 2020 Jul;22(7):2639-2652. doi: 10.1111/1462-2920.14972. Epub 2020 Mar 12.
13. Major N, Jechalke S, Nesme J, Goreta Ban S, Černe M, Sørensen SJ, Ban D, Grosch R, Schikora A, Schierstaedt J. (2022) Influence of sewage sludge stabilization method on microbial community and the abundance of antibiotic resistance genes. *Waste Manag.* 2022 Oct 12;154:126-135. doi: 10.1016/j.wasman.2022.09.033.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektes war die Frage zu beantworten, ob in den Boden eingetragene human-pathogene Bakterien (HPB) in der Lage sind im Boden zu überleben und welche Faktoren die Persistenz begünstigen. Die Fähigkeit von HPB im Boden zu überleben und sich an die Bedingungen im Boden anzupassen ist ein wichtiger Aspekt für eine erfolgreiche Kolonisierung von Kulturpflanzen. Die Ergebnisse zeigen, dass die getesteten *Salmonella*-Stämme als auch der eingesetzte *E. coli* EHEC/EAEC Stamm C227/11Φcu in der Lage waren über einen Zeitraum von 12 Wochen unter konstanten Inkubationsbedingungen in verschiedenen Böden zu überleben. Die Überlebensrate von Salmonellen und EHEC/EAEC wird dabei sowohl vom Bodentyp und deren Bearbeitung als auch von Umweltfaktoren wie der Temperatur beeinflusst. Bakterielle Faktoren selbst sind für das Überleben im Boden ebenfalls von großer Bedeutung. Reproduzierbar konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Gülle oder Kalk zum Boden ein deutlich positiver Einfluss auf die Persistenz von Salmonellen und EHEC/EAEC im Boden gegeben ist. Auch niedrige Temperaturbedingungen (z.B. 4°C) haben keinen negativen Einfluss auf die Persistenz von Salmonellen im Boden.

Durch z.B. Zugabe von organischem Dünger in den Boden kann ein Eintrag von Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) erfolgen, die auf Salmonellen übertragen werden können. z.B. auf in der Rhizosphäre. Dies wurde untersucht und die Ergebnisse, dass eine Übertragung von ARGs auf Salmonellen möglich ist. Bei Besiedlung von essbaren Pflanzenteilen mit Salmonellen ist dieses Risiko zu berücksichtigen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Im Weiteren stellte sich die Frage, ob Kulturpflanzen durch HPB, ausgehend von kontaminiertem Boden, besiedelt werden können. Die Ergebnisse mit den Modellpflanzen Kopf- und Feldsalat zeigen wiederholt, dass *Salmonella enterica* und EHEC/EAEC in der Lage sind, Kulturpflanzen über die Wurzel zu kolonisieren und nachfolgend auch die essbaren oberirdischen Pflanzenteile besiedeln. Bei höheren Temperaturbedingungen (z.B. 28°C) war in den essbaren oberirdischen Pflanzenteilen von Kopfsalat ein positiver Einfluss auf die Persistenz von Salmonellen zu beobachten. Des Weiteren weisen die Proteomanalysen von *S. Typhimurium*, angezogen in Voll- (LB) und Minimalmedium (PCN, pH 7,4, 1 mM P_i), erhebliche Unterschiede in der Proteinzusammensetzung in Abhängigkeit von der Temperatur (im Bereich 8°C bis 37°C) aus. Es ist davon auszugehen, dass dadurch temperaturbedingt die Besiedlung von Nutzpflanzen mit HPB z.B. auch bei geringer Temperatur beeinflusst wird.

Insgesamt ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Versuche unter konstanten Bedingungen durchgeführt wurden, unter denen nur ein geringer Anteil an Pflanzen mit HPB besiedelt wurde. Potentiell ist von einem geringen Infektionsrisiko auszugehen. Es ist jedoch notwendig, die Besiedlungsrate von Kulturpflanzen mit HPB unter variierenden Umweltbedingungen, welche die Feldsituation reflektieren, zu untersuchen, um das mögliche Risiko besser einschätzen zu können.

Die Ergebnisse des Projektes zeigen, dass Kulturpflanzen, ausgehend von mit HPB kontaminiertem Boden, mit HPB besiedelt werden können. Daher stellte sich die Frage, ob eine generationsübergreifende Übertragung z.B. über das Saatgut möglich ist. Dies wurde in Gewächshausversuchen an Kresse, Bockshornklee und Tomate, die mit Salmonellen infiziert wurden untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die generationsübergreifende Übertragung unwahrscheinlich ist, jedoch nicht absolut ausgeschlossen werden kann.

Im Rahmen des Projektes wurde im Labormaßstab unter hydroponischen Kulturbedingungen mit Salatpflanzen die Überlebensrate von *Salmonella* in der Nährlösung im Vergleich zur Kultivierung im Boden ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass ein sehr hoher Anteil der Pflanzen kolonisiert wurde. Unter diesen Bedingungen wurden auch *Salmonella* Mutanten auf der Basis einer *S. Typhimurium* generierten mTn5-Mutantenbank eingesetzt, um den Einfluss bestimmter Gene auf die Besiedlung in der Rhizosphäre von Salatpflanzen mittels *Next Generation Sequencing* zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass in der Rhizosphäre von Kopfsalat, kultiviert in autoklaviertem Boden eine höhere Dichte von *S. Typhimurium* im Vergleich zur Kultivierung in hydroponischer Kultur gegeben war. Hierbei wurde der Sigma Faktor der RNA Polymerase RpoS als wichtiger bakterieller Faktor für das Überleben und Besiedlung identifiziert. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse der Transkriptomanalyse, dass die Stressantwort bzw. die Expression von Stressassoziierten Genen eine wichtige Rolle für das Überleben von *Salmonella* darstellen. Außerdem weisen die Ergebnisse aus, dass sich HPB wie der EHEC/EAEC Stamm an die geringere Nährstoffverfügbarkeit im Boden anpassen und alternative C- und N-Quellen zur Ernährung nutzen.

6 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

AP1. Einfluss der Bodeneigenschaften, Anbaupraxis und weiterer Faktoren auf das Überleben von Humanpathogenen in landwirtschaftlich genutzten Böden

Die Ziele des AP1-A „Überleben von *S. enterica* in Abhängigkeit von Bodenart und Bewirtschaftung“ wurden erreicht. Es waren deutliche Unterschiede in der Persistenz verschiedener *Salmonella*-Stämme im Boden auch in Abhängigkeit von Bewirtschaftungsmaßnahmen zu beobachten.

AP1-B „Persistenz von EHEC im Boden in Abhängigkeit von Risikofaktoren“ konnten im Rahmen des Projekts abgeschlossen werden. Allerdings wurde für die Arbeiten deutlich mehr Zeit benötigt als im Plan vorgesehen. Gründe dafür waren vom Antragsteller unverschuldet. Insbesondere Umbaumaßnahmen im Gebäude und corona-bedingte Arbeitseinschränkungen erschwerten das Vorkommen immens. Somit musste die Inkubation und zeitlich verzögerten Probennahmen größtenteils mehrfach begonnen werden. Nach anfänglichen Schwierigkeiten konnte die Transkriptomanalyse für einen EHEC-Stamm durchgeführt und abgeschlossen werden. Die erste Probesequenzierung zeigte, dass die isolierte RNA aus den Böden größtenteils von Bodenbakterien stammt und ein Mapping gegen das *E. coli* Genom nicht möglich war. Dies erforderte eine Modifizierung des Protokolls und einen erneuten Versuchsansatz. Der ursprüngliche Zeitplan konnte daher nicht eingehalten werden, da die Experimente zur Transkriptomanalyse deutlich mehr Zeit erforderten. Die Ziele dieses AP wurden dennoch erreicht.

AP2 Einfluss der Anbaupraxis auf die Anzahl und Dauer der im Boden vorhandenen Humanpathogene, ihrer Motilität sowie Fähigkeit an Bodenpartikel anzuhafte und die Pflanze zu besiedeln

Die Ziele des AP2-A „Einfluss von landwirtschaftlicher Anbaupraxis auf die Besiedlungsrate von Pflanzen durch Salmonellen“ konnten erreicht werden. Als positiv ist anzusehen, dass die Pflanzen nur in einer geringen Häufigkeit mit HPB besiedelt wurden. Gesicherte Aussagen hinsichtlich der Unterschiede zwischen *Salmonella*-Stämmen oder Bodentypen wurden dadurch jedoch erschwert. Eine Beurteilung des Einflusses von Zellzahl und Persistenz von Salmonellen war experimentell im Rahmen des Projektes nicht möglich. Im AP2-B wurde daher das „Verhältnis zwischen Zellzahl und Verweildauer der Salmonellen im Boden und der Besiedlungsrate an der Pflanze“ nicht weiter untersucht.

Das Ziel des AP2-C „Adaptation der Salmonellen an die Bedingungen im Boden“ konnte erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Prä-Adaptation auf einem in *plantinfect-2* entwickeltem ‚Güllemedium‘ sich positiv auf die Persistenz von *S. Szentes* im Boden auswirkt. Die Prä-

Adaptation auf dem ‚Güllemedium‘ hat zudem einen deutlich positiveren Einfluss auf die Persistenz im Boden im Vergleich zur Prä-Adaptation auf dem ‚Salatmedium‘ (siehe Ergebnisse *plantinfect*).

In dem AP2-D „Einfluss der Kultivierung im Boden und in hydroponischer Kultur auf die Besiedlung von Pflanzen durch Salmonellen“ konnten alle Ziele erreicht werden. Die Rhizosphäre von Kopfsalat wird in einer höheren Dichte mit HPB besiedelt bei Kultivierung im Boden im Vergleich zur Kultivierung in hydroponischer Kultur. Weiterführend sollte die Besiedlungsdichte und –rate von Kulturpflanzen unter praxisnahen Bedingungen untersucht werden. Dies war im Rahmen dieses Projektes nicht möglich, da mit S2-Organismen gearbeitet wurde.

AP2-E „Motilität und Anhaftung von Humanpathogenen in Abhängigkeit vom Bodentyp“ konnte aufgrund des höheren Arbeitsumfanges der anderen AP nicht bearbeitet werden. In *plantinfect* wurde bereits bei der Besiedlung der Wurzeln der Einfluss der Motilität untersucht. Hier konnte kein Einfluss der *fliC* Deletion festgestellt werden. Auch hat das FliC keinen Einfluss auf das Überleben des EHEC-Stamms im Boden. Die doch umfangreicheren Untersuchungen zur Überlebensrate als auch die Transkriptomanalysen haben für zeitlichen Rückstand im Plan geführt. Die Protokolle dazu mussten angepasst werden (siehe oben). Zusätzlich kam es corona-bedingt zu Einschränkungen (s.o.) im Versuchsablauf, so dass die Ziele dieses AP nicht erreicht werden konnten.

AP2-F „Zeitliche und räumliche Aufklärung der Besiedlung von Pflanzen durch EHEC“ konnte im angestrebten Zeitraum abgeschlossen werden. Allerdings wurde der Einfluss von organischer Düngerzugabe nicht getestet, da sich die Versuche als aufwändiger erwiesen haben als angenommen. Die Versuche wurden im Labormaßstab durchgeführt und konnten nicht im größeren Maßstab durchgeführt werden. In den Hauptversuchen wurde EHEC aus Blättern isoliert. Jedoch war die Wiederfindungsrate sehr niedrig und die Ergebnisse daher schwer reproduzierbar, da die Keimzahlen oft unterhalb des Detektionslimit lagen. Dennoch konnte klar gezeigt werden, dass EHEC die Pflanzen ausgehend von Wurzeln besiedeln.

AP3. Aufklärung der Rolle von Ernährungszustand und Temperatur auf die Besiedlung der Pflanze

In dem AP3-A „Einfluss des Ernährungszustands der Pflanze auf die Besiedlung mit Humanpathogenen“ konnten die Ziele erreicht werden. Es wurde eine Abhängigkeit der Besiedlungsrate und der Persistenz von Salmonellen in Pflanzen, von dem Eisenniveau der Pflanze beobachtet.

Die Ziele des AP3-B „Einfluss der Temperatur auf die Besiedlung mit Humanpathogenen“ konnten erreicht werden. Es wurde eine erhöhte Persistenz von Salmonellen in Blättern von Salatpflanzen bei steigender Temperatur beobachtet. Des Weiteren wurden deutliche Unterschiede in der Proteinzusammensetzung in Abhängigkeit von der Temperatur (8°C und 37°C) beobachtet.

AP4 Generationenübergreifende Übertragung von Humanpathogenen

In dem AP4 „Generationenübergreifende Übertragung von Humanpathogenen“ konnten nur in sehr wenigen Fällen Salmonellen in der nächsten Pflanzengeneration nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht reproduzierbar, was die Frage aufwirft, ob das Saatgut eventuell bei der Ernte kontaminiert wurde. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass eine Kontamination der nächsten Generation nicht absolut ausgeschlossen werden kann.

AP5. Erwerb von Antibiotika-Resistenzgenen durch Humanpathogene

Der größte Teil der gesetzten Ziele des AP5 „Erwerb von Antibiotika-Resistenzgenen durch Humanpathogene“ konnte erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass es ein großes Potential für die Aufnahme von ARGs durch Salmonellen aus der Umwelt und aus organischen Düngern. Aufgrund der unbekanntenen Beschaffenheit der mobilen genetischen Elemente (MGEs) und der aufwändigen Extraktionsverfahren ist es bisher nicht gelungen die MGEs und deren ARGs abschließend zu charakterisieren. Die Ergebnisse erlauben jedoch die Abschätzung möglicher Risiken. Bei einem Krankheitsausbruch, der auf pflanzliche Frischeprodukte zurückzuführen ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass HPB in der Pflanzenumgebung zuvor ARGs erworben haben, die beim Menschen eine spätere Behandlung mit Antibiotika erheblich erschweren können.

7 Literaturverzeichnis

- Ashburner M, Ball CA, Blake JA *et al.* (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**:25-29.
- Babin D, Sommermann L, Chowdhury PS, Behr JH *et al.* (2021) Distinct rhizomicrobiota assemblages and plant performance in lettuce grown in soils with different agricultural management histories. *FEMS Microbiol Ecol* **97**(4), fiab027.
- Berg G, Köberl M, Rybakova D *et al.* (2017) Plant microbial diversity is suggested as the key to future bio-control and health trends. *FEMS Microbiol Ecol* **93**:fix050.
- Brandl MT (2006) Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Ann Rev Phytopath* **44**, 367-392.
- Breakwell DP, Moyes RB & Reynolds J (2009) Differential staining of bacteria: flagella stain. *Curr Protoc Microbiol* **Appendix 3**: Appendix 3G.
- Brennan FP, Moynihan E, Griffiths BS *et al.* (2014) Clay mineral type effect on bacterial enteropathogen survival in soil. *Sci Total Environ* **468-469**:302–5.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N & Knight R (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4516-4522.
- EFSA, ECDC. (2017) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J* **15**:5077.
- Elpers L & Hensel M (2020) Factors required for adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to lettuce (*Lactuca sativa*). *bioRxiv*.
- Elpers L & Hensel M (2022) Analysis of *Salmonella enterica* Adhesion to Leaves of Corn Salad or Lettuce. *Methods Mol Biol* **2427**:167-175.
- Elpers L, Deiwick J & Hensel M (2022) Effect of environmental temperatures on proteome composition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Cell Proteomics* **21**: 100265.
- Elpers L, Kretschmar J, Nuccio SP, Baumler AJ & Hensel M (2020) Factors Required for Adhesion of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to Corn Salad (*Valerianella locusta*). *Appl Environ Microbiol* **86**.
- Ershov D, Phan MS, Pylvanainen JW *et al.* (2022) TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines. *Nat Methods* **19**: 829-832.
- 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.
- Kanehisa M & Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* **28**: 27-30.
- Jacobsen CS, Bech TB (2012) Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Res Int* **45**:557–66.
- Jechalke S, Schierstaedt J, Becker M *et al.* (2019) *Salmonella* establishment in agricultural soil and colonization of crop plants depend on soil type and plant species. *Front Microbiol* **10**:967.
- Koukkidis G., & Freestone P (2018) *Salmonella* contamination of fresh salad produce: prevalence, impact and reduction strategies. *J Hortic Sci Crop Res* **1**: 1–7.
- Locatelli A, Spor A, Jolivet C *et al.* (2013) Biotic and abiotic soil properties influence survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS One* **8**:e75969.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E *et al.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676-682.
- Schierstaedt J, Jechalke S, Nesme J *et al.* (2020) *Salmonella* persistence in soil depends on reciprocal interactions with indigenous microorganisms. *Environ Microbiol* **22**(7), 2639-2652.
- Semenov AV, van Overbeek L, Termorshuizen AJ *et al.* (2011) Influence of aerobic and anaerobic conditions on survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Luria–Bertani broth, farm-yard manure and slurry. *J Environ Manage* **92**:780–7.

Sundberg C, Al-Soud WA, Larsson M, Alm E, Yekta SS, Svensson BH, Sorensen SJ & Karlsson A (2013) 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 612-626.

The Gene Ontology C (2019) The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic acids research* **47**: D330-D338.

Van Overbeek LS, van Doorn J, Wichers JH *et al.* (2014) The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Front Microbiol* **5**, 104.

Zimmermann J (2014) Entwicklung und Validierung schneller und selektiver Verfahren zum Nachweis von *Salmonella enterica*, *Cronobacter* spp. und *Bacillus cereus* in Milcherzeugnissen. Thesis, Kommunikations-, Informations- und Medienzentrum der Universität Hohenheim, Hohenheim.

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

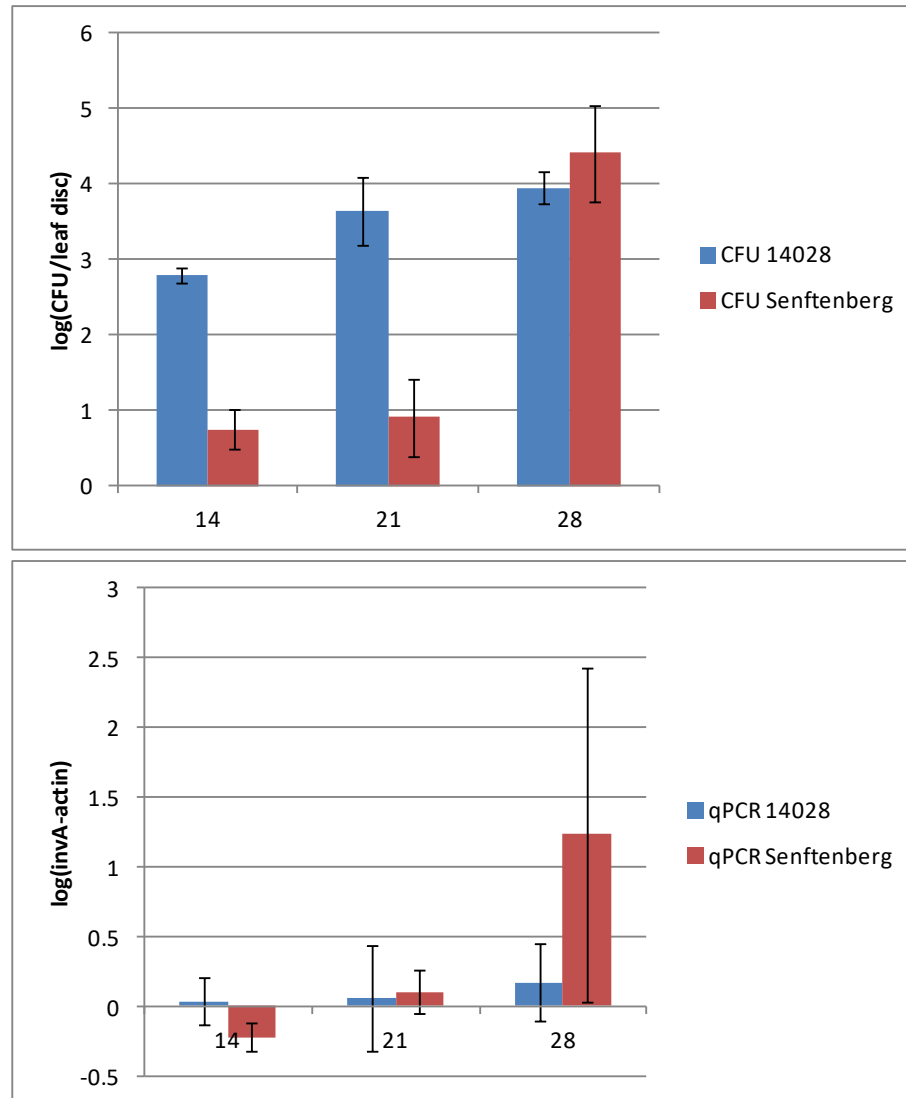


Abbildung S1: Vergleich von CFU und amplifizierter cDNA aus Blattproben. Die Ergebnisse der qPCR waren sehr schwankend und lieferten keine belastbaren Ergebnisse.