

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie  
des Max Rubner-Instituts,  
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

Charakterisierung der Plasmide von Enterobakterien aus pflanzlichen Frischeprodukten und  
Übertragung von Antibiotikaresistenzplasmiden zwischen Bakterien auf pflanzlichen  
Lebensmitteln

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
M.Sc. Maria Theresa Stein  
aus Forchheim

Kiel, 2023

---

Dekan: Prof. Dr. Georg Thaller

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charles M. A. P. Franz  
2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Christina Hölzel

Tag der mündlichen Prüfung: 01. November 2023

Für meine Liebsten

## Abstract

Fresh produce is an important part of a balanced human diet and is often consumed raw to preserve nutritionally valuable compounds such as vitamins, minerals and fiber. However, fresh produce can also serve as a vehicle for pathogenic and/or antibiotic resistant bacteria. Antibiotic resistance is a worldwide problem and by consuming fresh produce without a decontamination step, viable antibiotic resistant bacteria can be consumed. Of particular concern are bacteria carrying conjugative resistance plasmids, as they are potentially capable of transferring antibiotic resistance genes from bacteria of the food matrix to bacteria of the gut microbiota. Therefore, in this study plasmids from 22 antibiotic resistant enterobacteria from fresh produce were characterized by using Unicycler to combine whole genome sequencing results of MiSeq and MinION sequencing. Plasmid characterization allowed selection of one *Klebsiella (K.) pneumoniae* and two *Escherichia (E.) coli* isolates as potential donor strains for conjugation experiments with the plasmidless *E. coli* CV601 recipient strain. The *K. pneumoniae* donor strain was used to evaluate the influence of mating agar (LB- or salad-agar) and temperature (10 °C, 21 °C or 37 °C) on the transfer rate of the plasmid. In addition, mating assays were conducted on sprouts and mixed salads at 10 °C and 37 °C using *K. pneumoniae* as donor strain. Lastly, exogenous plasmid isolation was performed using *E. coli* CV601 to capture plasmids encoding a tetracycline or cefotaxime resistant phenotype from sprouts. The transconjugants were phenotypically tested for antibiotic resistance. After NextSeq and MinION sequencing and subsequent hybrid assembly (Unicycler) of the nucleotide sequences, the plasmids were genotypically characterized. For the sprout samples utilized in exogenous plasmid isolation, 16S rRNA gene metagenomics was performed by MinION sequencing of the whole 16S rRNA region to show the genus richness and to identify potential donor strains for the exogenously captured plasmids. Regarding the antibiotic resistant enterobacteria isolated from fresh produce, a total of 40 plasmids were detected in 17 of the isolates, while five strains possessed no plasmids. The plasmids were very diverse in terms of size (2 kbp - 326 kbp), mobilization and amount of antibiotic resistance genes. IncF was the most abundant replicon type in large plasmids (> 32 kbp), whereas small plasmids (< 7 kbp) were identified as Col-like plasmids, if these were typeable by PlasmidFinder. Three donor strains were selected for conjugation experiments harboring one potentially conjugative plasmid with a tetracycline resistance gene. Of those, one *E. coli* and one *K. pneumoniae* successfully produced transconjugants. The resistance plasmid of *K. pneumoniae* showed highest transfer rates on salad agar at 37 °C, but transfer was also observed on LB- and salad-agar at all temperatures except 10 °C. Transfer at 10 °C was detected only for conjugation on LB-agar after enrichment in selective medium. Transfer on sprouts and mixed salad was detected at 37 °C after 22 h and, at very low frequencies also at 10 °C after 4 days. This result emphasizes the importance of keeping fresh produce at low temperatures at all times to prevent dissemination of antibiotic resistance genes. Exogenous plasmid isolation successfully captured plasmids conferring tetracycline, but not cefotaxime resistance phenotypes. Characterization of the antibiotic resistance plasmids of the transconjugants showed mostly IncFII plasmids with *tet(A)* and further resistance genes or IncFIB plasmids with *tet(D)* resistance gene. The phenotypic resistance of the transconjugants was very low. Metagenomic analysis of the 16S rRNA gene revealed the very diverse microbiota of sprouts, with *Pseudomonas* being the most abundant in all sprout samples.

Bacteria of the genera *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Citrobacter* were also present and could be potential donors of the tetracycline resistance plasmids captured by exogenous plasmid isolation. In conclusion, fresh produce harbored antibiotic resistant bacteria and partly bacteria with conjugative antibiotic resistance plasmids. Therefore, fresh produce can be one of probably several vehicles for transferring antibiotic resistance plasmids to humans.

## Zusammenfassung

Frisches Obst, Gemüse und Salat sind wichtige Bestandteile einer ausgewogenen Ernährung. Um wertvolle Nährstoffe wie Vitamine, Mineralien und Ballaststoffe zu erhalten, werden diese Lebensmittel oft roh verzehrt. Allerdings können pflanzliche Frischeprodukte auch als Transportvehikel für pathogene und antibiotikaresistente Bakterien dienen. Antibiotikaresistenz bei Bakterien ist ein weltweites Problem, und durch den Verzehr von pflanzlichen Frischeprodukten ohne Dekontaminierungsschritt können lebensfähige antibiotikaresistente Bakterien vom Menschen aufgenommen werden. Besonders besorgniserregend sind Bakterien mit konjugativen Antibiotikaresistenzplasmiden, die Antibiotikaresistenzgene zwischen Bakterien übertragen können. Eine Übertragung der Plasmide von den Bakterien der Lebensmittelmatrix auf Bakterien der menschlichen Darmmikrobiota ist potenziell möglich. Um das tatsächliche Gefahrenpotenzial besser beurteilen zu können, wurden in der vorliegenden Studie zunächst die Plasmide von 22 antibiotikaresistenten Enterobakterien von pflanzlichen Frischeprodukten charakterisiert. Dabei wurde Unicycler verwendet, um die Ergebnisse der MiSeq- und MinION-Ganzgenomsequenzierung zu kombinieren (Hybridassemblierung). Durch die Charakterisierung der Plasmide wurden ein *Klebsiella* (*K.*) *pneumoniae*- und zwei *Escherichia* (*E.*) *coli*-Isolate als mögliche Spenderstämme für Konjugationsversuche mit dem plasmidfreien *E. coli*-Empfängerstamm CV601 ausgewählt. Der *K. pneumoniae*-Spenderstamm wurde verwendet, um den Einfluss des Agars (LB- bzw. Salat-Agar) und der Temperatur (10 °C, 21 °C bzw. 37 °C) auf die Transferrate des Plasmids zu untersuchen. Außerdem wurden Konjugationsversuche auf Sprossen und Mischsalat bei 10 °C und 37 °C mit *K. pneumoniae* als Spenderstamm vorgenommen. Schließlich wurde eine exogene Plasmid-Isolierung mit dem Empfängerstamm *E. coli* CV601 durchgeführt, um Plasmide, die einen Tetracyclin- oder Cefotaxim-resistenten Phänotyp vermitteln, von Sprossenproben einzufangen. Die phänotypische Antibiotikaresistenz der Transkonjuganten wurde mittels Agardiffusionstest ermittelt. Nach NextSeq- und MinION-Sequenzierung sowie anschließender Hybridassemblierung (Unicycler) wurden die Plasmide genotypisch charakterisiert. Von den Sprossenproben wurde eine 16S rRNA-Gen Metagenom-Sequenzierung der gesamten 16S rRNA-Genregion mittels MinION durchgeführt, um die Diversität an Gattungen sowie potenzielle Spenderstämme für die exogen eingefangenen Plasmide zu identifizieren. Bezüglich der antibiotikaresistenten Enterobakterien aus pflanzlichen Frischeprodukten wurden insgesamt 40 Plasmide in 17 Isolaten nachgewiesen während fünf Stämme keine Plasmide aufwiesen. Die Plasmide waren sehr unterschiedlich in Bezug auf ihre Größe (2 kbp - 326 kbp), Mobilität und Anzahl an Antibiotikaresistenzgenen. IncF war der häufigste Replikon-Typ bei großen Plasmiden (> 32 kbp), während es sich bei kleinen Plasmiden (< 7 kbp), sofern sie mit PlasmidFinder typisierbar waren, um Col-ähnliche Plasmide handelte. Für die Konjugationsexperimente wurden drei Spenderstämme ausgewählt, die ein potenziell konjugatives Plasmid mit einem Tetracyclin-Resistenzgen besaßen. Von den drei potenziellen Spenderstämmen produzierten ein *E. coli*- und ein *K. pneumoniae*-Stamm erfolgreich Transkonjuganten. Das Resistenzplasmid von *K. pneumoniae* zeigte die höchsten Transferraten auf Salat-Agar bei 37 °C, doch wurde der Transfer auch auf LB- und Salat-Agar bei allen Temperaturen außer bei 10 °C beobachtet. Ein Transfer bei 10 °C wurde nur für die Konjugation auf LB-Agar nach Anreicherung in Selektivmedium festgestellt. Eine Übertragung auf

Sprossen und Mischsalat wurde bei 37 °C nach 22 Stunden und in sehr geringer Häufigkeit auch bei 10 °C nach vier Tagen festgestellt. Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit, pflanzliche Frischeprodukte stets bei niedrigen Temperaturen aufzubewahren, um einen Austausch von Resistenzgenen zwischen Bakterien von pflanzlichen Frischeprodukten zu verhindern. Bei der exogenen Plasmid-Isolierung wurden erfolgreich Tetracyclin-Resistenz vermittelnde aber keine Cefotaxim-Resistenz vermittelnden Plasmide erworben. Die Charakterisierung der Antibiotikaresistenzplasmide der Transkonjuganten ergab, dass es sich überwiegend um IncFII-Plasmide mit *tet(A)* und weiteren Resistenzgenen oder IncFIB-Plasmide mit *tet(D)*-Resistenzgenen handelte. Die phänotypische Resistenz der Transkonjuganten war sehr gering. Die 16S rRNA-Gen Metagenom-Analyse ergab eine sehr vielfältige Mikrobiota, wobei die Gattung *Pseudomonas* in allen Sprossen am häufigsten vorkam. Bakterien der Gattungen *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter* waren ebenfalls vorhanden und könnten potenzielle Spender der Tetracyclin-Resistenzplasmide sein, die bei der exogenen Plasmid-Isolierung eingefangen wurden. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass pflanzliche Frischeprodukte antibiotikaresistente Bakterien und teilweise Bakterien mit konjugativen Antibiotikaresistenzplasmiden beherbergen. Somit stellen diese Frischeprodukte eines von wahrscheinlich mehreren Vehikeln für die Übertragung von Antibiotikaresistenzplasmiden auf den Menschen dar.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Antibiotika und die globale Resistenzproblematik .....	1
1.1.1 Horizontaler Gentransfer bei Bakterien – interzelluläre Mobilität.....	3
1.1.2 DNA-Austausch zwischen Sequenzen innerhalb einer Zelle – intrazelluläre Mobilität .....	5
1.2 <i>Enterobacteriaceae</i> und deren Plasmide .....	7
1.2.1 Plasmid-Eigenschaften .....	8
1.2.2 Entschlüsselung der Plasmid-Nukleotidsequenz durch Genomsequenzierung der zweiten und dritten Generation .....	10
1.3 Pflanzliche Frischeprodukte als Träger antibiotikaresistenter Enterobakterien in der Humanernährung.....	11
1.4 Ziele dieser Arbeit .....	14
<b>2 Materialien und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1 Materialien.....	16
2.1.1 Geräte .....	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits.....	16
2.1.3 Chemikalien, Lösungen und Puffer .....	16
2.1.4 Nährmedien .....	17
2.1.5 Verwendete Bakterien- und Referenzstämme .....	19
2.1.6 Software und Online-Tools .....	21
2.2 Methoden zur Charakterisierung von Enterobakterien und ihrer Plasmide .....	23
2.2.1 Minimaler Antibiotika-Hemmkonzentrationstest.....	23
2.2.2 Ganzgenomsequenzierung von Enterobakterien-Isolaten mittels MiSeq.....	24
2.2.3 Ganzgenomsequenzierung von Enterobakterien-Isolaten mittels MinION.....	25
2.2.4 Hybridassemblierung durch Kombination der MiSeq- und MinION-Sequenzierdaten .....	26
2.2.5 Charakterisierung der Enterobakterien-Isolate und ihrer Plasmide – <i>in silico</i> .....	26
2.2.6 Auswahl möglicher Spenderstämme für Konjugationsversuche .....	27
2.3 Konjugationsversuche mit dem Empfängerstamm <i>E. coli</i> CV601 .....	28
2.3.1 Nachweis von Shigatoxin-Genen mittels <i>real time</i> PCR.....	29
2.3.2 Identitätsprüfung der Transkonjuganten mittels PCR und Stammhaltung .....	30
2.3.3 Konjugationsvorversuche.....	33
2.3.4 Konjugationsversuche A: <i>in vitro</i> -Konjugation mit den Stämmen Kpneu28 und CV601.....	36
2.3.5 Konjugationsversuche B: Konjugation auf pflanzlichen Lebensmitteln mit den Stämmen Kpneu28 und CV601 .....	39
2.3.6 Konjugationsversuche C und D: exogene Plasmid-Isolierung .....	41
2.3.7 Agardiffusionstest mit den Transkonjuganten der exogenen Plasmid-Isolierung.....	44

2.3.8	Ganzgenomsequenzierung der Transkonjuganten, Hybridassemblierung und <i>in silico</i> -Auswertung.....	45
2.4	16S rRNA-Gen Metagenom-Analyse der Sprossenmikrobiota mittels MinION-Sequenzierung.....	47
2.5	Statistische Auswertung.....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
3.1	Charakterisierung von Enterobakterien pflanzlicher Frischeprodukte.....	50
3.1.1	Genotypische Charakterisierung der 22 Enterobakterien und ihrer Plasmide.....	50
3.1.2	Phänotypische Antibiotikaresistenz der untersuchten Enterobakterien.....	59
3.1.3	Auswahl der potenziellen Spenderstämme für Konjugationsversuche.....	60
3.2	Konjugationsversuche mit den Spenderstämmen Ec1115, Ec1117 und Kpneu28 .....	64
3.2.1	Konjugationsvorversuche.....	64
3.2.2	Konjugationsversuche A.....	73
3.2.3	Konjugationsversuche B.....	75
3.3	Exogene Plasmid-Isolierung von Antibiotikaresistenzplasmiden unbekannter Spender auf Sprossen.....	77
3.3.1	Phänotypische Antibiotikaresistenzbestimmung der Transkonjuganten .....	78
3.3.2	Genotypische Charakterisierung der von Sprossen exogen eingefangenen Plasmiden.....	79
3.4	16S rRNA-Gen Mikrobiom-Analyse von Sprossenproben.....	87
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>90</b>
4.1	Charakterisierung der Plasmide von Enterobakterien aus pflanzlichen Frischeprodukten .....	90
4.2	Transfer von Antibiotikaresistenzplasmiden zwischen Bakterien – <i>in vitro</i> und auf dem Lebensmittel .....	97
4.3	Rekombinationen bei Antibiotikaresistenzplasmiden .....	102
4.4	Charakterisierung der von Bakterien der Sprossenmikrobiota eingefangenen Plasmide.....	106
4.5	Antibiotikaresistente Bakterien auf pflanzlichen Lebensmitteln – Bedeutung für den Menschen.....	111
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	113
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>116</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>141</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>146</b>
	<b>Liste der Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge</b> .....	<b>147</b>



## Abkürzungsverzeichnis

In der Arbeit gelten die Abkürzungen der SI-Einheiten (Le Système International d'Unités) und die Abkürzungen der Nuklein- und Aminosäuren gemäß der International Union of Pure and Applied Chemistry.

Amp	Ampicillin
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHI	Hirn-Herz-Infusion
BLAST	Basic local alignment search tool
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
bp	Basenpaare
BV-BRC	Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
C.	<i>Citrobacter</i>
CaSo	Casein-Soja-Pepton
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHL	Chloramphenicol
Cif	<i>Citrobacter freundii</i>
Cigi	<i>Citrobacter gillenii</i>
CIP	Ciprofloxacin
Cipa	<i>Citrobacter pasteurii</i>
Cipo	<i>Citrobacter portucalensis</i>
Ciw	<i>Citrobacter werkmanii</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	Gentamicin
CTX	Cefotaxim
dDDH	digitale DNA-DNA-Hybridisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E.	<i>Escherichia</i>
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
En.	<i>Enterobacter</i>
Enb	<i>Enterobacter bugandensis</i>
Endy	<i>Enterobacter dykesii</i>
Enh	<i>Enterobacter hormaechei</i>
ESBL	β-Laktamase mit erweitertem Spektrum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HGT	horizontaler Gentransfer
Inc	Inkompatibilität
IR	Inverted Repeats
IS	Insertionssequenz
ISO	International Organization for Standardization
K.	<i>Klebsiella</i>
KA	Kanamycin
KbE	Koloniebildende Einheiten
kbp	Kilobasenpaar
Kgr	<i>Klebsiella grimontii</i>

Kpneu	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kva	<i>Klebsiella variicola</i>
LB	Lysogeny broth
log <sub>10</sub>	Dekadischer Logarithmus
Mbp	Megabasenpaar
MEM	Meropenem
MHB2	Müller-Hinton-Bouillon 2, Kationen adjustiert
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MPF	Paarbildungssystem (mating pair formation system)
MS	Mischsalat
NARMS	National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>oriT</i>	Transferursprung (origin of transfer)
<i>oriV</i>	Replikationsursprung (origin of replication)
PATRIC	Phylogenetic Tree Building Service
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGAP	Prokaryotic Genome Annotation Pipeline
PHASTER	PHAge Search Tool Enhanced Release
RD	Rifampicin
Rep-Protein	Replikationsprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
S	Streptomycin
SP	Sprossen
STEC	Shigatoxin-produzierende <i>E. coli</i>
SXT	Trimethoprim / Sulfamethoxazol
T4CP	Typ IV Kopplungsprotein
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
TA	Toxin-Antitoxin
TE	Tetracyclin
Tn	Transposon
<i>tra</i> -Gene	Transfergene
USDA	United States Department of Agriculture
VRBD	Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mechanismen des horizontalen Gentransfers bei Bakterien.....	4
Abbildung 2: Übersicht über die durchgeführten Konjugationsversuche.....	28
Abbildung 3: Konjugationsversuch B mit Spender Kpneu28 und Empfänger CV601 in einer 50-ml-Schraubröhre mit 10 g Sprossen (links) und 10 g Mischsalat (rechts).....	39
Abbildung 4: Vergleich der chromosomalen Sequenzabschnitte von Ciw5.1 (64.740 - 76.677) und Ciw5.2 (64.740 - 68.530) mittels Easyfig. Die Abbildung basiert auf den PGAP-Annotationsdaten. Wenn keine Genbezeichnung vorhanden war, wurde die Produktbezeichnung der kodierenden Sequenz gewählt. ....	52
Abbildung 5: Klasse-1-Integrans, die mittels IntegronFinder auf den Chromosomen und den Plasmiden der untersuchten Enterobakterien detektiert wurden. Das Integron von pKPNEU34_2 ist unvollständig, da eine Integron-Integrase fehlt. *Pseudogen (PGAP).....	59
Abbildung 6: Plasmid-Karte des Antibiotikaresistenzplasmids pEC1115_1 des Konjugations-Spenderstammes Ec1115. Die Abbildung wurde mit CGview anhand der PGAP-Annotationsdaten erstellt. Wenn keine Genbezeichnung vorhanden war, wurde die Produktbezeichnung der kodierenden Sequenz gewählt. HP = hypothetisches Protein. *Pseudogen (PGAP).....	61
Abbildung 7: Plasmid-Karte des Antibiotikaresistenzplasmids pEC1117_1 des Konjugations-Spenderstammes Ec1117. Die Abbildung wurde mit CGview anhand der PGAP-Annotationsdaten erstellt. Wenn keine Genbezeichnung vorhanden war, wurde die Produktbezeichnung der kodierenden Sequenz gewählt. HP = hypothetisches Protein. *Pseudogen (PGAP).....	62
Abbildung 8: Plasmid-Karte des Antibiotikaresistenzplasmids pKPNEU28_2 des Konjugations-Spenderstammes Kpneu28. Die Abbildung wurde mit CGview anhand der PGAP-Annotationsdaten erstellt. Wenn keine Genbezeichnung vorhanden war, wurde die Produktbezeichnung der kodierenden Sequenz gewählt. HP = hypothetisches Protein. *Pseudogen (PGAP).....	63
Abbildung 9: Gelelektrophorese-Ergebnis einer Multiplex-PCR zur Identifizierung des Transkonjuganten A46II/32 des Spenderstammes Kpneu28. N = Negativkontrolle; P = Positivkontrolle; M = GeneRuler DNA Ladder Mix.....	65
Abbildung 10: Schematische Veranschaulichung von Rekombinationen bei den Plasmiden, die in den Transkonjuganten A02/3, A02/27, A02/50, A06/2, A07/1, A08/3 des Spenderstammes Kpneu28 detektiert wurden. Dabei handelte es sich um Kombinationen der Plasmide pKPNEU28_2 und pKPNEU28_3 des Spenderstammes. Schwarz markiert sind für die Rekombination relevanten IS26-Genkopien. (A) Originalplasmid pKPNEU28_2 des Spenderstammes Kpneu28. Die in (A) mit der Klammer markierte Sequenz wird in (B) vergrößert dargestellt. (B) Sequenzabschnitt des Plasmids pKPNEU28_2, an der Integration von pKPNEU28_3 stattfand. Pfeile: bei den angegebenen Plasmiden A02/3_2, A02/27_2, A06/2_2 und A08/3_7 lag an dieser Stelle von pKPNEU28_2 zusätzlich die jeweilige Sequenz aus (C) integriert vor. Klammern: bei den angegebenen Plasmiden A02/50_3 und A07/1_2 lag anstatt dieser Sequenz von pKPNEU28_2 die entsprechende Sequenz aus (C) vor. (C) Sequenzen der Transkonjuganten-Plasmide, die im Vergleich mit pKPNEU28_2 zusätzlich vorhanden waren. Diese bestehen aus Sequenzen oder Sequenzanteilen (A07/1_2) von pKPNEU28_3 und teilweise Sequenzwiederholungen am rechten Sequenzende (alle, außer A07/1_2). Zur Orientierung wurden in den Sequenzen (C) nur das Replikationsprotein und die duplizierten Sequenzabschnitte farblich markiert.....	68

- Abbildung 11: Schematische Darstellung der Konjugation zwischen dem Spender Ec1115 und dem Empfänger CV601 (links) sowie den daraus resultierenden Transkonjuganten mit den detektierten Plasmiden (rechts). Die Plasmide im Spenderstamm sind in unterschiedlichen Farben dargestellt: grün = pEC1115\_1; braun = pEC1115\_2; gelb = pEC1115\_3; blau = pEC1115\_4. Das Tetracyclin-Resistenzgen ist rot markiert. Bei den in den Transkonjuganten detektierten Plasmiden handelte es sich um Rekombinationen der Plasmide des Spenderstammes. \*nicht zirkulär/nicht vollständig. .... 71
- Abbildung 12: Mittelwerte der  $\log_{10}$ -transformierten Transferraten der Konjugationsversuche mit dem Spender Kpneu28 und dem Empfänger CV601 auf LB- und Salat-Agar bei 21 °C und 37 °C. Zusätzlich zum Mittelwert sind die Standardabweichungen angegeben. \*\*: hoch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,01$  (Tukey-HSD-Post-Hoc-Test). .... 74
- Abbildung 13: Mittelwerte der  $\log_{10}$ -transformierten Transferraten der Konjugationsversuche mit dem Spender Kpneu28 und dem Empfänger CV601 auf Mischsalat und Sprossen bei 37 °C. Zusätzlich zum Mittelwert sind die Standardabweichungen angegeben. \*: signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$  (Tukey-HSD-Post-Hoc-Test). .... 76
- Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der exogenen Plasmid-Isolierung. Konjugation wurde mit dem Empfängerstamm CV601 auf den Sprossen (Konjugationsversuche C) bzw. mit der Sprossenanreicherung (Konjugationsversuche D) durchgeführt. Die Transkonjuganten wurden charakterisiert und die Sprossmikrobiota mittels 16S rRNA-Gen Metagenom-Sequenzierung analysiert. .... 77
- Abbildung 15: Plasmid-Karte des Antibiotikaresistenzplasmids des Transkonjuganten X/SP7-Cal/2, welches von einem unbekanntem Spender des Sprossenmixes SP7 in den Empfängerstamm *E. coli* CV601 eingefangen wurde. Die Abbildung wurde mit CGview anhand der PGAP-Annotationsdaten erstellt. Wenn keine Genbezeichnung vorhanden war, wurde die Produktbezeichnung der kodierenden Sequenz gewählt. HP = hypothetisches Protein. \*Pseudogen (PGAP). .... 80
- Abbildung 16: Plasmid-Karte des Antibiotikaresistenzplasmids des Transkonjuganten X/SP10-Cal/9, welches von einem unbekanntem Spender des Sprossenmixes SP10 in den Empfängerstamm *E. coli* CV601 eingefangen wurde. Die Abbildung wurde mit CGview anhand der PGAP-Annotationsdaten erstellt. Wenn keine Genbezeichnung vorhanden war, wurde die Produktbezeichnung der kodierenden Sequenz gewählt. HP = hypothetisches Protein. \*Pseudogen (PGAP). .... 82
- Abbildung 17: Relative Abundanz der bakteriellen Vielfalt von nicht angereicherten Sprossenproben anhand der MinION-Sequenzierungsergebnisse der kompletten 16S rRNA-Gensequenz. Die Cluster wurden mittels Nanoclust erstellt und die relative Abundanz anhand der verwendeten Reads errechnet. I und II: technische Replikate der jeweiligen Probe. SP = Sprossen. .... 88
- Abbildung 18: Relative Abundanz der bakteriellen Vielfalt von angereicherten Sprossenproben anhand der MinION-Sequenzierungsergebnisse der kompletten 16S rRNA-Gensequenz. Die Cluster wurden mittels Nanoclust erstellt und die relative Abundanz anhand der verwendeten Reads errechnet. I und II: technische Replikate der jeweiligen Probe. SP = Sprossen. .... 89

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen sowie die Hersteller der Chemikalien.....	16
Tabelle 2: Verwendete flüssige und feste Nährmedien und deren Hersteller. ....	17
Tabelle 3: Zutaten für die Herstellung des Salatsafts für den Salat-Agar. ....	18
Tabelle 4: LB-Agar mit Antibiotika für die Selektion von Transkonjuganten, Spender- und Empfängerstämmen im Rahmen von Konjugationsversuchen. LB = Lysogeny broth; CTX = Cefotaxim; KA = Kanamycin; RD = Rifampicin; TE = Tetracyclin.....	19
Tabelle 5: Empfängerstamm für die Konjugation und Referenzstämmen, deren Herkunft und Merkmale. Kan <sup>R</sup> = Kanamycinresistenz; Rif <sup>R</sup> = Rifampicinresistenz; <i>gfp</i> = grün fluoreszierendes Protein; thr = Threonin; leu = Leucin; thi = Thiamin; <i>stx</i> = Shigatoxin; <i>eae</i> = Intimin. ....	19
Tabelle 6: Enterobakterien, die von pflanzlichen Lebensmitteln isoliert und im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert wurden. Ebenfalls aufgelistet sind die Produktherkunft, das Jahr der Isolierung und die zugehörige Veröffentlichung bzw. Masterarbeit. ....	21
Tabelle 7: Software und bioinformatische Programme für die Datenverarbeitung.....	21
Tabelle 8: Für den minimalen Hemmkonzentrationstest verwendete Antibiotika mit den zugehörigen Abkürzungen sowie die Resistenzgrenzwerte nach CLSI (2022) und nach *NARMS (2019).....	24
Tabelle 9: Für die Sequenzierung der Enterobakterien-Stämme mit dem MinION verwendete Flowcell und Kits. ....	25
Tabelle 10: Primersequenzen für die <i>real time</i> PCR zur Detektion der Shigatoxin-Gene <i>stx1</i> und <i>stx2</i> und des Intimin Virulenzgens <i>eae</i> (Sharma et al., 1999; Pavlovic et al., 2010). F = Forward; R = Reverse; SO = Sonde.....	29
Tabelle 11: PCR-Pipettierschema für die <i>real time</i> PCR zum Nachweis von Shigatoxin-Genen. ....	30
Tabelle 12: Amplifikationsbedingungen für den Nachweis von Shigatoxin-Genen. ....	30
Tabelle 13: PCR-Primersequenzen für die Identitätsüberprüfung möglicher Transkonjuganten. Primerpaare zur Detektion von chromosomaler DNA des Empfängerstammes CV601, der Spenderstämme Ec1115, Ec1117 und Kpneu28 sowie der Plasmidsequenzen pEC1115_1, pEC1117_1 und pKPNEU28_2. F = Forward; R = Reverse. ....	31
Tabelle 14: PCR-Pipettierschema für die Multiplex-PCR zur Identitätsprüfung von Transkonjuganten. F = Forward; R = Reverse. ....	32
Tabelle 15: PCR-Pipettierschema zur Identitätsprüfung der durch exogene Plasmid-Isolierung erhaltenen Transkonjuganten. F = Forward; R = Reverse.....	32
Tabelle 16: PCR-Bedingungen für den Nachweis und die Identitätsprüfung möglicher Transkonjuganten. ....	33
Tabelle 17: Inkubationszeiten und -temperaturen für die Konjugationsvorversuche (Filtermating). Die für die Sequenzierung ausgewählten Transkonjuganten sind ebenfalls aufgelistet. Die Spender sind in der Konjugationsbezeichnung wie folgt verschlüsselt: A = Kpneu28; C = Ec1115, D = Ec1117.....	34
Tabelle 18: Transkonjuganten des Spenderstammes Ec1115, die für die <i>tet(A)</i> -PCR ausgewählt wurden. ....	35

Tabelle 19: PCR-Ansatz für die Amplifikation des Tetracyclin-Resistenzgens *tet(A)*. Als PCR-Template wurde jeweils eine Kolonie eines Transkonjuganten verwendet. F = Forward; R = Reverse..... 35

Tabelle 20: PCR-Bedingungen für die Amplifikation des *tet(A)*-Resistenzgens..... 35

Tabelle 21: Konjugationsversuche mit Spender Kpneu28 (A) und Empfänger CV601 sowie die jeweiligen Versuchsbedingungen. I und II sind getrennte Konjugationen am selben Tag mit identischen Bedingungen. LB = Lysogeny broth. .... 37

Tabelle 22. Mischsalat (MS) und Sprossen (SP), die für die Konjugationsversuche B verwendet wurden. Für die Versuche wurden je zwei Sprossen (SP2, SP6) und Mischsalate (MS4, MS12) verwendet, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten erworben wurden. .... 39

Tabelle 23: Konjugationsversuche B mit Spender Kpneu28 und Empfänger CV601 sowie die jeweiligen Versuchsbedingungen. I und II sind separate Konjugationsversuche am selben Tag mit identischen Bedingungen. .... 40

Tabelle 24: Für die exogene Plasmid-Isolierung verwendeter Sprossenmix..... 41

Tabelle 25: Versuchsbedingungen für die Konjugationsversuche C mit dem Empfänger *E. coli* CV601 (exogene Plasmid-Isolierung auf dem Lebensmittel). I und II sind separate Konjugationsversuche am selben Tag mit identischen Bedingungen..... 42

Tabelle 26: Versuchsbedingungen für die Konjugationsversuche D: Filtermating auf LB-Agar mit dem Empfängerstamm *E. coli* CV601 und Sprossenanreicherung (exogene Plasmid-Isolierung). I und II sind getrennte Konjugationsversuche am selben Tag mit identischen Bedingungen. .... 43

Tabelle 27: Transkonjuganten der Konjugationsversuche C, die für die Ganzgenomsequenzierung und weitere Untersuchungen ausgewählt wurden. .... 44

Tabelle 28: Für den Agardiffusionstest verwendete Antibiotika und Resistenzgrenzwerte nach CLSI (2022)..... 44

Tabelle 29: Für die Sequenzierung der Transkonjuganten mit dem MinION verwendeten Flowcells und Kits..... 46

Tabelle 30: Bestandteile für die 16S rRNA-Gen-PCR zur Amplifikation und Barcodierung für die Metagenom-Sequenzierung mit dem MinION. +X: Platzhalter für individuelle Barcodes und Abstandssequenzen. .... 47

Tabelle 31: Bedingungen für die Amplifikation der 16S rRNA-Gensequenz. .... 48

Tabelle 32: Barcode-Zuordnung der 16S rRNA-Genfragmente nach der PCR-Amplifikation für die 16S rRNA-Gen Metagenom-Sequenzierung der Sprossenmikrobiota mittels MinION. Die Sequenzierung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, weshalb jeder Probe zwei Barcode-Nummern zugewiesen sind. SP = Sprossen..... 48

Tabelle 33: Ergebnisse der Identifizierung der 22 Enterobakterien durch digitale DNA-DNA-Hybridisierung (dDDH) mit *Enterobacteriaceae*-Typ-Stämmen (<sup>T</sup>). Die Chromosomgrößen, die mol% GC-Gehalte und auf dem Chromosom liegende Resistenzgene des jeweiligen Stammes sind aufgelistet. Alle Chromosomen waren zirkulär. .... 50

Tabelle 34: Genotypische Charakterisierung von *Enterobacteriaceae*-Plasmiden. Die Ergebnisse von PlasmidFinder, ResFinder, MOB-suite werden gezeigt. Die Replikon-Typen und Resistenzgene sind nach der Reihenfolge im Contig angeordnet. Alle Plasmide waren zirkulär..... 55

Tabelle 35: Mittels MobileElementFinder identifizierte Composite und Unit Transposons der Plasmide, die potenziell Antibiotikaresistenzgene innerhalb der Bakterienzelle mobilisieren können. IS = Insertionssequenz; Tn = Transposon..... 58

Tabelle 36: Ergebnisse des minimalen Hemmkonzentrationstests für die 22 Enterobakterien. Die Richtgrenzwerte stammten von CLSI (2022) und für Streptomycin von NARMS (2019): Tetracyclin (TE;  $s \leq 4 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ), Streptomycin (S;  $s \leq 16 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 32 \mu\text{g/ml}$ ), Chloramphenicol (CHL;  $s \leq 8 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 32 \mu\text{g/ml}$ ), Ampicillin (AMP;  $s \leq 8 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 32 \mu\text{g/ml}$ ), Ciprofloxacin (CIP;  $s \leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 1 \mu\text{g/ml}$ ), Gentamicin (CN;  $s \leq 4 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ), Cefotaxim (CTX;  $s \leq 1 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 4 \mu\text{g/ml}$ ). Rot = resistent; gelb = intermediär; grün = sensitiv. .... 60

Tabelle 37: Ergebnisse des minimalen Hemmkonzentrationstests für die möglichen Spenderstämme für Konjugationsversuche. Richtgrenzwert für Kanamycin-Resistenz:  $s \leq 16 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 64 \mu\text{g/ml}$  (CLSI, 2022). Eine Hemmung durch Rifampicin sollte bei  $< 50 \mu\text{g/ml}$  erfolgen. .... 61

Tabelle 38: Übersicht über die Plasmide der Spenderstämme Ec1115, Ec1117 und Kpneu28, die für Konjugationsversuche verwendet wurden. Die konjugativen Antibiotikaresistenzplasmide sind grau hinterlegt. .... 64

Tabelle 39: Ergebnisse der bioinformatischen Auswertung der Plasmid-Sequenzen der Transkonjuganten (TK) des Spenderstammes Kpneu28. .... 67

Tabelle 40: Ergebnisse der bioinformatischen Auswertung der Plasmid-Sequenzen der Transkonjuganten (TK) des Spenderstammes Ec1115. Grau markiert sind die Stämme, bei denen mittels Multiplex-PCR die PCR-Zielsequenz (IncFIB-Replikationsregion) nicht nachweisbar war. .... 69

Tabelle 41: Transferraten der Konjugationsversuche mit dem Spender Kpneu28 und dem Empfänger CV601 auf Salat- und LB-Agar. Transferraten =  $\text{TK [KbE/ml]}/\text{CV601 [KbE/ml]}$ . TK = Transkonjuganten. .... 73

Tabelle 42: Transferraten der Konjugationsversuche B mit dem Spender Kpneu28 und dem Empfänger CV601 auf Sprossen (SP) und Mischsalat (MS). Transferraten =  $\text{TK [KbE/ml]}/\text{CV601 [KbE/ml]}$ . TK = Transkonjuganten. \*\* Kolonien sichtbar, aber  $< 10$  Kolonien/Platte. .... 75

Tabelle 43: Ergebnisse des Agardiffusionstests der Transkonjuganten der exogenen Plasmid-Isolierungsversuche. Alle Stämme waren sensitiv gegenüber Meropenem, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Cefpodoxim und Streptomycin. Die Referenzwerte stammen von CLSI (2022): Tetracyclin (TE;  $r \leq 11 \text{ mm}$ ;  $s \geq 15 \text{ mm}$ ), Trimethoprim / Sulfamethoxazol (SXT;  $r \leq 10 \text{ mm}$ ;  $s \geq 16 \text{ mm}$ ). Rot = resistent; gelb = intermediär; grün = sensitiv. .... 79

Tabelle 44: Genotypische Charakterisierung der Transkonjuganten-Plasmide der exogenen Plasmid-Isolierung. Die Replikon-Typen und Resistenzgene sind nach der Reihenfolge im Contig angeordnet. MOB-suite prognostizierte für alle konjugativen Plasmide und Col(pHAG28) den Wirtsbereich *Enterobacteriales* und für die restlichen Col-Plasmide den Wirtsbereich *Actinobacteria*, *Proteobacteria*. .... 84

Tabelle 45: Modelle und Hersteller der verwendeten Geräte. .... 141

Tabelle 46: Verbrauchsmaterialien. .... 142

Tabelle 47: Verwendete Kits. .... 144

Tabelle 48: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller. .... 144

Tabelle 49: Accession Number der Sequenzen von Enterobakterien-Stämmen und ihren Plasmiden in der NCBI-Datenbank. .... 145

# 1 Einleitung

## 1.1 Antibiotika und die globale Resistenzproblematik

Antibiotika sind natürliche oder synthetische Substanzen, die Bakterien abtöten (bakterizid) oder diese in ihrem Wachstum hemmen (bakteriostatisch) (Pankey und Sabath, 2004; Davies und Davies, 2010). Natürlich vorkommende Antibiotika werden von Bakterien (z. B. *Streptomyces*) bzw. Pilzen (z. B. *Penicillium*) produziert und an die Umgebung abgegeben (Clardy et al., 2009; Chait et al., 2011; Procopio et al., 2012; Spagnolo et al., 2021). Als erstes natürliches Antibiotikum wurde in den 1920er Jahren Penicillin entdeckt und dessen Wirkung gegen Bakterien beschrieben (Fleming, 1929). Seit den 1940er Jahren wird Penicillin in der Humanmedizin eingesetzt, um bakterielle Infektionskrankheiten zu behandeln (Hutchings et al., 2019). Zuvor wurde bereits synthetisch hergestelltes Sulfanilamid aus der Stoffgruppe der Sulfonamide als antibakterielle Substanz bei Menschen angewendet (Levy, 1982). Die goldene Ära des Antibiotikums, in der die meisten der heute verwendeten Antibiotikaklassen entdeckt wurden, endete vor über 50 Jahren (Aminov, 2010; Hutchings et al., 2019). Heute stehen wir vor dem Problem, dass die Entwicklung neuer Antibiotika recht lange dauert, wohingegen Antibiotikaresistenzen sich relativ schnell entwickeln (Cook und Wright, 2022).

Antibiotika wirken durch Interaktion mit Bestandteilen und Prozessen, die für Bakterien essenziell sind. Die Hauptwirkmechanismen therapeutisch eingesetzter Antibiotika sind: Störung der Zellwandsynthese (z. B.  $\beta$ -Laktam-, Glycopeptid-Antibiotika), Störung der Proteinsynthese (z. B. Tetracycline, Aminoglycoside, Amphenicole), Störung der DNA-/RNA-Synthese (z. B. Fluorchinolone, Ansamycine), Störung des Folsäurestoffwechsels (z. B. Sulfonamide, Diaminopyrimidine) und Wirkung an der Zellmembran (z. B. Lipopeptide) (Wright, 2010; Hutchings et al., 2019).

Die Entdeckung von Antibiotika und deren Einsatz beim Menschen gilt als Meilenstein der modernen Medizin (Bennett, 2008). Durch den therapeutischen Einsatz von Antibiotika konnte die Mortalität durch Infektionserkrankungen bei Menschen gesenkt und die Lebenserwartung gesteigert werden (Armstrong et al., 1999; Jayachandran et al., 2010; Hutchings et al., 2019). Allerdings zeigte sich die Anpassungsfähigkeit der Bakterien schnell: Nach Einführung eines Antibiotikums wurden Bakterien entdeckt, die gegen dieses Antibiotikum resistent waren (Ventola, 2015; Hutchings et al., 2019). Heute gibt es gegen jedes therapeutisch eingesetzte Antibiotikum resistente Bakterien (Spagnolo et al., 2021). Bereits in den 1950er Jahren wurde der erste multiresistente Stamm entdeckt (Akiba et al., 1960; Levy, 1982). Ein Bakterium wird antibiotikaresistent, wenn das Antibiotikum, welches zuvor eine antimikrobielle Wirkung gegen das Bakterium zeigte, diese Wirkung verliert (CDC, 2022). Dabei ist die Resistenzbildung ein natürlicher evolutionärer Vorgang, bei dem besser an die Umwelt angepasste Bakterien selektiert werden (D'Costa et al., 2011; Cook und Wright, 2022). So wurden diverse Antibiotikaresistenzgene in historischen Bakterienisolaten gefunden, die aus der Zeit vor dem klinischen Einsatz stammten (D'Costa et al., 2011; Perron et al., 2015; Wand et al., 2015). Fevre et al. (2005) schätzten beispielsweise, dass *Klebsiella (K.) oxytoca* und das Resistenzgen *bla<sub>OXY</sub>* seit mindestens 84 Millionen Jahren gemeinsam evolvieren. Allerdings konnte der evolutionäre Prozess der Antibiotikaresistenzbildung nur durch anthropogenes Eingreifen in dieser Schnelligkeit zu einer Resistenzproblematik führen, wie sie heute vorherrscht (Davies und Davies, 2010).



Die Prävalenz von antibiotikaresistenten Bakterien ist stetig gestiegen (Levy, 1998; Knapp et al., 2010; Cassini et al., 2019; Cook und Wright, 2022), wobei die Gründe für den Anstieg komplex sind. Unter anderem tragen übermäßiger und teilweise falscher Einsatz von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin, sowie deren rezeptfreier Verkauf und deren Zugabe ins Futter von Masttieren (in der Europäischen Union mittlerweile verboten: Verordnung (EG) Nr. 1831/2003) zur heutigen Antibiotikaresistenzproblematik bei (Holmes et al., 2016; Ronquillo und Hernandez, 2017; Auta et al., 2019; Muurinen et al., 2021; Khojah, 2022). Die globale Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien wird zusätzlich durch internationalen Handel und weltweite Reisen verstärkt (Peirano et al., 2011; Ruppé et al., 2014; Hawkey, 2015; Zurfluh et al., 2015; Liu und Kilonzo-Nthenge, 2017).

Die unvollständige Verstoffwechslung des Antibiotikums bei Behandlung und der hohe Eintrag in die Umwelt bei gleichzeitig unterschiedlicher Abbaubarkeit der Antibiotika in der Umwelt führen zu höheren Antibiotika-Konzentrationen in der Umgebung (Sarmah et al., 2006; Le-Minh et al., 2010; Jechalke et al., 2014; Polianciuc et al., 2020). Durch den so entstandenen Selektionsdruck haben antibiotikaresistente Bakterien einen Vorteil in Nischen mit hohem Antibiotikaeinsatz (z. B. bei Menschen und Nutztieren) und können – im Gegensatz zu sensitiven Bakterien – überleben (O'Brien, 2002; Wiedenbeck und Cohan, 2011).

Die Antibiotikaresistenz, auch „stille Pandemie“ genannt, ist eine der zentralen Gesundheitsbedrohungen für die Menschheit, für deren Bekämpfung eine globale Strategie notwendig ist (Laxminarayan et al., 2013; WHO, 2014; Antimicrobial Resistance, 2022; BMG, 2022). Eine Infektion mit antibiotikaresistenten Bakterien kann vielfältige Auswirkungen individueller sowie gesellschaftlicher Art haben: verlängerte Krankheitsdauer, Therapieversagen, limitierte Behandlungsoptionen, höhere Mortalität und Produktivitätsverluste im Vergleich zu einer Infektion mit sensitiven Erregern (Friedman et al., 2016; Antimicrobial Resistance, 2022; Larsson et al., 2022). Ohne Gegenmaßnahmen würden Infektionen mit antibiotikaresistenten Pathogenen weiter steigen und so in Zukunft enormen menschlichen und wirtschaftlichen Schaden anrichten (O'Neill, 2016). Derzeit gelten folgende antibiotikaresistente Bakterien für den Menschen als besonders kritisch: Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, dritt-Generations-Cephalosporin-resistente *Escherichia (E.) coli* und *Klebsiella (K.) pneumoniae*, Carbapenem-resistente *Acinetobacter baumannii* und *K. pneumoniae* und fluorochinolonresistente *E. coli* (Antimicrobial Resistance, 2022).

Antibiotikaresistente Bakterien sind ubiquitär vorhanden. Die Lebensbereiche von Mensch und Tier sind so mit der Umwelt verwoben, dass es keine Grenzen für den Austausch von Mikroorganismen und Genen gibt (Aminov, 2011). Der „One-Health“-Ansatz sieht deshalb für die Lösung der Antibiotikaresistenzproblematik vor, dass die Umwelt sowie die Gesundheit von Menschen und Tieren gemeinsam betrachtet werden sollte (WHO, 2015; McEwen und Collignon, 2018; Hernando-Amado et al., 2019). Denn auch die Umwelt bietet ein Reservoir von diversen Antibiotikaresistenzgenen (Aminov, 2011). Dabei werden Resistenzgene gegen Antibiotika nicht nur bei krank machenden (pathogenen) Bakterien gefunden, sondern auch bei opportunistisch pathogenen und kommensalen Bakterien (Lamberte und van Schaik, 2022).

Ein Bakterium kann durch unterschiedliche Strategien einen resistenten Phänotyp erlangen, durch beispielsweise Inaktivierung des Antibiotikums ( $\beta$ -Laktam-Antibiotika, Aminoglycoside), Ausschleusen des Antibiotikums mittels Effluxpumpen (z. B. Tetracycline, Aminoglycoside) oder Änderung bzw. Umgehung der Antibiotika-Zielstruktur (Diaminopyrimidine, Fluorchinolone) (Wright, 2010; Munita und Arias, 2016). Neben der natürlichen (intrinsischen) Resistenz, bei der eine komplette Bakterienart bzw. -gattung außerhalb des antibiotischen Wirkungsspektrums liegt, können Bakterien Resistenzen auch neu erwerben (Woodford und Ellington, 2007; Martinez et al., 2009; Cook und Wright, 2022). Ein Bakterium kann eine Resistenz durch Mutation im Chromosom oder durch Aufnahme fremder DNA mittels horizontalem Gentransfer (HGT) erwerben (Cook und Wright, 2022). Eine Mutation im Chromosom kann beispielsweise durch Antibiotika-Ausschleusung via Efflux-Pumpen, Änderung der Antibiotika-Zielstruktur oder Änderung der Membranpermeabilität zu einem antibiotikaresistenten Phänotyp führen (Salmond und Welch, 2008; Cook und Wright, 2022). Den größeren Anteil an der heutigen Resistenzproblematik hat allerdings die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen via horizontalem Gentransfer (Sheppard et al., 2016; von Wintersdorff et al., 2016).

### 1.1.1 Horizontaler Gentransfer bei Bakterien – interzelluläre Mobilität

Anders als bei der Zellteilung, bei der das Erbgut entlang der Abstammungslinie an die Tochterzellen weitergegeben wird, fasst der horizontale Gentransfer die Mechanismen zusammen, mit der Fremd-DNA in die Zelle aufgenommen wird (Kelly et al., 2009) (Abbildung 1). Bakterien zeigen in ihrem Chromosom unterschiedlich viel Anteil an durch HGT erworbenen Genen (Ochman et al., 2000; Pallen und Wren, 2007). Der DNA-Austausch kann zwischen weit entfernt verwandten Bakterien stattfinden – über Familien- und sogar Phyla-Grenzen hinweg (Sheinman et al., 2021). Die aufgenommene Fremd-DNA kann nur dann stabil vererbt und exprimiert werden, wenn sie in das Chromosom bzw. in ein Plasmid integriert wird, oder selbstständig in der Zelle repliziert (Thomas und Nielsen, 2005). Durch Expression der neu erworbenen Gene erhält die Bakterienzelle neue Funktionen (Rossi et al., 2014).

Die Aufnahme von nicht eigener DNA stellt einen zusätzlichen evolutionären Vorgang dar, der für die Empfängerzelle einen Vorteil bedeutet und bei der Anpassung an Umweltveränderungen und Nischen nützlich sein kann (Ochman et al., 2000; Norman et al., 2009). Durch die mittels HGT neu erworbenen Gene kann eine Bakterienzelle viele unterschiedliche Eigenschaften erwerben. Neben dem Transfer von Genen für den bakteriellen Stoffwechsel (Hehemann et al., 2010) werden auch Desinfektions-, Metall- und Antibiotikaresistenzgene übertragen (Fang et al., 2016; Sheinman et al., 2021; Guzman-Otazo et al., 2022). Auch Gene, die Virulenzfaktoren und Humantoxine kodieren, können mittels HGT übertragen werden. So können aus einem kommensalen Bakterium durch Erwerb Shigatoxin-kodierender Bakteriophagen oder Anthraxtoxin-kodierender Plasmide für den Menschen pathogene Bakterien entstehen (Scotland et al., 1983; Little und Ivins, 1999; Frost et al., 2005).

Eine gute Umgebung für HGT bieten beispielsweise Biofilme (Sorensen et al., 2005; Aminov, 2011; Madsen et al., 2012), der Darm von Tieren und Menschen (Netherwood et al., 1999; Huddleston, 2014; Lerner et al., 2017; Singh et al., 2019) sowie die Rhizosphäre von Pflanzen (Heuer und Smalla, 2012) und Kläranlagen (von Wintersdorff et al., 2016; Che et al., 2019). Von den drei Hauptmechanismen des HGT wird der Konjugation der größte Anteil an der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen zugeschrieben (Davies und Davies, 2010; von Wintersdorff et al., 2016).

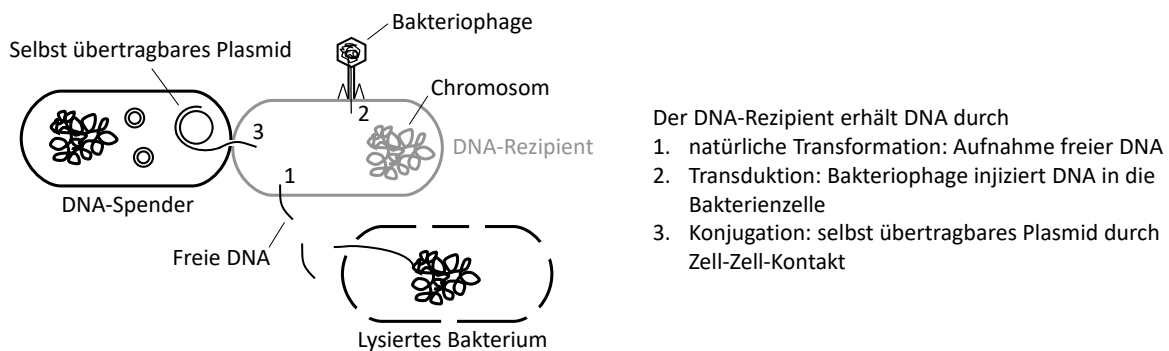


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mechanismen des horizontalen Gentransfers bei Bakterien.

Natürliche Transformation bei Bakterien wurde erstmals 1928 beschrieben (Griffith, 1928) und bezeichnet die aktive Aufnahme von freier DNA aus der Umgebung in die Bakterienzelle (Thomas und Nielsen, 2005). Die aufgenommenen Gene werden exprimiert, nachdem die freie DNA entweder in das Chromosom durch Rekombination integriert wurde oder als extrachromosomales Replikon vorliegt (Thomas und Nielsen, 2005; Heuer und Smalla, 2007). Für die natürliche Transformation muss eine Bakterienzelle kompetent sein (Kelly et al., 2009). Natürlich kompetente Bakterien gibt es bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien – Beispiele: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baylyi*, *Streptococcus pneumoniae* und *Pseudomonas fluorescens* (Lorenz und Wackernagel, 1994; Johnsborg et al., 2007; Morikawa et al., 2012; Johnston et al., 2014; Cooper et al., 2017).

Der Begriff Transduktion wurde mit der Entdeckung geprägt, dass DNA mittels Bakteriophagen (kurz: Phagen) zwischen Bakterienzellen transportiert werden kann (Zinder und Lederberg, 1952). DNA-Spender und -Empfänger müssen sich für die Transduktion nicht im selben Habitat befinden, wobei die Verbreitung durch die Wirtsspezifität des Bakteriophagen beschränkt ist (Sorensen et al., 2005; Popa et al., 2017). Durch die Verpackung von bakterieller DNA zusätzlich zur Phagen-DNA in den Phagenkopf wird bei der Infektion einer Bakterienzelle die bakterielle DNA mit übertragen (Heuer und Smalla, 2007). Dabei können bis zu 100 kbp große (Kilobasenpaar) DNA-Fragmente übertragen werden (Ochman et al., 2000; Heuer und Smalla, 2007). Der Bakteriophage kann auch Antibiotikaresistenzgene besitzen und diese in eine Bakterienzelle übertragen (Colomer-Lluch et al., 2011; Larranaga et al., 2018).

Konjugation bezeichnet die Übertragung von DNA von einem Spenderstamm in einen Empfängerstamm durch Zellkontakt (Novick et al., 1976) und wurde 1946 erstmals beschrieben (Lederberg und Tatum, 1946). Die übertragene DNA liegt extrachromosomal als Plasmid vor und besitzt alle für den eigenen Transfer notwendigen Gene (Lawley et al., 2004). Die Spenderzelle nimmt durch einen Plasmid-kodierten Pilus Kontakt mit einer Bakterienzelle in der unmittelbaren Nähe auf (Virolle et al., 2020). Anschließend wird der Abstand zwischen den Bakterien verringert, und der Plasmid-Transfer erfolgt durch eine Pore (Lawley et al., 2004). Im Gegensatz zu den Fremd-DNA-Spenderzellen der Transformation und Transduktion verendet die Spenderzelle bei der Konjugation nicht und behält eine Kopie des Plasmids. Die Konjugation ist der Hauptmechanismus für die Adaption und die Diversität von Bakterien und macht den größten Anteil an der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen aus (Davies und Davies, 2010; Smalla et al., 2015; von Wintersdorff et al., 2016). Dabei existierten bereits vor dem klinischen Einsatz von Antibiotika konjugative Plasmide, die keine Antibiotikaresistenzgene trugen (Hughes und Datta, 1983).

### 1.1.2 DNA-Austausch zwischen Sequenzen innerhalb einer Zelle – intrazelluläre Mobilität

Neben dem HGT, gibt es auch Genaustausch innerhalb einer Bakterienzelle – die intrazelluläre Mobilität: z. B. zwischen Plasmiden sowie zwischen dem Chromosom und Plasmiden (Frost et al., 2005; Partridge et al., 2018). In der Evolution von Bakterien spielt diese DNA-Rekombination eine große Rolle, denn durch Duplikation, Transposition, Deletion und Co-Integration von DNA-Sequenzen entsteht eine große genetische Vielfalt (Kawasaki et al., 1985; Siguier et al., 2014; Partridge, 2015). Auch Antibiotikaresistenzgene können dadurch innerhalb einer Zelle zwischen DNA-Sequenzen mobilisiert werden (Sheppard et al., 2016; Partridge et al., 2018). Übertragbare Plasmide ohne Antibiotikaresistenzgene waren bereits vor dem klinischen Einsatz von Antibiotika in Bakterien vorhanden, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören (Hughes und Datta, 1983). Durch intrazelluläre Mobilität wurden Antibiotikaresistenzgene, die ihren Ursprung auf dem Chromosom hatten, von dort auf übertragbare Plasmide transferiert, woraufhin deren rasche Verbreitung stattfinden konnte (Datta und Hughes, 1983; Hall und Collis, 1998; Barlow und Hall, 2002). Der Übergang eines Antibiotikaresistenzgens von einem Chromosom bzw. von einem nicht-mobilen Plasmid auf ein konjugatives Plasmid kann somit dessen Mobilität innerhalb der Bakteriengemeinschaft erhöhen (Frost et al., 2005). Dabei fördert Antibiotika-Selektionsdruck die Transposition von Antibiotikaresistenzgenen vom Chromosom zu Plasmiden und führt dadurch zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen (Yao et al., 2022). Somit trägt das Zusammenspiel zwischen intrazellulärer Mobilität und HGT zur Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen bei (Sheppard et al., 2016; Johansson et al., 2021). Für Plasmide scheint im Hinblick auf den Erwerb neuer Funktionen der DNA-Austausch zwischen Plasmiden eine größere Rolle zu spielen, als deren Austausch mit Chromosomen bzw. Phagen (Bosi et al., 2011). Für die intrazelluläre Mobilität und somit für die Umstrukturierung von Plasmiden und Chromosomen sind mobile genetische Elemente, wie Transposons, Insertionssequenzen und Integrons verantwortlich (Partridge et al., 2018; Helinski, 2022):

Insertionssequenz (IS): Die Insertionssequenz ist eine kompakte transponierbare Einheit, die meist aus einer Transposase und angrenzenden Inverted Repeats (IR) besteht (Partridge, 2011; Johansson et al., 2021). Die Transposase ist dabei für die eigene Relokation verantwortlich, wobei die meisten IS keine zusätzlichen Gene besitzen (Partridge, 2011; Partridge et al., 2018). Je nach Transposase erfolgt die Transposition durch einen Schneide- und Einfüge- bzw. Kopieren- und Einfüge-Mechanismus, wobei die IR als Erkennungssequenz dienen (Partridge, 2011). Für deren Integration haben die meisten IS keine oder nur eine geringe Sequenzspezifität (Siguier et al., 2014). Innerhalb einer DNA-Sequenz (z. B. Plasmid) kann ein Composite Transposon (zusammengesetztes Transposon) von zwei nahe verwandten IS-Genkopien gebildet werden, wodurch zusätzlich die dazwischen liegenden Gene mobilisiert werden können (Partridge, 2015; Partridge et al., 2018). Die IS26, die auf Plasmiden und Chromosomen von Gram-negativen Bakterien vorhanden sein kann, spielt im Zusammenhang mit der Verbreitung von Multiresistenz eine besonders wichtige Rolle (Partridge, 2011; He et al., 2015; Partridge et al., 2018). Dabei kann eine IS26-Kopie für die Mobilisierung von Genabschnitten ausreichen, indem eine Translocatable Unit (verlagerbare Einheit, TU) gebildet wird, die dann neben einer anderen IS26-Kopie eingebaut wird (Harmer et al., 2014; Partridge, 2015). Insertionssequenzen sind dabei auf Plasmiden signifikant häufiger vertreten als auf den Chromosomen (Siguier et al., 2014). Zudem sind diese auf Antibiotikaresistenzplasmiden häufiger vorhanden als auf Plasmiden ohne Resistenzgene (Che et al., 2021). Dabei sind besonders IS26, aber auch *ISEcp1* und *IS6100*, beim Transfer vieler unterschiedlicher Antibiotikaresistenzgene beteiligt (Che et al., 2021).

Unit Transposons (Tn3-Familie): Ein Transposon (Tn) ist ein mobiles genetisches Element, welches seine Position in einer Bakterienzelle innerhalb einer DNA-Sequenz oder zwischen DNA-Sequenzen verändern kann (Bennett, 2008). Dabei können Bakteriophagen und Plasmide als Vektoren für Transposons dienen (Levy, 1982). Die durch IR begrenzten Transposons besitzen neben der Transposase auch eine Resolvase und eine Resolutionsstelle (Partridge, 2011; Partridge et al., 2018). Während der Transposition erfolgt eine Duplizierung des Transposons (replikative Transposition) (Nicolas et al., 2015). Verschiedene Antibiotikaresistenzgene (z. B. gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und Tetracycline) und Metallresistenzgene (z. B. gegen Quecksilber) können Teil von Transposons sein und somit intrazellulär mobilisiert werden (Partridge, 2011; Nicolas et al., 2015).

Integrans: Ein Integron ist eine genetische Plattformen, die aus drei essenziellen Teilen und Genkassetten besteht (Boucher et al., 2007; Gillings, 2014; Escudero et al., 2015): Während die durch das *intI-Gen* kodierte Integron-Integrase die Entfernung bzw. Integration der Genkassetten an der Rekombinationsstelle *attI* vermittelt, ist der *P<sub>C</sub>-Promotor* für die Expression der Genkassetten notwendig (Cambray et al., 2010; Partridge, 2011; Escudero et al., 2015). An der *attI*-Region können zirkuläre Genkassetten eingebaut werden (Escudero et al., 2015). Dadurch kann es zur Akkumulation multipler Antibiotikaresistenzgene kommen (Partridge, 2015). Integrans befinden sich bei vielen Gram-negativen Umweltisolaten auf dem Chromosom und können viele unterschiedliche Genkassetten aufweisen (Cambray et al., 2010; Escudero et al., 2015). Durch die Integration von Integrans in ein Transposon ist es möglich, die komplette Plattform intrazellulär zu mobilisieren (Boucher et al., 2007; Cambray et al., 2010). Anhand der Integrase werden Integron-Plattformen in Klassen eingeteilt (Deng et al., 2015). Dabei sind Klasse-1-Integrans bei Gram-negativen Bakterien am

weitesten verbreitet und meist auf konjugativen Plasmiden lokalisiert, wodurch sie zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen beitragen können (Cambray et al., 2010; Gillings, 2014; Kaushik et al., 2018; Che et al., 2021). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die überwiegenden Resistenzgene von Plasmiden – bis auf Sulfonamid-, Rifamycin- und Trimethoprim-Resistenzgene – nicht mit Integrons assoziiert sind (Che et al., 2021). Die Expression der Integrase ist an die SOS-Antwort der Zelle gekoppelt. Dadurch erfolgen Integrase-vermittelte Rekombinationen in Stresssituationen, wo Anpassung besonders wichtig ist (Escudero et al., 2015).

Plasmide können diese mobilen Elemente besitzen und durch Genaustausch mit dem Chromosom oder anderen Plasmiden in der Zelle ihre Genzusammensetzung verändern (Stokes und Gillings, 2011; Pinilla-Redondo et al., 2018). Dabei können bei der Rekombination Teile einer Sequenz oder ein komplettes Plasmid in ein anderes Plasmid integriert werden (He et al., 2015; Liu et al., 2021; Luo et al., 2022; Shan et al., 2022). So zeigen viele IncF-Plasmide von *Escherichia* und *Klebsiella* eine mosaik Struktur, die auf Rekombinationen in der Vergangenheit hinweist (Pesesky et al., 2019). Die Umstrukturierung und Fusion von Plasmiden kann durch replikative Transposition oder homologe Rekombination passieren (He et al., 2015; Sheppard et al., 2016; Liu et al., 2021; Luo et al., 2022; Shan et al., 2022). Homologe Rekombination kann zwischen zwei Plasmiden oder zwischen Plasmid und Chromosom durch eine Kreuzung zwischen Sequenzen mit großer Homologie stattfinden (Thomas und Nielsen, 2005). Besonders die durch die Insertionssequenz IS26 vermittelte Rekombination scheint bei Plasmiden von Enterobakterien eine wichtige Rolle zu spielen (He et al., 2015; Du et al., 2020; Liu et al., 2021; Luo et al., 2022).

## 1.2 *Enterobacteriaceae* und deren Plasmide

Durch eine taxonomische Reklassifizierung wurde die Ordnung *Enterobacteriales* in mehrere Familien eingeteilt, wobei *Enterobacteriaceae* die größte darstellt (Adeolu et al., 2016). Bei Vertretern der *Enterobacteriaceae* (folgend auch als Enterobakterien bezeichnet) handelt es sich um fakultativ anaerobe, Gram-negative Stäbchen aus dem Phylum *Proteobacteria* (Adeolu et al., 2016; Jenkins et al., 2017). Der Name leitet sich vom altgriechischen Wort für Darm (*enteron*) ab (Farmer et al., 1980), wobei die Vertreter der Familie ubiquitär vorkommen. Sie können im Boden, im Wasser, in Lebensmitteln, aber auch bei Mensch und Tier als Teil der normalen intestinalen Darmmikrobiota vorhanden sein (Guentzel, 1996). Enterobakterien können als harmlose kommensale oder als (opportunistische) pathogene Bakterien Erkrankungen wie Darm-, Harnwegs- und Lungenentzündungen sowie Wundinfektionen oder Sepsis auslösen (Guentzel, 1996; Jenkins et al., 2017). Dabei führen Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* nicht nur beim Menschen zu Infektionen, sondern auch bei Tieren (Brenner und Farmer, 2015). Personen mit Diabetes oder supprimiertem Immunsystem sowie ältere und unterernährte Personen sind durch eine geschwächte Immunabwehr anfällig für Infektionen mit opportunistischen Erregern (Brenner und Farmer, 2015). Medizinisch relevante Gattungen umfassen unter anderem *Citrobacter* (*C.*), *Enterobacter* (*En.*), *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* und *Shigella* (Adeolu et al., 2016; Exner et al., 2017). Im Hinblick auf Antibiotikaresistenz sind bei den Enterobakterien besonders die dritt-Generations-Cephalosporin-resistenten *E. coli* und *K. pneumoniae*, die Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae* und die

Fluorchinolon-resistenten *E. coli* kritisch (Antimicrobial Resistance, 2022). Neben den intrinsischen Resistenzen mancher *Enterobacteriaceae*-Spezies (CLSI, 2022), spielen bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen innerhalb der Familie besonders deren konjugative Plasmide eine große Rolle (Canton und Coque, 2006; Carattoli, 2009, 2011).

### 1.2.1 Plasmid-Eigenschaften

Neben chromosomaler DNA können in einer Bakterienzelle weitere DNA-Fragmente außerhalb des Chromosoms (extrachromosomal) vorliegen. Diese extrachromosomale DNA wurde in den 1950er Jahren erstmals als Plasmid bezeichnet (Lederberg, 1952). Dabei sind Plasmide eine diverse Gruppe an DNA-Fragmenten, die doppelsträngig und meist ringförmig vorliegen (Thomas und Summers, 2008). Lineare Plasmide sind bei Vertretern der *Enterobacteriaceae*-Familie selten (Baker et al., 2007; Hawkey et al., 2022a). Die Größen der Plasmide von *Enterobacteriaceae* reichen von ca. 1 kbp bis zu mehreren hundert kbp und kodieren dabei unterschiedlich viele Gene (Rozwandowicz et al., 2018; Balbuena-Alonso et al., 2022). Kleine Plasmide, durch die die phänotypischen Eigenschaften des Wirts nicht erkennbar verändert werden, werden als kryptische Plasmide bezeichnet (Frost et al., 2005). Mit zunehmender Größe steigt die Anzahl an Protein-kodierenden Sequenzen und die Komplexität der Plasmide, was auch Einfluss auf den Phänotyp der Wirtszelle haben kann (Frost et al., 2005). Nicht jedes Bakterium besitzt Plasmide, allerdings können auch bis zu neun unterschiedliche Plasmide gleichzeitig in einer Zelle vorliegen (Barry et al., 2019; Brolund et al., 2019).

Plasmide replizieren unabhängig vom Chromosom und autonom in der Zelle – werden deshalb auch als Replikons bezeichnet – und kontrollieren ihre Replikation durch Plasmid-kodierte Systeme selbst (del Solar et al., 1998; Filutowicz, 2009). Allerdings greifen Plasmide für ihre Replikation auf die Chromosomal-kodierte Replikationsmaschinerie der Wirtszelle zurück (del Solar et al., 1998; Bennett, 2008). Die minimale Erfordernis für ein Plasmid ist eine für die Replikation und deren Kontrolle essenzielle Region, die aus einem Replikationsursprung (*oriV*), Genen zur Replikationskontrolle und meist einem Replikationsprotein (Rep-Protein) besteht und für jeden Replikon-Typ charakteristisch ist (del Solar et al., 1998; Filutowicz, 2009). Bei zirkulären Plasmiden sind die bekanntesten Replikationsmechanismen die Theta-Replikation (z. B. IncF-Plasmide), die Rolling-Circle-Replikation, und die Strand-Displacement-Replikation (z. B. IncQ) (del Solar et al., 1998). Dabei sind die Rolling-Circle-Replikation bei Plasmiden von Gram-positiven und die Theta-Replikation bei Plasmiden von Gram-negativen Bakterien die Hauptreplikationsformen (Helinski, 2022).

Plasmide von Enterobakterien können anhand von Inkompatibilität klassifiziert werden. Plasmide der gleichen Inkompatibilitäts-Gruppe (Inc-Gruppe) können in einer Zelle nicht stabil coexistieren (Datta und Hedges, 1971). Dies ist eine Folge der gemeinsamen Nutzung von Replikations- oder Partitionierungssystemen, was zu einem Plasmid-Verlust über mehrere Generationen führen kann (Novick, 1987). Für *Enterobacteriaceae*-Plasmide wurden insgesamt 28 Inc-Gruppen definiert (Rozwandowicz et al., 2018). Anstelle aufwendiger Inkompatibilitäts-Testungen, sind heute PCR-basierte Inc-/Rep-Typisierungen zur Identifizierung der Replikon-Typen etabliert (Carattoli et al., 2005; Villa et al., 2010; Carloni et al., 2017). Obwohl die Inkompatibilität der Plasmide nicht mehr getestet wird, wird die Bezeichnung der bestehenden Inc-Typen beibehalten. Die Replikon-Identifizierung in

Ganzgenomsequenzdaten basiert auf dem Abgleich der Sequenz mit in Datenbanken wie PlasmidFinder hinterlegten Replikon-spezifischen Sequenzen (Carattoli et al., 2014). Dabei sind Plasmide mit multiplen Replikon-Typen möglich (Villa et al., 2010; Douarre et al., 2020).

Ein charakteristisches Merkmal für ein Plasmid ist dessen Wirtsbereich. Ein Wirtsbereich beschreibt dabei alle Organismen, in denen ein Plasmid replizieren kann (Suzuki et al., 2010). Plasmide mit engem Wirtsspektrum, wie IncF- und IncI-Plasmide, können nur in nahe verwandten Bakterien replizieren, hingegen können Plasmide mit breitem Wirtsspektrum, wie IncQ und IncP, in Bakterien verschiedener Phyla replizieren (Suzuki et al., 2010; Rozwandowicz et al., 2018). Ein weiteres Plasmid-Merkmal ist die Kopienzahl, die das Verhältnis von Plasmid-Anzahl zu Chromosomenanzahl beschreibt. Ein Plasmid besitzt dabei bei gleichbleibenden äußeren Einflüssen eine charakteristische Kopienzahl, die durch Replikationskontrollen manifestiert ist (del Solar et al., 1998; Nordstrom, 2006). Kleine Plasmide (z. B. ColE1-Plasmide) besitzen typischerweise hohe Kopienzahlen und große Plasmide (z. B. IncF-Plasmide) typischerweise niedrige (Thomas und Summers, 2008; Rozwandowicz et al., 2018).

Während kleine Plasmide mit hoher Kopienzahl ihre Vererbung bei der Zellteilung durch zufälliges Aufteilen der Kopien in die Tochterzellen passiv sicherstellen, können große Plasmide mit niedriger Kopienzahl ihre Vererbung durch Partitionierungssysteme sicherstellen (Hayes und Barilla, 2006; Thomas und Summers, 2008). Plasmid-Partitionierungssysteme sind divers, bestehen typischerweise aber aus zwei Proteinen – z. B. der ATPase ParA und dem Zentromer-Bindungsprotein ParB – und einer Partitionierungsstelle z. B. *parC* (Baxter und Funnell, 2014). Zu einer stabilen Plasmid-Vererbung kann weiterhin ein Plasmid-kodiertes Toxin-Antitoxin-System (TA-System) beitragen (Hayes, 2003; Carattoli, 2009). Hierbei kodiert ein Plasmid sowohl ein für das Bakterium toxisches Protein als auch dessen Antitoxin (RNA oder Protein) (Hayes, 2003; Unterholzner et al., 2013). Nach der Zellteilung, bei der das Plasmid nur in eine der beiden Tochterzellen verteilt wurde, führt die Wirkung des Toxins zum Zelltod der Tochterzelle, die keine Plasmid-Kopie besitzt (Unterholzner et al., 2013). Der Toxin-Antitoxin-Komplex wird in beide Tochterzellen übertragen – das labilere Antitoxin wird dabei schneller abgebaut als das Toxin, und da in dem Plasmid-freien Bakterium kein Antitoxin produziert werden kann, kann das Toxin schließlich wirken (Hayes, 2003). Bekannte TA-Systeme sind beispielsweise Hok-Sok, ParE-ParD, Doc-Phd (Unterholzner et al., 2013).

Plasmide tragen normalerweise keine für das Bakterium essenziellen Gene (Frost et al., 2005). Der Erwerb von Genen, die für das Bakterium essenziell sind, kann sogar zur Destabilisierung und zum Verlust des Plasmids führen (Wein et al., 2021). Manche Plasmide besitzen allerdings neben den Genen zum eigenen Erhalt auch akzessorische Gene (Bennett, 2008; Thomas und Summers, 2008). Daneben können Plasmide Gene besitzen, die dem Wirt phänotypisch vorteilhafte Eigenschaften verschaffen, wie eine Resistenz gegen Antibiotika (Fang et al., 2016; Porse et al., 2016; Guzman-Otazo et al., 2022), gegen Schwermetalle (Foster, 1983; Silver und Misra, 1988; Fang et al., 2016) oder gegen Desinfektionsmittel (Sahin et al., 2022). Weitere Merkmale wie Bacteriocine (Calcuttawala et al., 2017) und Virulenzfaktoren (Johnson und Nolan, 2009; Ramirez et al., 2014; Pilla und Tang, 2018) kann die Bakterienzelle ebenfalls durch das Plasmid erlangen. Somit können Plasmide dabei helfen, dass Bakterienpopulationen sich an verändernde Umgebungen anpassen und Umweltnischen mit widrigen Bedingungen besetzen (Heuer und Smalla, 2012; Orlek et al., 2017b).



Neben nicht mobilen Plasmiden, gibt es Plasmide, die in andere Bakterienzellen übertragbar sind – sogenannte mobilisierbare und konjugative Plasmide (Smillie et al., 2010). Konjugative Plasmide besitzen alle für den Transfer notwendigen Transferelemente (*tra*-Gene) und DNA-Regionen selbst, wobei die essenziellen Module in einen Übertragungsursprung (*origin of transfer, oriT*), eine Relaxase, ein Typ IV Kopplungsprotein (T4CP) und in das Typ IV Sekretionssystem (T4SS) unterteilt werden können (Shintani et al., 2015). Für die Konjugation schneidet die Relaxase einen Strang des Plasmids in der *oriT*-Region und bindet die einzelsträngige DNA zu einem Protein-DNA-Komplex (Smillie et al., 2010). Der mit dem T4SS assoziierte Pilus, der eine filamentöse Struktur an der Bakterienoberfläche (extrazellulär) bildet, nimmt Kontakt zu der Empfängerzelle in der Nähe auf und verringert den Abstand zwischen den Zellen (Partridge et al., 2018; Virolle et al., 2020). Der durch das T4CP an den T4SS gebundene Protein-DNA-Komplex wird anschließend durch die gebildete Pore in die Empfängerzelle übertragen (Schröder und Lanka, 2005; Partridge et al., 2018). In der Empfängerzelle ligiert die Relaxase das einzelsträngige Plasmid, und durch Replikation wird daraus ein doppelsträngiges Plasmid gebildet (Smillie et al., 2010; Virolle et al., 2020). Die Expression der *tra*-Gene kann bei IncF-Transfersystemen dabei sowohl durch Plasmid-eigene Systeme, wie das Fertilitätshemmungssystem FinOP, als auch durch wirtskodierte Funktionen unterdrückt sein (Fernandez-Lopez et al., 2016; Virolle et al., 2020). Mobilisierbare Plasmide besitzen kein T4SS und sind deshalb auf dessen Bereitstellung durch ein konjugatives Plasmid angewiesen, um in ein Bakterium übertragen zu werden (Smillie et al., 2010). Da mobilisierbare Plasmide die Gene für das T4SS nicht selbst tragen, können die Plasmide wesentlich kleiner sein (Garcillan-Barcia et al., 2011). Der Apparat, der bei der Konjugation zu einer Paarbildung benötigt wird (mating pair formation, MPF) und nur bei konjugativen Plasmiden vorhanden ist, kann zur Klassifizierung verwendet werden (z. B. MPF<sub>F</sub>, MPF<sub>I</sub>) (Smillie et al., 2010). Weiterhin können mobilisierbare und konjugative Plasmide anhand der Relaxase typisiert werden (z. B. MOB<sub>C</sub>, MOB<sub>F</sub>, MOB<sub>P</sub>) (Garcillan-Barcia et al., 2009; Smillie et al., 2010; Alvarado et al., 2012).

### 1.2.2 Entschlüsselung der Plasmid-Nukleotidsequenz durch Genomsequenzierung der zweiten und dritten Generation

Die Ganzgenomsequenzierung (whole genome sequencing) ist ein wichtiger Bestandteil für unser Verständnis von Mikroorganismen und deren Phänotyp (Goodwin et al., 2016). Ebenso ist für die vollständige Charakterisierung eines Plasmids dessen Sequenzierung notwendig (Carattoli, 2009). Die Sequenzieretechnologie, die Illumina mit dem Gerät MiSeq nutzt ist eine Hochdurchsatzsequenzierung und wird auch als Sequenzierung der zweiten oder nächsten Generation (second / next generation sequencing) bezeichnet (Loman und Pallen, 2015; Goodwin et al., 2016). Die MiSeq-Sequenzierung nutzt die Methode der Sequenzierung durch Synthese (sequencing by synthesis), bei der kurze DNA-Fragmente bis max. 300 bp sequenziert werden – deshalb auch Short-Read-Sequenzierung genannt (Goodwin et al., 2016). Die kurzen Fragmente werden dabei mit sehr hoher Genauigkeit sequenziert (Goodwin et al., 2016). Allerdings ist die vollständige Entschlüsselung von großen Plasmid-Sequenzen (> 50 kbp) mittels Short-Read-Sequenzierung wegen langer repetitiver Elemente schwierig (Arredondo-Alonso et al., 2017). Deshalb liegen die Plasmid-Sequenzen nach der Assemblierung häufig unvollständig und auf mehrere Contigs verteilt vor (de Toro et al., 2014; Arredondo-Alonso et al.,

2017). Mittels PlasmidFinder und ResFinder können dann in den Contigs Replikon-Typen und Antibiotikaresistenzgene identifiziert werden (Carattoli et al., 2014; Zankari et al., 2017). Allerdings kann dabei oft nicht geklärt werden, ob die Antibiotikaresistenzgene auf den Plasmiden liegen, wie viele verschiedene Plasmide in einem Bakterium vorliegen, ob Plasmide mit Multireplikon-Typen vorhanden sind und ob die Plasmide mobilisierbar bzw. konjugativ sind.

Die Sequenziertechnologie der dritten Generation (z. B. MinION), bei der lange DNA-Moleküle am Stück ohne Unterbrechung sequenziert werden, kann dabei eine Lösung für das Problem der repetitiven Elemente bieten (Schadt et al., 2010; Arredondo-Alonso et al., 2017; Wick et al., 2017b). Für die Entschlüsselung der DNA nutzt das MinION-Sequenziergerät die Nanoporen-Technologie (Clarke et al., 2009). Die Ablesegenauigkeit der Nukleotidbasen bei der Nanoporen-Technologie (lange DNA-Fragmente) ist im Vergleich zu Sequenziermethoden kurzer Fragmente geringer (Kono und Arakawa, 2019). Die Technologie hat sich allerdings stetig verbessert (Delahaye und Nicolas, 2021). Bei der MinION-Sequenzierung kann durch höhere Coverage die Präzision der Sequenzen verbessert werden, allerdings kann dadurch nicht die Präzision der MiSeq-Sequenzierung erreicht werden (George et al., 2017).

Eine Hybridassemblierung kann helfen, die Nachteile der beiden Sequenziertechnologien auszugleichen. Denn durch das Kombinieren der MiSeq- und MinION-Sequenzierdaten werden die Vorteile der MinION-Sequenzierung (lange, am Stück sequenzierte DNA-Fragmente) und der MiSeq-Sequenzierung (Präzision der Sequenzen) in einer *de novo*-Hybridassemblierung genutzt (Wick et al., 2017b). Im Idealfall kann die Anordnung der sich wiederholenden Sequenzen im Genom und im Plasmid gelöst werden, sodass die Plasmid-Nukleotidsequenzen letztendlich vollständig, d. h. ununterbrochen vorliegen (z. B. Stein et al. (2020)).

### 1.3 Pflanzliche Frischeprodukte als Träger antibiotikaresistenter Enterobakterien in der Humanernährung

Aufgrund der Kombination aus Vitaminen, Antioxidantien und Mineralien sind Obst und Gemüse, darunter auch Salate und Keimlinge, ein wichtiger Bestandteil einer gesunden und ausgewogenen Ernährung (Liu, 2013). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt deshalb pro Tag mindestens zwei Portionen Obst und drei Portionen Gemüse (DGE, 2017). Für eine erwachsene Person entspricht das ungefähr einer Menge von 250 g Obst sowie 400 g Gemüse und Salat. Dabei sollen roh verzehrtes Gemüse und Salate einen Anteil von 100 g bis 200 g ausmachen (Oberritter et al., 2013). Der tatsächliche Verzehr liegt in Deutschland allerdings weit unter den empfohlenen Mengen (Heuer et al., 2015; Gose et al., 2016). Die Nahrungsmittelbilanz konnte für Deutschland zuletzt einen reduzierten Verzehr an Früchten und einen gesteigerten Verzehr von Gemüse feststellen (DGE, 2020). Um den Verzehr von Obst und Gemüse zu steigern, sind minimal prozessierte Produkte, wie verzehrfertige Mischsalate (gewaschen, zerkleinert, gemischt, verpackt) wegen der praktikablen Handhabung und dem Erhalt der Produktfrische breit akzeptiert (Ragaert et al., 2004; Siddiqui et al., 2011). Denn die Motivation hinter dem Verzehr von Obst und Gemüse ist neben dem Geschmack auch der damit

verbundene Gesundheitsaspekt (BMEL, 2022). Ohnehin ist der Anteil der Verbraucherinnen und Verbraucher, die sich vegetarisch oder rein pflanzlich ernähren, seit 2020 gestiegen (BMEL, 2022).

Wegen des Erhalts der Produkteigenschaften und der thermolabilen Nährstoffverbindungen werden pflanzliche Frischeprodukte oft nur minimal prozessiert oder roh verzehrt. Dies ist besonders dann ein Problem, wenn Nahrungsmittel mit pathogenen Bakterien kontaminiert sind, die beim Menschen zu lebensmittelassoziierten Infektionen führen können (Berger et al., 2010; Callejon et al., 2015; Carstens et al., 2019). Denn neben Fleisch als dem Träger pathogener Bakterien (Belongia et al., 1991; Omer et al., 2018; Canning et al., 2023) wurden auch pflanzliche Produkte als Träger pathogener Erreger identifiziert (Lynch et al., 2009; Callejon et al., 2015; Herman et al., 2015; Fiedler et al., 2019). So führte der Verzehr von pflanzlichen Frischeprodukten, die mit *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* spp. *enterica* Serovar Coeln bzw. mit *Listeria monocytogenes* kontaminiert waren, in der Vergangenheit zu Infektionsausbrüchen (Sharapov et al., 2016; Vestrheim et al., 2016; Self et al., 2019). In Deutschland sind roh verzehrte Sprossen als Vehikel für pathogene Bakterien 2011 in den Fokus gerückt. So starben in Norddeutschland 54 Menschen in Folge eines Sprossen-assoziierten Ausbruchs mit Shigatoxin-produzierendem *E. coli* O104:H4 (Buchholz et al., 2011; Frank et al., 2011). Aufgrund der Belastung mit Humanpathogenen wird vulnerablen Personengruppen deshalb der Konsum von Sprossen und verzehrfertigen Mischsalaten nicht empfohlen (BfR, 2020).

Viel häufiger als pathogene Bakterien werden auf pflanzlichen Frischeprodukten neben Hefen, Schimmel und Viren auch opportunistisch pathogene und nicht pathogene Bakterien detektiert. Dabei zeigen die pflanzlichen Frischeprodukte hohe Gesamt- und *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen, wobei die Belastung je nach Produktgruppe unterschiedlich stark ist (Abadias et al., 2008; Leff und Fierer, 2013; Fiedler et al., 2017). Sprossen weisen dabei eine besonders hohe Belastung mit *Enterobacteriaceae* auf (Abadias et al., 2008). Enterobakterien dienen auf den Produkten als Verderbniserreger, deren Wachstum durch den austretenden Pflanzensaft geschnittener Salate noch gefördert wird (Ragaert et al., 2007).

Seit Jahren werden pflanzliche Nahrungsmittel, wie Karotten, Gurken, Tomaten, Kräuter, Salate, Mischsalate und Sprossen, zudem auch als Träger antibiotikaresistenter Enterobakterien identifiziert (Boehme et al., 2004; Schwaiger et al., 2011; Campos et al., 2013; Holvoet et al., 2013; Blau et al., 2018; Iseppi et al., 2018; Al-Kharousi et al., 2019; Cho et al., 2021). Bei Konsumierenden steigt deshalb die Sensibilität für das Thema „antibiotikaresistente Bakterien“. So zeigte eine Umfrage, dass bei den Verbraucherinnen und Verbrauchern in der Europäischen Union antibiotikaresistente Bakterien in Lebensmitteln eines der Themen sind, die in Bezug auf Lebensmittel die größten Sorgen bereiten (EFSA, 2022).

In europäischen Studien zu antibiotikaresistenten Enterobakterien auf pflanzlichen Frischeprodukten liegt der Fokus meist auf der Detektion von Bakterien, die  $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL) produzieren, wobei die Prävalenz meist gering ist (Nuesch-Inderbinen et al., 2015; van Hoek et al., 2015; Zurfluh et al., 2015; Margot et al., 2016; Randall et al., 2017; Freitag et al., 2018; Huizinga et al., 2018; Iseppi et al., 2018; Stoll et al., 2018; Kaesbohrer et al., 2019). Einzelne Studien zeigen allerdings höhere Prävalenzen, wie eine niederländische Studie, die in 19 % der untersuchten Sprossen

ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* fand, und eine Schweizer Studie, die in 25 % von aus der Dominikanischen Republik, Indien, Thailand und Vietnam importiertem Gemüse ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* detektierte (Zurfluh et al., 2015; Huizinga et al., 2018). Weitere Studien in Deutschland fokussierten die Untersuchung auf Tetracyclin-resistente Enterobakterien auf pflanzlichen Frischeprodukten (Blau et al., 2018; Reid et al., 2019; Cho et al., 2021). Insgesamt sind auf pflanzlichen Frischeprodukten sowohl Bakterien mit geringer Resistenz aber auch Enterobakterien mit mehrfacher Resistenz gegen Antibiotika unterschiedlicher Klassen vorhanden (Skockova et al., 2013; Blau et al., 2018; Huizinga et al., 2018; Stoll et al., 2018; Colosi et al., 2020). Hingegen ist in Europa das Vorkommen von Enterobakterien mit Resistenzen gegen Carbapeneme ( $\beta$ -Laktam-Subgruppe) und gegen das Reserveantibiotikum Colistin auf pflanzlichen Produkten äußerst gering (Jones-Dias et al., 2016; Colosi et al., 2020).

Eine Kontamination von pflanzlichen Frischeprodukten mit pathogenen und antibiotikaresistenten Bakterien kann entlang der kompletten Warenkette vom Feld bis zum Verbraucher stattfinden (Olaimat und Holley, 2012; Jung et al., 2014; Rahman et al., 2021; Smalla et al., 2023). So können Pflanzen über einen mit antibiotikaresistenten Bakterien belasteten Boden kontaminiert werden (D'Costa et al., 2006; Hölzel et al., 2018; Guron et al., 2021). Weiterhin kann ein Eintrag vor der Ernte über Bewässerungswasser, Luft, Ausscheidungen von Wildtieren oder organischen Dünger erfolgen (Heuer et al., 2011; Laube et al., 2014; Njage und Buys, 2015; Jongman und Korsten, 2016; Gekenidis et al., 2018; Cha et al., 2020; Plaza-Rodriguez et al., 2020; Hembach et al., 2022). Während und nach der Ernte der pflanzlichen Produkte sind Mitarbeitende, Schneidwerkzeuge oder das Waschwasser bei kommerziellen Waschschritten mögliche Kontaminationsquellen (Espinoza-Medina et al., 2006; Taormina et al., 2009; Fiedler, 2021; Rosberg et al., 2021).

Bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen sind besonders die übertragbaren Antibiotikaresistenzplasmide zu berücksichtigen (Davies und Davies, 2010; von Wintersdorff et al., 2016). Deshalb werden bei Untersuchungen antibiotikaresistenter Bakterien von pflanzlichen Frischeprodukten auch vermehrt deren Plasmide untersucht. Dabei werden meist mittels PCR-basierter Typisierungsmethoden aber auch mittels Short-Read-Sequenzierung Plasmide unterschiedlicher Inc-Typen detektiert: IncFIA, IncFIB, IncFII, IncHI1, IncHI2, IncI1, IncI2, IncK, IncL/M, IncN, IncP, IncQ1, IncR, IncU, IncX, IncY und Col-Replikon-Typen (Jones-Dias et al., 2016; Blau et al., 2018; Freitag et al., 2018; Huizinga et al., 2018; Iseppi et al., 2018; Reid et al., 2019; Cho et al., 2021). Eine Zuordnung der Resistenzgene zu den Plasmiden ist mit diesen Methoden meist nicht möglich. Mit Konjugationsversuchen konnte bestätigt werden, dass sich übertragbare Antibiotikaresistenzplasmide auf Bakterien aus pflanzlichen Frischeprodukten befinden (Reuland et al., 2014; Blau et al., 2018; Freitag et al., 2018; Iseppi et al., 2018). Weiterhin wurden IncF-, IncI- und IncP-Antibiotikaresistenzplasmide mittels exogener Plasmid-Isolierung von angereicherten gemischten Salat- und Koriander-Proben isoliert und charakterisiert (Blau et al., 2018). Pflanzliche Frischeprodukte werden oft roh verzehrt und somit werden lebende Bakterien auf den Menschen übertragen. Dabei stellen diese Produkte ein Vehikel für antibiotikaresistente Bakterien und besonders für transferierbare Antibiotikaresistenzen auf den Menschen dar (Blau et al., 2018; Luo und Matthews, 2023). Deshalb sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Plasmide von Bakterien zu

charakterisieren, die sich auf pflanzlichen Frischeprodukten befinden. Besonders wichtig ist die komplette Darstellung der Plasmide und der Transfer von Antibiotikaresistenzplasmiden zwischen Enterobakterien.

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

Pflanzliche Lebensmittel sind Teil einer ausgewogenen Ernährung des Menschen. Dabei werden Produkte wie Salat, Gemüse (Paprika, Karotten, Gurken) und Sprossen oft roh und ohne Dekontaminationsschritt verzehrt. Antibiotikaresistente Bakterien sind überall vorhanden und auch Teil der Mikrobiota von zum Verzehr geeigneten pflanzlichen Frischeprodukten. Somit können diese Lebensmittel als Vehikel antibiotikaresistenter Bakterien zwischen der Umwelt bzw. den Erzeugerbetrieben und dem Menschen gesehen werden. Die mikrobielle Unbedenklichkeit bei zum Verzehr geeigneten pflanzlichen Frischeprodukten muss gegeben sein. Allerdings ist eine regelmäßige Kontrolle der pflanzlichen Produkte auf das Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien vom Gesetzgeber nicht vorgesehen und durch die herstellenden Betriebe auch nicht leistbar. Antibiotikaresistenzen sind ein weltweites Problem und besonders die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen zwischen unterschiedlichen Lebensbereichen ist noch nicht ausreichend geklärt. Aus diesem Grund ist auch die Analyse von Plasmiden wichtig, die von Bakterien auf pflanzlichen Frischeprodukten stammen, denn diese können potenziell an der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen zum Menschen mitwirken. In zuvor durchgeführten Studien wurden antibiotikaresistente Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* von Frischeprodukten isoliert und charakterisiert (Loop, 2019; Cho et al., 2021). Die MiSeq-Sequenzierungsergebnisse dieser Studien zeigten, dass Antibiotikaresistenzgene und teilweise Plasmide in den Stämmen nachweisbar waren. Allerdings konnte anhand der Daten kein vollständiges Bild über die Lage der Antibiotikaresistenzgene (auf dem Chromosom oder Plasmid) und über Plasmid-Eigenschaften (Größe, Mobilität, etc.) gewonnen werden. Deshalb zielte die vorliegende Studie darauf ab, die Plasmide dieser Enterobakterien zu charakterisieren sowie den Transfer antibiotikaresistenter Plasmide *in vitro* und auf dem Lebensmittel zu untersuchen. Hieraus ergaben sich folgende Forschungsfragen:

1. Welche Plasmide sind in Enterobakterien, die von pflanzlichen Frischeprodukten stammen, vorhanden? Sind die Plasmide potenziell transferierbar und besitzen sie Antibiotikaresistenzgene?
2. Ist eine Übertragung der zuvor charakterisierten Antibiotikaresistenzplasmide in einen *E. coli*-Empfängerstamm *in vitro* möglich? Wie unterscheiden sich die Transferraten bei unterschiedlichen Temperaturen und Nährstoffangeboten?
3. Ist eine Übertragung der zuvor charakterisierten Antibiotikaresistenzplasmide in einen *E. coli*-Empfängerstamm auf dem Lebensmittel (Mischsalat, Sprossen) bei unterschiedlichen Temperaturen möglich?
4. Können Tetracyclin- bzw. Cefotaxim-Resistenz vermittelnde Plasmide von unbekanntem Spenderstämmen von Sprossenmischen mittels exogener Plasmid-Isolierung in einen *E. coli*-Empfängerstamm transferiert werden?

Bei der Betrachtung von Plasmiden und ihrer Beteiligung an der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen ist die vollständige Aufklärung ihrer Nukleotidsequenzen besonders wichtig. Dafür wurde die komplette DNA der Isolate zusätzlich zur MiSeq-Sequenzierung auch mit dem MinION sequenziert und die Sequenzierdaten in einer Hybridassemblierung kombiniert. Die Übertragbarkeit von Antibiotikaresistenzplasmiden wurde mittels Konjugationsversuchen *in vitro* (Filtermating: Membranfilter auf Nähragar) und auf dem Lebensmittel (auf Mischsalat bzw. Sprossen) getestet. Ebenfalls wurden exogene Plasmid-Isolierungsexperimente mittels Filtermating und mittels Mating auf Sprossenproben durchgeführt, um antibiotikaresistente Plasmide von Bakterien der Sprossen-Mikrobiota einzufangen.

Die vorliegende Studie soll zum besseren Verständnis beitragen, wie pflanzliche Frischeprodukte an der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen von der Umwelt auf den Menschen beteiligt sind.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

In diesem Kapitel werden alle Geräte, Nährmedien, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien aufgelistet, die für die Anfertigung dieser Arbeit verwendet wurden. Außerdem werden die Zusammensetzungen der Lösungen und Puffer beschrieben.

#### 2.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte sind im Anhang (Tabelle 45) aufgelistet.

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits

Im Anhang sind die Verbrauchsmaterialien (Tabelle 46) und verwendeten Kits (Tabelle 47) aufgeführt.

#### 2.1.3 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Tabelle 48 im Anhang zeigt die Chemikalien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Die hier folgende Tabelle 1 beschreibt die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen sowie die Hersteller der Chemikalien.

<b>Lösung und Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin-Stocklösung [50 mg/ml] <sup>1</sup>	0,5 g Ampicillin Natriumsalz ad 10 ml Nukleasefreies Wasser	AppliChem, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Cefotaxim-Stocklösung [10 mg/ml] <sup>1</sup>	0,1 g Cefotaxim Natriumsalz ad 10 ml Nukleasefreies Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chloramphenicol- Stocklösung [30 mg/ml]	0,3 g Chloramphenicol ad 10 ml Ethanol	PanReac AppliChem, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ciprofloxacin- Stocklösung [10 mg/ml] <sup>1</sup>	0,1 g Ciprofloxacin Hydrochlorid- Monohydrat ad 10 ml Nukleasefreies Wasser	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
EDTA [0,5 M] (pH 8,0) <sup>2</sup>	186,1 g EDTA Dinatriumsalz- Dihydrat bis pH 8,0 NaOH [10 N] ad 1 l Reinstwasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe PanReac AppliChem, Darmstadt
Ethanol [80 %]	20 ml Reinstwasser 80 ml Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Gentamicin-Stocklösung [50 mg/ml] <sup>1</sup>	0,5 g Gentamicinsulfat ad 10 ml Nukleasefreies Wasser	AppliChem PanReac, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glucose-Lösung [50 %]	100 g Glucose ad 0,2 l Reinstwasser	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin-Stocklösung [10 mg/ml] <sup>1</sup>	0,1 g Kanamycinsulfat ad 10 ml Nukleasefreies Wasser	AppliChem PanReac, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Loading dye [6x]	1,5 ml Glycerin 0,0125 g Bromphenolblau 0,0125 g Xylencyanol FF	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt AppliChem, Darmstadt
Lysozym-Lösung [10 mg/ml]	10 mg Lysozym ad 1 ml Reinstwasser	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Lösung und Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
NaCl-Lösung [0,85 %] <sup>2</sup>	8,5 g NaCl ad 1 l Reinstwasser	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl-Peptonlösung (à 9 ml/ Röhrchen) <sup>2</sup>	8,5 g NaCl 1 g Pepton aus Casein ad 1 l Reinstwasser	Merck KGaA, Darmstadt Merck KGaA, Darmstadt
Primer [10 pmol/μl]	Primer-Stocklösungen wurden mit nukleasefreiem Wasser (Ambion) auf 10 pmol/μl verdünnt	Life Technologies Corporation, Austin, USA
Proteinase K-Lösung [10 mg/ml]	10 mg Proteinase K ad 1 ml Reinstwasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rifampicin-Stocklösung [15 mg/ml]	0,15 g Rifampicin ad 10 ml Methanol	AppliChem PanReac, Darmstadt Merck KGaA, Darmstadt
Ringerlösung (Viertelstark) <sup>2</sup>	1 Ringer Tablette ad 0,5 l Reinstwasser	Merck KGaA, Darmstadt
Streptomycin- Stocklösung [10 mg/ml] <sup>1</sup>	0,1 g Streptomycinsulfat ad 10 ml Nukleasefreies Wasser	AppliChem, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TAE-Puffer [1-fach]	20 ml Rotiphorese 50x TAE-Puffer ad 1 l Reinstwasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TBE-Puffer [0,5-fach]	6,06 g Tris Pufferan 3,09 g Borsäure 0,038 g EDTA Dinatriumsalz- Dihydrat ad 1 l Reinstwasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe ChemSolution GmbH, Neustadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris/EDTA-Puffer [1-fach] (pH 8,0) <sup>2</sup>	1,214 g Tris Pufferan 0,372 g EDTA Dinatriumsalz- Dihydrat bis pH 8,0 Salzsäure [1 N] ad 1 l Reinstwasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tetracyclin-Stocklösung [10 mg/ml] <sup>1</sup>	0,1 g Tetracyclin Hydrochlorid ad 10 ml Nukleasefreies Wasser	Sigma Chemie GmbH, Steinheim Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris [10 mM] (pH 8,0) <sup>2</sup>	1,21 g Tris Pufferan bis pH 8,0 Natriumhydroxid Plätzchen ad 1 l Reinstwasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt

<sup>1</sup> Sterilfiltriert mit 0,22 μm Rotilabo®-Spritzenfilter.

<sup>2</sup> Autoklaviert für 15 Minuten bei 121 °C.

#### 2.1.4 Nährmedien

Alle Fertignährmedien wurden entsprechend den Herstellerangaben zubereitet und autoklaviert (Tabelle 2). Die Nährmedien wurden in Reinstwasser gelöst. Feste und flüssige Nährmedien wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2: Verwendete flüssige und feste Nährmedien und deren Hersteller.

Nährmedium	Beschreibung	Hersteller
BHI-Bouillon	Hirn-Herz-Infusions-Bouillon (BHI-Bouillon); nährstoffreiches Wachstumsmedium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
BHI-Glucose-Agar	BHI-Bouillon mit Agar-Agar (15 g/l) und 10 % zusätzlicher Glucose; Nährgrundlage für Konjugationsvorversuche (Kapitel 2.3.3)	BHI: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Glucose-Lösung [50 %]: siehe Tabelle 1



Nährmedium	Beschreibung	Hersteller
BHI-Glucose-Bouillon	BHI-Bouillon 1:10 mit Reinstwasser verdünnt und zusätzlich 1 % Glucose; für Konjugationsvorversuche (Kapitel 2.3.3)	BHI: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Glucose-Lösung [50 %]: siehe Tabelle 1
Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon	Für Anreicherung von fäkalcoliformen Mikroorganismen	Merck KGaA, Darmstadt
Brilliance ESBL-Agar	Detektion von Organismen, die ESBL bilden	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
CaSo-Bouillon	Casein-Soja-Pepton-Bouillon (CaSo-Bouillon) für Bakterienanzucht	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Gepuffertes Peptonwasser	Für nicht selektive Anreicherung	VWR International GmbH, Darmstadt
LB-Agar (Lennox)	Lysogeny broth-Agar mit 5 g/l NaCl für Bakterienanzucht	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
LB-Bouillon (Lennox)	Lysogeny broth mit 5 g/l NaCl für Bakterienanzucht	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Müller-Hinton-Agar	Für den Agardiffusionstest zur Antibiotika-Resistenzbestimmung nach CLSI	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Müller-Hinton-Bouillon 2	Für die Bestimmung der minimalen Antibiotika-Hemmkonzentration nach CLSI	Merck KGaA, Darmstadt
VRBD	Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar zur Selektion von coliformen Keimen	Merck KGaA, Darmstadt

Weiterhin wurden folgende modifizierte Nährmedien verwendet:

#### Salat-Agar

Der Salat-Agar wurde bei den Konjugationsversuchen A (siehe Kapitel 2.3.4) neben LB-Agar als Nährstoffgrundlage für das Filtermating verwendet.

Für den Salat-Agar wurde der Inhalt einer Packung Blattsalat-Mix, einer Packung Möhrenstreifen und einer Packung Pflücksalat-Gemüse-Mischung (Tabelle 3) mit einem Fleischwolf zerkleinert und anschließend die Flüssigkeit mittels eines Käsetuchs von den festen Bestandteilen getrennt.

Tabelle 3: Zutaten für die Herstellung des Salatsafts für den Salat-Agar.

	Blattsalat-Mix	Frisches Gemüse	Pflücksalat-Gemüse-Mischung (wild und intensiv)
Hersteller	Ja! (Tackern GmbH)	Tackern GmbH	Florette Deutschland GmbH
Zutaten	Endivien, Frisée, Radicchio	Möhrenstreifen	Junge Blätter von grünem Blattsalat, rotem Mangold, rotem Blattsalat und Rucola
Füllmenge	150 g	200 g	100 g
Herkunft	Deutschland	Deutschland	Deutschland

Um die Flüssigkeit von weiteren festen Bestandteilen zu trennen, wurde sie für 90 Minuten bei 14.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem 0,45- $\mu$ m- und anschließend mit einem 0,2- $\mu$ m-Spritzenfilter filtriert. Agar-Agar wurde in doppelter Konzentration eingewogen, in Wasser gelöst und für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50 °C wurde der filtrierte Salatsaft im Verhältnis 1:1 zum gelösten Agar-Agar dazugegeben und in 90-mm-Petrischalen gegossen – ca. 20 ml pro Petrischale.

Selektivagar: LB-Agar mit Antibiotika

Bei den Konjugationsversuchen wurden für die Selektion von Transkonjuganten sowie von Spender- und Empfängerstämmen Selektivagarplatten verwendet. Hierzu wurde LB-Agar mit unterschiedlichen Antibiotikakombinationen und -konzentrationen versetzt.

Der LB-Agar wurde nach Herstellerangaben zubereitet und autoklaviert. Nachdem der LB-Agar auf ca. 50 °C abgekühlt war, wurden die Antibiotika-Stocklösungen aus Tabelle 1 so zugegeben, wie in Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 4: LB-Agar mit Antibiotika für die Selektion von Transkonjuganten, Spender- und Empfängerstämmen im Rahmen von Konjugationsversuchen. LB = Lysogeny broth; CTX = Cefotaxim; KA = Kanamycin; RD = Rifampicin; TE = Tetracyclin.

Selektivagar	Eingesetzte Menge der Stocklösung	Antibiotika-Stocklösung	Endkonzentration im Selektivagar
LB+TE	5 ml/l	Tetracyclin in Wasser [10 mg/ml]	50 µg/ml
LB+CTX	1 ml/l	Cefotaxim in Wasser [10 mg/ml]	10 µg/ml
LB+KA/RD	5 ml/l	Kanamycin in Wasser [10 mg/ml]	50 µg/ml
	3,3 ml/l	Rifampicin in Methanol [15 mg/ml]	50 µg/ml
LB+KA/RD/TE	5 ml/l	Kanamycin in Wasser [10 mg/ml]	50 µg/ml
	3,3 ml/l	Rifampicin in Methanol [15 mg/ml]	50 µg/ml
	5 ml/l	Tetracyclin in Wasser [10 mg/ml]	50 µg/ml
LB+KA/RD/CTX	5 ml/l	Kanamycin in Wasser [10 mg/ml]	50 µg/ml
	3,3 ml/l	Rifampicin in Methanol [15 mg/ml]	50 µg/ml
	1 ml/l	Cefotaxim in Wasser [10 mg/ml]	10 µg/ml

## 2.1.5 Verwendete Bakterien- und Referenzstämme

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Referenzstämme und der gentechnisch veränderte Rezipient *E. coli* CV601 verwendet.

Tabelle 5: Empfängerstamm für die Konjugation und Referenzstämme, deren Herkunft und Merkmale. Kan<sup>R</sup> = Kanamycinresistenz; Rif<sup>R</sup> = Rifampicinresistenz; *gfp* = grün fluoreszierendes Protein; thr = Threonin; leu = Leucin; thi = Thiamin; *stx* = Shigatoxin; *eae* = Intimin.

Stamm	Herkunft	Merkmale	Verwendung
<i>E. coli</i> CV601	Julius Kühn-Institut (Smalla et al., 2000; Heuer et al., 2002)	Kan <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , <i>gfp</i> <sup>+</sup> thr <sup>-</sup> , leu <sup>-</sup> , thi <sup>-</sup>	Empfängerstamm für Konjugationsversuche
<i>E. coli</i> O157:H7 (EDL 933) ATCC®43895	Max Rubner-Institut	<i>stx1</i> <sup>+</sup> , <i>stx2</i> <sup>+</sup> , <i>eae</i> <sup>+</sup>	Positivkontrolle für STEC <i>real time</i> PCR
<i>E. coli</i> O6:H1 ATCC®25922	Max Rubner-Institut	Sensitiv gegenüber allen getesteten Antibiotika	Kontrollstamm nach CLSI (2022) für Antibiotikaresistenzversuche

Die 22 Enterobakterien, deren Plasmide in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert wurden, wurden im Rahmen vorangegangener Arbeiten bereits von pflanzlichen Frischeprodukten isoliert (Tabelle 6) (Loop, 2019; Cho et al., 2021). Alle Stämme, bis auf Kpneu28 und Kpneu34, wurden auf Tetracyclin-haltigem Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar (VRBD-Agar) isoliert und mit dem MiSeq-Sequenziergerät sequenziert. Im Rahmen einer taxonomischen Studie wurden die Ganzgenomdaten

(MiSeq) von 17 der 20 Stämme – gemeinsam mit weiteren Enterobakterien-Stämmen – bereits veröffentlicht (BioProject-Nummer bei NCBI: PRJNA559804) (Cho et al., 2021). Die Stämme Cif11, Kva3 und Kpneu8 waren ebenfalls Teil der taxonomischen Studie, allerdings wurden diese nicht mit dem MiSeq sequenziert (Cho et al., 2021). Die *Klebsiella*-Stämme Kpneu28 und Kpneu34 wurden in einer Masterarbeit näher untersucht, die das Ziel hatte, ESBL-produzierende *Klebsiella*-Spezies von Sprossen zu isolieren (Loop, 2019). Die Stämme Kpneu28 und Kpneu34 wurden von frischen Sprossen isoliert (Loop, 2019): Hierzu wurden 25 g der frischen Sprossen aseptisch in einen sterilen Stomacherbeutel überführt und mit 225 g sterilem gepufferten Peptonwasser vermischt. Nach der Homogenisierung bei 200 rpm für zwei Minuten in einem Stomacher folgte ein Inkubationsschritt bei 41,5 °C für 24 Stunden. Nach einer erneuten Homogenisierung wurden 1 ml der 24-h-Kultur in 9 ml Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon gemischt und bei identischen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden davon 10 µl auf Brilliance ESBL-Agar verteilt und wieder bei den gleichen Bedingungen inkubiert. Da *Klebsiella*-Stämme untersucht werden sollten, wurden einzelne grüne Kolonien ausgewählt und durch mehrfaches Ausstreichen auf Brilliance ESBL-Agar aufgereinigt. Durch weitere Charakterisierung mit dem AmpC- und ESBL-Test D68C wurden die Stämme Kpneu28 und Kpneu34 als ESBL-produzierende Bakterien identifiziert.

Die MiSeq-Sequenzierung der Stämme Cif11, Kva3, Kpneu8, Kpneu28 und Kpneu34 ist in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

Tabelle 6: Enterobakterien, die von pflanzlichen Lebensmitteln isoliert und im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert wurden. Ebenfalls aufgelistet sind die Produktherkunft, das Jahr der Isolierung und die zugehörige Veröffentlichung bzw. Masterarbeit.

Stammbezeichnung (Bezeichnung in vorherigen Arbeiten)	Produkt	Herkunftsland	Jahr der Isolierung	Veröffentlichung bzw. Masterarbeit
Cigi1 (C1)	Rucola	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Cipo4 (C4)	Gemischter Salat (Karotten, Lauch, Sellerie)	Unbekanntes Ursprungsland	2015	Cho et al. (2021)
Ciw5.1 (C5.1)	China-Rosensprossen, Rettichsprossen	Niederlande	2015	Cho et al. (2021)
Ciw5.2 (C5.2)	China-Rosensprossen, Rettichsprossen	Niederlande	2015	Cho et al. (2021)
Cipa6.1 (C6.1)	Mungosprossen	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Cipa6.2 (C6.2)	Mungosprossen	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Cif11 (C11)	China-Rosensprossen, Rettichsprossen	Niederlande	2015	Cho et al. (2021)
Cipo13 (C13)	Rucola	Italien	2015	Cho et al. (2021)
Endy1 (E1)	Mungobohnensprossen	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Endy2 (E2)	Mungobohnensprossen	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Enh11 (E11)	Gurke	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Enb12 (E12)	Kichererbsensprossen, Azukisprossen, Sojasprossen	Niederlande	2015	Cho et al. (2021)
Ec1115	Lollo Rosso, Lollo Biondo	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Ec1117	Oregano	Niederlande	2015	Cho et al. (2021)
Ec1119	Karotten	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Ec1120	Lollo Rosso, Lollo Biondo	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Kgr1 (K1)	Karotten	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Kva3 (K3)	Majoran	Kenia	2015	Cho et al. (2021)
Kpneu4 (K4)	Karotten	Deutschland	2015	Cho et al. (2021)
Kpneu8 (K8)	Zwiebelsprossen	Niederlande	2015	Cho et al. (2021)
Kpneu28 (34)	Bio-Sprossen von Luzerne, Radieschen, Brokkoli	Deutschland	2017	Loop (2019)
Kpneu34 (40)	Bio-Sprossen aus Mini- Mungobohnen, Kichererbsen, Azukibohnen, grünen Erbsen, Weizen	Deutschland	2017	Loop (2019)

Cif = *Citrobacter freundii*; Cigi = *Citrobacter gillenii*; Cipo = *Citrobacter portucalensis*; Cipa = *Citrobacter pasteurii*; Ciw = *Citrobacter werkmanii*; Enb = *Enterobacter bugandensis*; Endy = *Enterobacter dykesii*; Enh = *Enterobacter hormaechei*; Ec = *Escherichia coli*; Kgr = *Klebsiella grimontii*; Kpneu = *Klebsiella pneumoniae*; Kva = *Klebsiella variicola*.

### 2.1.6 Software und Online-Tools

In Tabelle 7 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Programme aufgelistet.

Tabelle 7: Software und bioinformatische Programme für die Datenverarbeitung.

Name	Version	Hersteller / Publikation
BioDocAnalyze	2.1	Biometra GmbH, Göttingen
Blast+ (Basic local alignment search tool)	2.9.0	National Library of Medicine, Bethesda, USA
Bowtie	2.4.1	Langmead und Salzberg (2012)

<b>Name</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller / Publikation</b>
BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center)		Olson et al. (2023)
CFX Maestro	2.0	BioRad, Hercules, USA
CGview		Stothard und Wishart (2005)
Clusters of Orthologous Genes-Datenbank	0.1	Galperin et al. (2015)
Easyfig	2.2.2	Sullivan et al. (2011)
Geneious	9.1.8	Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand; Kearse et al. (2012)
Geneious Prime®	2023.0.4	Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand; Kearse et al. (2012)
Genome-to-Genome distance calculator	3.0	Meier-Kolthoff et al. (2013), Meier-Kolthoff et al. (2022)
ggplot2	3.4.2	Wickham (2016)
GPU Guppy Basecalling Software	3.4.4; 4.0.9; 5.0.16; 6.1.2	<a href="https://community.nanoporetech.com/downloads">https://community.nanoporetech.com/downloads</a>
IntegronFinder	2.0.2	Cury et al. (2016); Neron et al. (2022)
Java	1.8.0_101	Oracle Corporation, Austin, USA
JMP	17.0.0	SAS Institute, Cary, North Carolina, USA
MegAlign Pro	17.0.2	DNASTAR, Inc., Madison, USA
MobileElementFinder	Software: v1.0.3 (2020-10-09), Database: v1.0.2 (2020-06-09)	Johansson et al. (2021)
MOB-suite	3.0.3	Robertson und Nash (2018), Robertson et al. (2020)
NanoCLUST	1.0dev	Rodriguez-Perez et al. (2021)
NanoDrop 2000		Thermo Scientific, Waltham, USA
Nanofilt	2.2.0; 2.5.0	De Coster et al. (2018)
Nextflow	21.10.6	Di Tommaso et al. (2017)
PATRIC (Phylogenetic Tree Building Service)		Davis et al. (2020)
PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline)	6.4 (2022-12-13.build6494)	Li et al. (2021)
PHASTER (PHAge Search Tool Enhanced Release)	Datenbank Bacteria; Prophage/Virus: 22.12.2020	Zhou et al. (2011), Arndt et al. (2016)
Pilon	1.23	Walker et al. (2014)
PlasmidFinder 2.1	Software: 2.0.1 (2020-07-01); Databank: 2023-01-18	Camacho et al. (2009); Carattoli et al. (2014)
Porechop	0.2.4	Wick et al. (2017a)
PrimerBLAST	Primer3 + BLAST	Ye et al. (2012)
Racon	1.4.16	Vaser et al. (2017)
RColorBrewer (RStudio)	1.1-3	Neuwirth und Neuwirth (2014)
Readxl	1.4.2	<a href="https://readxl.tidyverse.org">https://readxl.tidyverse.org</a> , <a href="https://github.com/tidyverse/readxl">https://github.com/tidyverse/readxl</a>
ResFinder 4.1	Software: 2022-08-08, Datenbank: 2022-05-24	Camacho et al. (2009); Zankari et al. (2017); Bortolaia et al. (2020)
RStudio	2023.03.0	Posit Software, PBC, Bosten, USA
SAMtools	1.9	Danecek et al. (2021)
SeqBuilder Pro	17.0.2	DNASTAR, Inc., Madison, USA
SPAdes	3.13.2	Bankevich et al. (2012)
Trimmomatic	0.39	Bolger et al. (2014)
Unicycler	0.4.9b	Wick et al. (2017b)

## 2.2 Methoden zur Charakterisierung von Enterobakterien und ihrer Plasmide

Die Plasmide der 22 Stämme aus Tabelle 6 sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden. Um die Plasmide besser darstellen zu können, wurde die genomische DNA der Isolate mit dem MinION-Sequenziergerät sequenziert (Kapitel 2.2.3). Anschließend wurden die MiSeq- und MinION-Sequenzierdaten in einer Hybridassemblierung mit dem Unicycler kombiniert, um komplette Chromosom- und Plasmid-Sequenzen zu erhalten (Kapitel 2.2.4).

### 2.2.1 Minimaler Antibiotika-Hemmkonzentrationstest

Mit dem minimalen Hemmkonzentrationstest (MHK-Test) kann getestet werden, welche Konzentration eines antimikrobiellen Stoffes (z. B. Antibiotikum) mindestens notwendig ist, um ein Bakterienwachstum zu hemmen (Andrews, 2001). Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration kam die Mikrodilutionsmethode zum Einsatz, um die Stämme hinsichtlich ihrer Resistenz gegen sieben verschiedene Antibiotika zu testen. Zusätzlich wurde für die Konjugationsversuche ermittelt, welche Antibiotika-Konzentrationen zur Selektion der Transkonjuganten zu verwenden waren.

Die 22 Enterobakterien wurden auf ihre Resistenz gegen Ampicillin (AMP), Cefotaxim (CTX), Tetracyclin (TE), Chloramphenicol (CHL), Ciprofloxacin (CIP), Streptomycin (S) und Gentamicin (CN) getestet (Tabelle 8). Der MHK-Test wurde nach den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2022) durchgeführt. Die in Tabelle 1 aufgeführten Antibiotika-Stocklösungen wurden entsprechend mit Müller-Hinton-Bouillon 2 (MHB2) verdünnt, sodass in einer 96-Well-Mikrotiterplatte eine zweifache Antibiotika-Verdünnungsreihe von 0,5 µg/ml bis 256 µg/ml (Ausnahme: CIP mit 0,25 µg/ml bis 128 µg/ml) vorlag. Übernachtskulturen (einprozentig in 20 ml LB-Bouillon; Inkubation bei 37 °C, 130 rpm) wurden bis zu einer Trübung von McFarland 0,5 verdünnt, und davon wurden jeweils 10 µl für die Inokulation jedes Wells der Mikrotiterplatte verwendet. Eine Wachstumskontrolle für jeden Stamm (MHB2 + 10 µl Inokulum) und eine Reinheitskontrolle (MHB2) wurden mitgeführt. *E. coli* ATCC25922 ist sensitiv gegenüber allen getesteten Antibiotika (Tabelle 5) und wurde als Kontrollstamm bei allen Testungen verwendet. Die Platten inkubierten bei 35 °C für 20 Stunden und wurden anschließend anhand der Trübung ausgewertet. Die Resistenzerhebung erfolgte in Doppelbestimmung. Die niedrigste Antibiotika-Konzentration, die zu einer Wachstumshemmung führte, wurde nach den Referenzwerten von CLSI (2022) ausgewertet, um die Stämme in resistent, intermediär oder sensitiv gegenüber dem getesteten Antibiotikum einzustufen. Da bei CLSI (2022) keine Referenzwerte für Streptomycin vorhanden sind, wurden die Werte des National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS, 2019) verwendet.

Tabelle 8: Für den minimalen Hemmkonzentrationstest verwendete Antibiotika mit den zugehörigen Abkürzungen sowie die Resistenzgrenzwerte nach CLSI (2022) und nach \*NARMS (2019).

Antibiotikaklassen (Subklasse)	Antibiotikum	Kürzel	Grenzwert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
			sensitiv	resistent
$\beta$ -Laktam-Antibiotika (Penicilline)	Ampicillin	AMP	$\leq 8$	$\geq 32$
$\beta$ -Laktam-Antibiotika (Cephalosporine)	Cefotaxim	CTX	$\leq 1$	$\geq 4$
Tetracycline	Tetracyclin	TE	$\leq 4$	$\geq 16$
Fenicole	Chloramphenicol	CHL	$\leq 8$	$\geq 32$
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	CIP	$\leq 0,25$	$\geq 1$
Aminoglykoside	Streptomycin*	S	$\leq 16$	$\geq 32$
Aminoglykoside	Gentamicin	CN	$\leq 4$	$\geq 16$

Zusätzlich wurde der MHK-Test, wie beschrieben, mit ausgewählten Konjugations-Spenderstämmen durchgeführt, um deren Resistenz gegen die Antibiotika Kanamycin und Rifampicin zu ermitteln.

### 2.2.2 Ganzgenomsequenzierung von Enterobakterien-Isolaten mittels MiSeq

Von den 22 in Tabelle 6 gelisteten Enterobakterien wurden 17 Isolate in einer vorangegangenen Studie gemeinsam mit weiteren *Enterobacteriaceae*-Isolaten mittels MiSeq sequenziert, die Sequenzierung beschrieben und die Sequenzdaten veröffentlicht (Cho et al., 2021). Die MiSeq-Sequenzierung der Stämme Cif11, Kva3, Kpneu8, Kpneu28 und Kpneu34 der vorangegangenen Arbeiten wird im Folgenden zusammengefasst:

Genomische DNA wurde von Kpneu28 und Kpneu34 aus 1,8 ml Übernachtskultur (CaSo-Bouillon; 37 °C) mit dem Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit isoliert. Die genomische DNA von Cif11, Kva3 und Kpneu8 wurde wie bei Cho et al. (2021) beschrieben isoliert.

Die Qualität der DNA wurde zunächst photometrisch geprüft. Dabei sollte der Absorptionskoeffizient 260/280 zwischen 1,7 und 1,9 liegen und der Koeffizient 260/230 größer als 1,2 sein. Bei nicht ausreichender Qualität wurde die DNA mit Magnetperlen aufgereinigt und die Qualität anschließend erneut photometrisch überprüft. Die DNA-Konzentration wurde anschließend mittels Qubit dsDNA BR Assay Kit am Qubit-Fluorometer oder mit dem gleichen Kit am Mikroplattenlesegerät gemessen. Die Proben wurden mit dem fokussierten Ultraschallgerät auf ca. 450 bp fragmentiert. Zur Ermittlung der durchschnittlichen Fragmentgröße wurden zufällig Proben ausgewählt und mittels Experion™ DNA 12K Analysis Kit auf dem Experion™ gemessen. Die DNA wurde mit dem TrueSeq Nano DNA LT Library Prep Kit nach Herstellerangaben für die Sequenzierung vorbereitet. Die fertige DNA-Bibliothek wurde auf dem MiSeq mit dem Reagent Kit V2 mit 2 x 251 Zyklen paired-end sequenziert.

Die MiSeq-Sequenzierdaten lagen nach der Sequenzierung als FASTQ-Dateien vor. Eine Qualitätskontrolle und eine Sortierung in gepaarte und ungepaarte Sequenzstücke (paired und unpaired reads) wurde mit Trimmomatic vorgenommen. Für die Hybridassemblierung wurden nur die gepaarten Sequenzstücke verwendet.

### 2.2.3 Ganzgenomsequenzierung von Enterobakterien-Isolaten mittels MinION

Die 22 Enterobakterien-Isolate, die nach der MiSeq-Sequenzierung weder geschlossene Chromosomen noch Plasmide zeigten, wurden mit dem MinION-Sequenziergerät sequenziert. Hierfür wurde zunächst genomische DNA aus einer Übernachtskultur gewonnen. Die Stämme wurden auf LB-Agar ausgestrichen und für eine Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 20 ml LB-Bouillon in 100-ml-Erlenmeyerkolben mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und bei 130 rpm und 37 °C für eine Nacht inkubiert. Aus 500 µl der Übernachtskultur wurde genomische DNA mit dem Genomic Micro AX Bacteria Gravity Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wird in diesem Kit über eine Säule durch Tropfen aufgereinigt und nicht durch Zentrifugation, wodurch nur geringe Scherkräfte wirken. Durch die geringe Scherung werden lange DNA-Fragmente erzeugt, die für die MinION-Sequenzierung gewünscht sind.

Für die MinION-Sequenzierung wurde die DNA-Qualität photometrisch bestimmt. Bei geringer Qualität wurde die DNA mit Magnetperlen aufgereinigt um 260/280-Absorptionskoeffizienten zwischen 1,7 und 1,9 und 260/230-Koeffizienten größer als 1,5 zu erhalten. Die DNA-Konzentration wurde mittels Qubit dsDNA BR Assay Kit am Qubit-Fluorometer oder mit dem gleichen Kit am Mikroplattenlesegerät gemessen. Um zu überprüfen, wie stark die DNA fragmentiert oder degradiert war, wurden einzelne Proben zufällig für die Bestimmung der Fragmentgrößen ausgewählt. Die Fragmentgröße wurde entweder mittels Experion™ DNA 12K Analysis Kit auf dem Experion™ gemessen, oder durch Auftrennung einer 15-µl-Probe mit 3 µl loading dye [6 x] auf einem Agarosegel [1 %] mit TBE [0,5 x] und 1 µl GelRed Nucleic Acid Stain für fünf Stunden bei 80 Volt und anschließender visueller Beurteilung der DNA-Qualität unter UV-Strahlung ermittelt.

Für die Sequenzierung wurde pro Probe 1 µg DNA mit den in Tabelle 9 aufgelisteten Kits entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Sequenzierung erfolgte mit dem MinION-Sequenziergerät MK1B. Da die Stämme zu unterschiedlichen Zeitpunkten sequenziert wurden und sich sowohl das Barcoding Kit als auch die Laufzeiten unterschieden, sind die Abweichungen in den jeweiligen Sequenzierläufen in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Für die Sequenzierung der Enterobakterien-Stämme mit dem MinION verwendete Flowcell und Kits.

Stämme	Ligationskit	Barcoding Kit	Flowcell	Laufzeit
Endy2, Kgr1, Kva3, Kpneu8	SQK-LSK 109	Native Barcoding Expansion Kit (EXP-NBD 103)	R9.4.1	16 h
Cigi1, Cipo4, Ciw5.1, Ciw5.2, Cipo13, Endy1, Enh11, Ec1115, Kpneu28, Kpneu34	SQK-LSK 109	Native Barcoding Expansion Kit (EXP-NBD 103)	R9.4.1	48 h
Cipa6.1, Cipa6.2, Cif11, Enb12, Ec1117, Ec1119, Ec1120, Kpneu4	SQK-LSK 109	Native Barcoding Expansion Kit (EXP-NBD 103; EXP-NBD 114)	R9.4.1	48 h



Die elektronischen Rohsignale (FAST5-Format) des MinION-Sequenziergeräts wurden durch die Guppy-Software (v. 3.4.4) mit GPU-Einstellung in Basen übersetzt (base calling) und in einem FASTQ-Format gespeichert. Mit Porechop oder der Guppy-Software (v. 3.4.4) wurden die Sequenzierdaten entsprechend ihren Adapter sortiert (demultiplexed) und die Adapter von den Sequenzen entfernt. Mit NanoFilt wurden die Daten gefiltert.

#### 2.2.4 Hybridassemblierung durch Kombination der MiSeq- und MinION-Sequenzierdaten

Die Sequenzierdaten der MiSeq- und MinION-Sequenzierung wurden mit dem Programm Unicycler bioinformatisch kombiniert. Die Assemblierung wurde mit konservativem Modus durchgeführt. Unicycler enthält die Software-Programme Pilon, SPAdes, Bowtie, SAMtools, Racon, Trimmomatic und Blast+ (Versionen und Literatur: siehe Tabelle 7). Die Unicycler-Ergebnisse zeigen, wenn ein Contig zirkulär vorliegt (Wick et al., 2017b). Die kompletten, zirkulären DNA-Sequenzen können dann ohne Informationsverlust gedreht werden (Wick et al., 2017b). Wenn Unicycler die Replikationsgene *dnaA* oder *repA* in einem zirkulären Contig detektiert, wird die Sequenz so rotiert, dass die zirkuläre DNA-Sequenz mit diesem Gen auf dem Leitstrang beginnt (Wick et al., 2017b). Nach der Assemblierung wurden die Daten als FASTA-Dateien gespeichert und bioinformatisch ausgewertet.

#### 2.2.5 Charakterisierung der Enterobakterien-Isolate und ihrer Plasmide – *in silico*

Für eine taxonomische Einordnung wurde eine digitale DNA:DNA-Hybridisierung (dDDH) mit den assemblierten Sequenzdaten der 22 Isolate und mit relevanten *Enterobacteriaceae*-Typstämmen durchgeführt. Hierfür wurde der Genome-to-Genome distance calculator der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) verwendet. Für die Auswertung wurde das Ergebnis der Formel 2 verwendet.

Die zirkularisierten Genom- und Plasmid-Sequenzen wurden mit unterschiedlichen Programmen ausgewertet, um sie näher zu charakterisieren und ihr Potenzial als mögliche Spender für Konjugationsexperimente besser einschätzen zu können. Die assemblierten chromosomalen Sequenzen sowie Plasmid-Sequenzen wurden zunächst auf der Plattform Phylogenetic Tree Building Service (PATRIC) und final mit der Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) annotiert. Die Programme ResFinder, PlasmidFinder und MobileElementFinder des Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>) wurden verwendet, um erworbene Antibiotikaresistenzgene, Plasmid-Replikon-Typen und mobile genetische Elemente in den Sequenzen nachzuweisen. ResFinder wurde mit den vorgegebenen Parametern genutzt, um Antibiotikaresistenzgene zu detektieren. Bei PlasmidFinder wurde die *Enterobacteriaceae*-Datenbank mit einer minimalen Identität von 80 % und einem Mindestdeckungsgrad von 60 % verwendet. Für kleine Plasmide (< 20 kbp) werden strengere Parameter vorgeschlagen (> 80 % minimale Identität und > 96 % Mindestdeckungsgrad) (Carattoli et al., 2014), die bei der Auswertung berücksichtigt wurden. MobileElementFinder wurde verwendet, um Insertionssequenzen und Transposons zu detektieren, die potenziell Antibiotikaresistenzgene zwischen Sequenzen mobilisieren können. Der IntegronFinder von der Galaxy Pasteur-Plattform wurde mit Standardparametern verwendet, um in den Sequenzen

ortsspezifische Integrons zu identifizieren. Mit MOB-suite wurde die Mobilität der Plasmide prognostiziert und das Wirtsspektrum der Plasmide (Gesamtrang) erfasst. Der Web-basierte Phagen-Identifizierungsservice PHASTER (PHAge Search Tool Enhanced Release) wurde verwendet, um Prophagensequenzen in extrachromosomalen DNA-Fragmenten zu identifizieren. Die Übereinstimmung zwischen zwei Plasmiden wurde mittels *pairwise alignment* (paarweisem Vergleich) mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus im Programm Geneious Prime® durchgeführt.

Für die Darstellung der Antibiotikaresistenzplasmide wurden die PGAP-Annotationsdaten verwendet. Anhand der Datenbank Clusters of Orthologous Genes wurden die Protein-kodierenden Sequenzen in Proteinfamilien eingeteilt und mit einer Farbkodierung versehen. Die Farbkodierung wurde anschließend angepasst, um Plasmid-spezifische Eigenschaften hervorzuheben. Im Folgenden wurden die Plasmide mit CGview visualisiert. Zusätzlich wurde eine 8.152 bp große Insertionssequenz und die umgebende chromosomale Region des Stammes Ciw5.1 mit dem Stamm Ciw5.2 mit Hilfe des Programms Easyfig verglichen und veranschaulicht.

### 2.2.6 Auswahl möglicher Spenderstämme für Konjugationsversuche

Durch die Sequenzierung und die anschließende bioinformatische Auswertung konnten Bakterienstämme identifiziert werden, die Plasmide besitzen. Bei diesen Stämmen wurde anhand festgelegter Kriterien geprüft, ob diese für Konjugationsversuche in Frage kommen. Dazu mussten folgende Kriterien für das Plasmid und den Stamm gegeben sein:

1. Potenziell konjugativ (Methode: MOB-suite; Kapitel 2.2.5)
2. Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen (Methode: ResFinder; Kapitel 2.2.5)
3. Identifizierung des IncF-Replikon-Typs (Methode: PlasmidFinder; Kapitel 2.2.5)
4. Identifizierung des Paarungsbildungssystems MPF<sub>F</sub> (Methode: MOB-suite; Kapitel 2.2.5)
5. Kein Wachstum der Spenderstämme bei Rifampicin [50 µg/ml] und Kanamycin [50 µg/ml] (Selektion für den Empfängerstamm CV601) (Methode: MHK-Test; Kapitel 2.2.1)

### 2.3 Konjugationsversuche mit dem Empfängerstamm *E. coli* CV601

Mit den Konjugationsversuchen sollte untersucht werden, ob und wie effektiv die charakterisierten Antibiotikaresistenzplasmide in den Empfängerstamm *E. coli* CV601 transferieren können. Dies wurde sowohl im Rahmen eines Filtermatings *in vitro* getestet (Versuch A) als auch auf pflanzlichen Lebensmitteln (Versuch B) (Abbildung 2). Für das Filtermating wurden Spender- und Empfängerstämmen gemeinsam auf einem Membranfilter inkubiert, der auf einer Nähragarplatte platziert war. Ein festes Medium wurde gewählt, da Konjugation auch auf Lebensmitteln (Mischsalat und Sprossen) getestet wurde, was einem festen Untergrund entspricht.

Das Nährstoffangebot, die Konjugationszeit und -temperatur wurden variiert und entsprechende Unterschiede in den Transferraten ermittelt (Kapitel 2.3.4). Die Konjugationstemperaturen wurden so gewählt, dass die optimale Wachstumstemperatur der Enterobakterien (37 °C), die Raumtemperatur (21 °C) und die obere Grenze der Kühlschranktemperatur (10 °C) abgebildet wurden. Der Empfängerstamm *E. coli* CV601 ist ein K12-Derivat und wurde gentechnisch verändert (Tabelle 5) (Heuer et al., 2002). Der Stamm ist resistent gegen Kanamycin und Rifampicin und besitzt das *gfp*-Gen (Gen für grün fluoreszierendes Protein) der Qualle *Aequorea victoria* (Crameri et al., 1996; Suarez et al., 1997). Bei Anregung des grün fluoreszierenden Proteins mit UV-Licht entsteht eine grüne Fluoreszenz, wodurch der Stamm gut zu identifizieren und von anderen Kolonien auf einer Agarplatte zu unterscheiden ist.

Weiterhin wurde der Empfängerstamm *E. coli* CV601 in Konjugationsversuchen eingesetzt, um Plasmide aus unbekanntem Spenderstämmen von Sprossenproben aufzunehmen (exogene Plasmid-Isolierung) (Blau et al., 2020). Die anschließende Sequenzierung der Transkonjuganten sollte zeigen, welche übertragbaren Plasmide von dem Spenderstamm aufgenommen wurden.






	Spender	Empfänger	Konjugationsbedingungen			
Bekannte Spender	Konjugationsvorversuche	Ec1115, Ec1117, Kpneu28	CV601		4 °C, 21 °C, 37 °C Filtermating auf BH I-G lucose-Agar	Kapitel 2.3.3
	Konjugationsversuche A	Kpneu28	CV601		10 °C, 21 °C, 37 °C Filtermating auf LB- und Salat-Agar	Kapitel 2.3.4
	Konjugationsversuche B	Kpneu28	CV601		10 °C, 37 °C Mating auf Salat bzw. Sprossen	Kapitel 2.3.5
Unbekannte Spender	Konjugationsversuche C	Bakterien auf Sprossen	CV601		10 °C, 37 °C Mating auf Sprossen	Kapitel 2.3.6
	Konjugationsversuche D	Von Sprossen angereicherte Bakterien	CV601		10 °C, 37 °C Filtermating auf LB-Agar	Kapitel 2.3.6

Abbildung 2: Übersicht über die durchgeführten Konjugationsversuche.

### 2.3.1 Nachweis von Shigatoxin-Genen mittels *real time* PCR

Da aus Gründen der Risikominimierung im Rahmen der Gentechnikenarbeiten im Labor eine Überschreitung der Sicherheitsstufe S2 ausgeschlossen werden sollte, wurde eine *real time* PCR zur Detektion von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) durchgeführt. Mit der *real time* PCR nach Pavlovic et al. (2010) können die STEC-spezifischen Virulenzgene Shigatoxin 1 (*stx1*), Shigatoxin 2 (*stx2*) sowie Intimin (*eae*) und ihre Genvarianten nachgewiesen werden.

Dafür wurden von jedem Frischeprodukt 25 g einer repräsentativen Mischung von allen in dem Produkt enthaltenen Bestandteilen aseptisch in einen sterilen Stomacherbeutel gegeben. Anschließend wurden 225 ml gepuffertes Peptonwasser hinzugegeben und die Probe in einem Stomacher für zwei Minuten auf Stufe 3 homogenisiert. Nach einer 20- bis 24-stündigen aeroben Anreicherung bei 37 °C im Stomacherbeutel und erneuter Homogenisierung bei identischen Bedingungen, wurde 1 ml Probe entnommen. Die Probe wurde zentrifugiert (14.000g, 5 min) und das Pellet mit 500 µl Tris [10 mM] gewaschen und anschließend mit 300 µl Tris/EDTA-Puffer gelöst. Einer thermischen Lyse bei 95 °C für 15 Minuten folgte eine weitere Zentrifugation bei 14.000g für drei Minuten.

Für die Detektion der *stx1*-, *stx2*- und *eae*-Gene sowie deren Varianten sind fünf Sonden und sieben Primerpaare notwendig. Aus den in Tabelle 10 aufgelisteten Primern und Sonden wurde für jedes Zielgen (*stx1*, *stx2*, *eae*) jeweils ein Primermix vorbereitet. Hierzu wurden die zu einem Zielgen gehörigen Primer und Sonden gemischt und mit nukleasefreiem Wasser bis zu einer Konzentration von 4 µM verdünnt.

Tabelle 10: Primersequenzen für die *real time* PCR zur Detektion der Shigatoxin-Gene *stx1* und *stx2* und des Intimin Virulenzgens *eae* (Sharma et al., 1999; Pavlovic et al., 2010). F = Forward; R = Reverse; SO = Sonde.

Zielgen	Primer-/Sonden- Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Amplifikatlänge
<i>stx1</i>	VS1 (F)	CATAGTGGAACTCACGACGCAGT	87 bp
	VS2 (R)	TTTGCCGAAAACGTAAAGCTTCA	
	VS3 (SO)	FAM-TGTGGCAAGAGCGATGTTACGGTTTG-BHQ1	
<i>stx2</i>	stx2_for4 (F)	GTTTCCATGACAACGGACAGCAG	114 bp
	stx2_rev2 (R)	GTGACGACTGATTTGCATTCCGG	
	stx2_rev2f (R)	ACGCCAATCTGCATCCCT	
	stx2_t_p1(SO)	Texas Red-CAACGTGTCGACGCGCTGGAAC-BHQ2	
	stx2f_t_p2(SO)	Texas Red-ACAGCGAATCGCAGATCTGGAAC-BHQ2	
<i>eae</i>	eae_t_for1 (F)	TCGTGTCTGCTAAAACCGCGGAG	107 bp
	eae_t_rev1 (R)	TTGTCTTATCAGCCTTAATCTCAG	
	eae_t_p1 (SO)	HEX-TTGTTGATCAAACCAAGGCCAGCA-BHQ1	
	eae_t_p2 (SO)	HEX-TTGTTGATCAAAGCAAGGCTAGTA-BHQ1	

Die STEC *real time* PCR wurde pro Produkt im technischen Triplikate durchgeführt, indem jeweils 5 µl des Hitzelysats als Template in der PCR eingesetzt wurden (Tabelle 11). Negativkontrollen mit 5 µl nukleasefreiem Wasser und eine Positivkontrolle mit 5 µl DNA des Stammes *E. coli* O157:H7 (Tabelle 5) wurden stets mitgeführt.

Tabelle 11: PCR-Pipettierschema für die *real time* PCR zum Nachweis von Shigatoxin-Genen.

Menge	Bestandteil
12,5 µl	Multiplex iQ Power Mix [2x]
1,25 µl	Primermix <i>stx1</i>
1,25 µl	Primermix <i>stx2</i>
1,25 µl	Primermix <i>eae</i>
5 µl	Template
3,75 µl	Nukleasefreies Wasser

Für die *real time* PCR wurde das CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System unter den in Tabelle 12 aufgeführten Bedingungen verwendet.

Tabelle 12: Amplifikationsbedingungen für den Nachweis von Shigatoxin-Genen.

Temperatur	Zeit	Schritt
95 °C	7 min	Initiale Denaturierung
95 °C	5 s	Denaturierung
58 °C	30 s	40 Zyklen Annealing und Elongation Fluoreszenzdetektion

Die Auswertung erfolgte mit der Software CFX Maestro. Bei Nachweis eines der Shigatoxin-Gene (*stx1*, *stx2*) in einer Probe wurde das Lebensmittel nicht für einen Konjugationsversuch verwendet.

### 2.3.2 Identitätsprüfung der Transkonjuganten mittels PCR und Stammhaltung

Nach Beendigung der Konjugationen wurden Transkonjuganten auf antibiotikahaltigem Agar selektiert. Um zu prüfen, ob es sich bei den Kolonien auf dem Selektivagar um Transkonjuganten handelt, wurde eine PCR durchgeführt. Für die Konjugationsversuche mit den Spendern Ec1115, Ec1117 und Kpneu28 wurde für die Identifizierung der Transkonjuganten eine Multiplex-PCR mit jeweils drei Primerpaaren durchgeführt, die das konjugative Plasmid sowie die Empfänger- und Spenderchromosomen nachweist (Tabelle 13). Bei Konjugationen mit unbekanntem Spender (exogene Plasmid-Isolierung) wurde eine Simplex-PCR durchgeführt, die das Empfängerchromosom targetiert.

Zur Etablierung eines Detektionssystems für die Plasmide wurde in den annotierten Daten (PATRIC) nach Genen gesucht, die Replikationsproteine kodieren. Für pEC1115\_1 und pEC1117\_1 wurde die IncFIB-Replikationsregion und für pKPNEU28\_2 die IncFII-Replikationsregion als Zielregion für die Primer gewählt. Für den Empfängerstamm wurde die Genomsequenz von *E. coli* CV601 (Accession-Number bei NCBI: CP043213.1) als Vorlage für die Primer-Entwicklung genutzt und *gfp* als Zielregion gewählt. Für die Chromosomen der Spenderstämme mussten Zielregionen gewählt werden, die im Empfängerstamm nicht vorkamen. Mauve in dem Programm MagAlign Pro wurde mit voreingestellten Parametern verwendet, um Unterschiede zwischen Empfänger- und Spenderchromosomen zu identifizieren. Die PATRIC-Annotation zeigte, dass bei Kpneu28 und Ec1115 das „Iron siderophore ABC transporter“-kodierende Gen *ybtP* und bei Ec1117 das „Phosphomannomutase“-kodierende Gen als mögliche differenzierende Zielregionen für die Primer dienen könnten. Primer-BLAST wurde

verwendet, um Primerpaare in der gewünschten Region und Amplifikatlänge zu generieren. Anschließend wurden die Primerpaare mit SeqBuilder Pro optimiert.

Anhand des Bandenmusters der etablierten Multiplex-PCR (drei Primerpaare) sollen somit Transkonjuganten, Mischkolonien, Spender- und Empfänger-Stämme eindeutig identifiziert werden. Bei den Spenderstämmen Ec1115, Ec1117 und Kpneu28 waren somit zwei Banden (Plasmid-Bande und Spenderchromosom-Bande) zu erwarten, bei dem Empfängerstamm *E. coli* CV601 hingegen nur eine Bande (Empfängerchromosom-Bande). Bei einem Transkonjuganten sollte die Multiplex-PCR zwei Banden (Plasmid-Bande und Empfängerchromosom-Bande) ergeben.

Tabelle 13: PCR-Primersequenzen für die Identitätsüberprüfung möglicher Transkonjuganten. Primerpaare zur Detektion von chromosomaler DNA des Empfängerstammes CV601, der Spenderstämmen Ec1115, Ec1117 und Kpneu28 sowie der Plasmidsequenzen pEC1115\_1, pEC1117\_1 und pKPNEU28\_2. F = Forward; R = Reverse.

Primerbezeichnung	Zielregion / Zielgen	Sequenz (5'-3')	Amplifikatlänge
pKPNEU28_2 (F)	IncFII-Replikationsregion	CGGACGCTTCAGGGGAGATA	248 bp
pKPNEU28_2 (R)		GCCACGTTGACGCCAGGAA	
pEC1115/7_1 (F)	IncFIB-Replikationsregion	CGCTGGATGACCTGGAAAAA	181 bp
pEC1115/7_1 (R)		TAAGGGACAGGCAGATGGCA	
Kpneu28 (F)	<i>ybtP</i>	GTCGTTTTTGGCGTCCGTAA	410 bp
Kpneu28 (R)		CGCTGCCCATTTGCTGTAA	
Ec1115 (F)	<i>ybtP</i>	AATTCTCAGAACGCCACCCT	434 bp
Ec1115 (R)		CGCTGCCCATTTGCTGTAA	
Ec1117 (F)	Phosphomannomutase-kodierendes Gen	CCGCTGGAAGTGCTGGAGAT	418 bp
Ec1117 (R)		TTCATAGGATTGTGGCTCGCT	
CV601 (F)	<i>gfp</i>	AGTGCCATGCCCGAAGGTTA	779 bp
CV601 (R)		AGCCATCATGCCGTTCAAAGT	

Die Transkonjuganten wurden auf LB-Agarplatten mit Antibiotika (LB+KA/RD/TE-Agarplatten) selektiert. Mit einer 1- $\mu$ l-Impföse wurden die Transkonjuganten von den Selektivplatten gepickt und durch einen kurzen Ausstrich auf einer LB+KA/RD/TE-Agarplatte gesichert. Die Anzahl an Kolonien, die pro Platte überprüft wurden, ist den Kapiteln 2.3.3, 2.3.4 und 2.3.5 zu entnehmen. Nach einer Inkubation bei 37 °C für eine Nacht lagerten die gesicherten Transkonjuganten bei 4 °C, bis die Multiplex-PCR-Ergebnisse bestätigten, dass es sich um Transkonjuganten handelte.

In 50  $\mu$ l sterilem Reinstwasser wurde jeweils eine Kolonie der Transkonjuganten gelöst und ein Hitzaufschluss durchgeführt (98 °C für 10 min, gefolgt von -20 °C für 20 min). 2  $\mu$ l des Hitzaufschlusses wurden als Matrize für die PCR verwendet (Tabelle 14). Eingesetzt wurden spezifische Primer für den Empfängerstamm CV601, für den jeweiligen Spenderstamm (Kpneu28, Ec1115, Ec1117) und für das konjugative Resistenzplasmid des jeweiligen Spenderstammes.

Tabelle 14: PCR-Pipettierschema für die Multiplex-PCR zur Identitätsprüfung von Transkonjuganten. F = Forward; R = Reverse.

Menge	Bestandteil	Primerkombination zur Identifizierung von Transkonjuganten der Spender		
		Kpneu28	Ec1115	Ec1117
0,25 µl	Primer [10 pmol/µl]	pKPNEU28_2 (F)	pEC1115/7_1 (F)	pEC1115/7_1 (F)
0,25 µl	Primer [10 pmol/µl]	pKPNEU28_2 (R)	pEC1115/7_1 (R)	pEC1115/7_1 (R)
0,25 µl	Primer [10 pmol/µl]	Kpneu28 (F)	Ec1115 (F)	Ec1117 (F)
0,25 µl	Primer [10 pmol/µl]	Kpneu28 (R)	Ec1115 (R)	Ec1117 (R)
0,25 µl	Primer [10 pmol/µl]	CV601 (F)	CV601 (F)	CV601 (F)
0,25 µl	Primer [10 pmol/µl]	CV601 (R)	CV601 (R)	CV601 (R)
2 µl	Hitze-Lysat			
6,25 µl	iTaq™ Universal SYBR® Green			
2,75 µl	Nukleasefreies Wasser			

Zusätzlich wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle mit 2 µl nukleasefreiem Wasser sowie eine Positivkontrolle mit 1,5 µl nukleasefreiem Wasser und 0,25 µl Spender- und Empfänger-DNA mitgeführt. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Bei der exogenen Plasmid-Isolierung (Versuche C und D; Kapitel 2.3.6) war für die Selektion von möglichen Transkonjuganten entscheidend, dass der Empfängerstamm gegen Kanamycin und Rifampicin resistent ist und das *gfp*-Gen besitzt. Da bei diesen Versuchen die Spenderstämme und Plasmide unbekannt waren, wurde mit einer Simplex-PCR lediglich überprüft, ob es sich um den Empfängerstamm handelte.

Wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben, wurden bis zu 20 Kolonien pro Versuch gesichert und zweimal auf Selektivagar (LB+KA/RD/CTX- bzw. LB+KA/RD/TE-Agarplatten) ausgestrichen, bis visuelle Reinkulturen erreicht waren. Eine Kolonie wurde gepickt und in 50 µl sterilem Reinstwasser gelöst. Nach dem Hitzaufschluss (98 °C für 10 min, gefolgt von -20 °C für 20 min) wurden 2 µl Lysat als Matrize für die PCR verwendet (Tabelle 15). Das Primerpaar für den Nachweis des *gfp*-Gens des Empfängerstammes ist in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 15: PCR-Pipettierschema zur Identitätsprüfung der durch exogene Plasmid-Isolierung erhaltenen Transkonjuganten. F = Forward; R = Reverse.

Menge	Bestandteil
0,25 µl	Primer [10 pmol/µl] CV601 (F)
0,25 µl	Primer [10 pmol/µl] CV601 (R)
2 µl	Hitze-Lysat
5 µl	iTaq™ Universal SYBR® Green
2,5 µl	Nukleasefreies Wasser

Bei jeder PCR wurden eine Negativkontrolle mit 2 µl nukleasefreiem Wasser sowie eine Positivkontrolle mit 0,25 µl DNA von *E. coli* CV601 und 1,75 µl nukleasefreiem Wasser mitgeführt. Das PCR-Programm ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: PCR-Bedingungen für den Nachweis und die Identitätsprüfung möglicher Transkonjuganten.

Temperatur	Zeit		Schritt
95 °C	10 min		Initiale Denaturierung
95 °C	30 s	34 Zyklen	Denaturierung
60 °C	30 s		Anlagerung
72 °C	30 s		Elongation
72 °C	5 min		Finale Elongation

Zur Überprüfung der PCR wurden 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl loading dye [6 x] gemischt und auf ein Agarosegel [1,5 %] mit TAE [1 x] und 1 µl GelRed Nucleic Acid Stain aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese bei 100 Volt für 75 Minuten aufgetrennt. Der GeneRuler DNA Ladder Mix wurde als Größenstandard mitgeführt. Anschließend wurde die unter UV-Licht sichtbare DNA fotodokumentiert.

Nach der Bestätigung, dass es sich bei dem jeweiligen Isolat der exogenen Plasmid-Isolierung um den *E. coli*-Stamm CV601 handelte, wurden bis zu zehn Transkonjuganten pro Versuch nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und in die Stammsammlung aufgenommen. Die Transkonjuganten wurden auf einer Selektivagarplatte (LB+KA/RD/TE-Agar) ausgestrichen und bei 37 °C für eine Nacht inkubiert. 20 ml LB-Bouillon in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben wurden mit einer Kolonie beimpft und für eine weitere Nacht bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. In einem Cryoröhrchen wurden 800 µl Übernachtskultur mit 200 µl Glycerin [98 %] gemischt und bei -80 °C eingefroren.

### 2.3.3 Konjugationsvorversuche

Die Konjugationsvorversuche dienten mehreren Zwecken. Zum einen, um festzustellen, ob Konjugation mit den drei ausgewählten Spenderstämmen Ec1115, Ec1117 und Kpneu28 möglich ist. Zum anderen sollte getestet werden, welche Bedingungen bei den Hauptversuchen verwendet werden können. Schließlich sollte festgestellt werden, ob der Identitätsnachweis der Transkonjuganten mittels Multiplex-PCR funktioniert.

Die Konjugationsversuche wurden ähnlich durchgeführt, wie bei Blau et al. (2018) beschrieben. Die Spenderstämmen und der Empfängerstamm *E. coli* CV601 wurden jeweils in 20 ml LB-Bouillon einprozentig angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm für sieben Stunden inkubiert. Anschließend wurde aus der 7-h-Kultur der Spenderstämmen einprozentig in 20 ml LB-Bouillon mit Tetracyclin [50 µg/ml] überimpft. Ebenso wurde aus der 7-h-Kultur des Empfängerstammes *E. coli* CV601 einprozentig in 20 ml LB-Bouillon mit Kanamycin [50 µg/ml] und Rifampicin [50 µg/ml] überimpft. Die Kulturen inkubierten für eine Nacht bei 37 °C und 130 rpm. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gewonnen, das Zellpellet zweimal mit Tris [10 mM] gewaschen und das Pellet mit BHI-Glucose-Bouillon auf das Ausgangsvolumen zurückverdünnt. Die gewaschenen Übernachtskulturen wurden 1:10 mit BHI-Glucose-Bouillon verdünnt und jeweils 500 µl der verdünnten Spender- und der Empfängerkultur gemischt, sodass ein Volumenverhältnis von 1:1 des Spenders und Empfängers erreicht wurde. Nach einer Homogenisierung mit dem Vortex-Gerät wurden die Zellen zentrifugiert (5.000g, 5 min). Das Pellet wurde mit 50 µl BHI-Glucose-Bouillon gelöst und auf einen Membranfilter gegeben, welcher auf einer BHI-Glucose-Agarplatte lag. Die Platten wurden bei verschiedenen Temperaturen



unterschiedlich lange inkubiert (Tabelle 17). Alle verwendeten Selektivagarplatten wurden auf ihre Selektivität geprüft, indem je ein Tropfen der gewaschenen Übernachtkultur der Spenderstämme und des Empfängerstammes auf einem Drittel einer Selektivagarplatte pipettiert und grob mit einer 10- $\mu$ l-Impföse verteilt wurde. Die Platten inkubierten bei 37 °C für eine Nacht.

Tabelle 17: Inkubationszeiten und -temperaturen für die Konjugationsvorversuche (Filtermating). Die für die Sequenzierung ausgewählten Transkonjuganten sind ebenfalls aufgelistet. Die Spender sind in der Konjugationsbezeichnung wie folgt verschlüsselt: A = Kpneu28; C = Ec1115, D = Ec1117.

Konjugation	Konjugationsbedingung	Sequenzierte Transkonjuganten
A02 I	37 °C, 20 h	A02/3
A02 II	37 °C, 20 h	A02/27
A02 III	37 °C, 20 h	A02/50
A03	37 °C, 1 h	A03/1
A04	37 °C, 2 h	A04/1
A05	37 °C, 3 h	A05/1
A06	37 °C, 4 h	A06/2
A07	37 °C, 5 h	A07/1
A08	21°C, 10 d	A08/3; A08/9
A09	4 °C, 7 d	
C02	37 °C, 1 h	
C03	37 °C, 2 h	C03/1
C04	37 °C, 3 h	C04/1
C05	37 °C, 4 h	C05/1; C05/3
C06	37 °C, 5 h	C06/1
C07	21 °C, 10 d	C07/1; C07/3
C08 I	37 °C, 20 h	C08/4; C08/5
C08 II	37 °C, 20 h	C08/15; C08/21
C08 III	37 °C, 20 h	C08/47; C08/102
C09	4 °C, 7 d	
D03	37 °C, 1 h	
D04	37 °C, 2 h	
D05	37 °C, 3 h	
D06	37 °C, 4 h	
D07	37 °C, 5 h	
D08	21 °C, 10 d	
D09	37 °C, 20 h	

Um die Konjugation zu beenden, wurden die Membranfilter von der Agarplatte in eine 50-ml-Schraubrohre überführt und die Bakterien mit 1 ml NaCl-Lösung [0,85 %] durch einminütiges Vortexen gelöst. Von den gelösten Bakterienzellen wurden Verdünnungsreihen im Verhältnis von 1:10 in Ringerlösung (Viertelstark) für die Detektion der Transkonjuganten hergestellt. Für die Versuche mit Inkubationszeiten von einer, zwei, drei, vier und fünf Stunden sowie von zehn Tagen wurden jeweils 100  $\mu$ l der unverdünnten Probe und der entsprechenden Verdünnung einfach (Unikat) auf LB+KA/RD/TE-Agar verteilt. Für die restlichen Konjugationsversuche wurden jeweils 100  $\mu$ l von den unverdünnten Proben bzw. von den entsprechenden Verdünnungen im Triplikat auf LB+KA/RD/TE-Agar verteilt. Die Platten inkubierten bei 37 °C für ein bis drei Tage. Alle Kolonien einer Selektivagarplatte für die Detektion der Transkonjuganten wurden bis zu einer Gesamtkoloniezahl von maximal 300 Kolonien pro Platte ausgezählt. Da es sich um Vorversuche handelte, wurden auch Platten mit weniger als zehn Kolonien gewertet. Von jedem Konjugationsversuch, bei dem Transkonjuganten

detektiert wurden, wurde eine Platte eines Triplikats bzw. eine Platte eines Unikats für die Überprüfung der Identität ausgewählt. Alle Transkonjuganten dieser Platte wurden gepickt, auf einer LB+KA/RD/TE-Agarplatte gesichert und deren Identität mittels Multiplex-PCR überprüft (Kapitel 2.3.2).

Bei Transkonjuganten mehrerer Konjugationsversuche mit dem Spender Ec1115 zeigte die Multiplex-PCR teilweise keine Bande für das Plasmid pEC1115\_1. Mit einer weiteren PCR wurde deshalb überprüft, ob das *tet(A)*-Gen, welches auf dem Plasmid pEC1115\_1 lokalisiert ist und eine phänotypische Tetracyclin-Resistenz vermittelt, in den Empfänger übertragen wurde. Hierfür wurden Stämme mit und ohne Plasmid-Bande bei der Multiplex-PCR ausgewählt (Tabelle 18).

Tabelle 18: Transkonjuganten des Spenderstammes Ec1115, die für die *tet(A)*-PCR ausgewählt wurden.

Konjugationsversuche	Transkonjugant ohne Plasmid-Bande bei der Multiplex-PCR	Transkonjugant mit Plasmid-Bande bei der Multiplex-PCR
C05	C05/3	
C07	C07/1	
C08 I	C08/1, C08/3, C08/5, C08/6, C08/10	
C08 II	C08/15, C08/19, C08/22, C08/31, C08/37	
C08 III	C08/42, C08/43, C08/45, C08/66, C08/89, C08/95, C08/102, C08/112	C08/49, C08/67, C08/69, C08/70

Der PCR-Ansatz, der für den Nachweis der Tetracyclin-Resistenz verwendet wurde, ist in Tabelle 19 gezeigt. Die verwendeten *tet(A)*-Primer (*tet(A)* (F) 5'-GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC; *tet(A)* (R) 5'-CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG) amplifizieren ein 210 bp langes Fragment von *tet(A)* (Ng et al., 2001).

Tabelle 19: PCR-Ansatz für die Amplifikation des Tetracyclin-Resistenzgens *tet(A)*. Als PCR-Template wurde jeweils eine Kolonie eines Transkonjuganten verwendet. F = Forward; R = Reverse.

Menge	Bestandteil
1,25 µl	Primer [10 pmol/µl] <i>tet(A)</i> (F)
1,25 µl	Primer [10 pmol/µl] <i>tet(A)</i> (R)
2,5 µl	10 x PCR-Buffer E mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> mit MgCl <sub>2</sub>
3 µl	dNTP Mix
0,15 µl	Taq DNA-Polymerase [5 U/µl]
16,85 µl	Nukleasefreies Wasser

Für die Amplifikation wurde jeweils eine Kolonie eines Transkonjuganten aus Tabelle 18, bzw. eine Kolonie des Spenders *E. coli* Ec1115 und des Empfängers *E. coli* CV601 verwendet. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 20 gezeigt.

Tabelle 20: PCR-Bedingungen für die Amplifikation des *tet(A)*-Resistenzgens.

Temperatur	Zeit	Schritt
95 °C	10 min	Initiale Denaturierung
95 °C	30 s	Denaturierung
56 °C	30 s	32 Zyklen Anlagerung
72 °C	30 s	Elongation
72 °C	5 min	Finale Elongation

Der Erfolg der PCR wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl loading dye [6 x] gemischt und auf ein Agarosegel [1,5 %] mit TAE [1 x] und 1 µl GelRed Nucleic Acid Stain aufgetragen. Der GeneRuler DNA Ladder Mix wurde als Größenstandard mitgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese bei 100 Volt für 75 Minuten aufgetrennt. Die unter UV-Licht sichtbare DNA wurde fotodokumentiert.

Da bei den Transkonjuganten des Spenderstammes Ec1115 die Multiplex-PCR nicht immer erfolgreich war, wurden einige Isolate für die Ganzgenomsequenzierung ausgewählt. Dafür wurden Transkonjuganten mit nachgewiesener und nicht nachgewiesener IncFIB-Replikationsregion des Spenders Ec1115 und weitere zehn Transkonjuganten des Spenders Kpneu28 sequenziert (Tabelle 17). Die Stämme C05/3, C07/1, C08/5, C08/15 und C08/102 sind Transkonjuganten, bei denen mit der Multiplex-PCR kein Plasmid nachweisbar war. Die MiSeq- und MinION-Sequenzierung und die anschließende bioinformatische Assemblierung der Sequenzierdaten ist in Kapitel 2.3.8 beschrieben.

#### 2.3.4 Konjugationsversuche A: *in vitro*-Konjugation mit den Stämmen Kpneu28 und CV601

Mit den Versuchen wurde der Einfluss unterschiedlicher Nährstoffangebote sowie der Konjugationsdauer und der -temperatur auf die Transferraten des Resistenzplasmids untersucht. Hierfür wurde Filtermating mit dem Spender Kpneu28 und dem Empfänger CV601 genutzt.

Der Spender- und Empfängerstamm wurde jeweils einprozentig in 20 ml LB-Bouillon angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm für sieben Stunden inkubiert. Von der 7-h-Kultur von Kpneu28 wurde einprozentig in LB-Bouillon mit Tetracyclin [50 µg/ml] und von der 7-h-Kultur von CV601 einprozentig in 20 ml LB-Bouillon mit Kanamycin [50 µg/ml] und Rifampicin [50 µg/ml] überimpft. Die Kulturen inkubierten bei 37 °C und 130 rpm für eine Nacht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5.000g für 5 min) gewonnen, die Pellets zweimal mit Tris [10 mM] gewaschen und mit Ringerlösung (Viertelstark) auf das Ausgangsvolumen verdünnt.

Die gewaschenen Übernachtskulturen wurden 1:10 mit Ringerlösung (Viertelstark) verdünnt. Jeweils 500 µl der verdünnten Proben von Kpneu28 und CV601 wurden durch Vortexen homogenisiert. Das durch fünfminütige Zentrifugation bei 5.000g gewonnene Zellpellet wurde in 50 µl Ringerlösung (Viertelstark) aufgenommen. In die Mitte der Agarplatte (LB- oder Salat-Agar) wurde ein steriler Membranfilter platziert und die 50 µl Zellsuspension darauf verteilt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei unterschiedlicher Inkubationsdauer und -temperatur (Tabelle 21).

Die Keimzahlen der jeweiligen Übernachtskulturen von Kpneu28 und CV601 wurden ermittelt, indem von den gewaschenen Reinkulturen eine Verdünnungsreihe im Verhältnis von 1:10 in Ringerlösung (Viertelstark) hergestellt wurde. Jeweils 10 µl der 10<sup>-4</sup>- bis 10<sup>-7</sup>-Verdünnungen wurden auf einem Sechstel einer Selektivagarplatte im technischen Triplikat ausplattiert. Für Kpneu28 wurde LB+TE-Agar und für CV601 LB+KA/RD-Agar als Selektivagar verwendet. Die Platten inkubierten bei 37 °C für 24 Stunden. Anschließend wurden die Kolonien auf den auswertbaren Sechsteln gezählt. Der Mittelwert der auszählbaren Verdünnungsstufen wurde errechnet und mit der entsprechenden Verdünnungsstufe verrechnet, um "Koloniebildende Einheiten pro Milliliter" (KbE/ml) zu erhalten. Jede Selektivagarplatte (LB+TE, LB+KA/RD, LB+KA/RD/TE) wurde auf ihre Selektivität geprüft, indem je

ein Tropfen unverdünnter Übernachtskultur von CV601 und von Kpneu28 auf je ein Drittel der Agarplatte getropft und verteilt wurde. Um zu testen, ob die Agarplatte steril ist, blieb ein Drittel der Agarplatte frei. Die Platten inkubierten bei 37 °C für 24 Stunden und wurden anschließend visuell ausgewertet.

Tabelle 21: Konjugationsversuche mit Spender Kpneu28 (A) und Empfänger CV601 sowie die jeweiligen Versuchsbedingungen. I und II sind getrennte Konjugationen am selben Tag mit identischen Bedingungen. LB = Lysogeny broth.

Konjugation	Konjugationsbedingungen	Konjugationsmedium	Keimzahl der Übernachtskulturen		Selektive Anreicherung
			Kpneu28 [KbE/ml]	CV601 [KbE/ml]	
A26 I, II	37 °C, 22 h	LB-Agar	4,6*10 <sup>9</sup>	4,1*10 <sup>8</sup>	Keine Anreicherung
A65 I, II	37 °C, 22 h	LB-Agar	5,6*10 <sup>9</sup>	1,5*10 <sup>9</sup>	Keine Anreicherung
A27 I, II	37 °C, 22 h	Salat-Agar	4,6*10 <sup>9</sup>	4,1*10 <sup>8</sup>	Keine Anreicherung
A64 I, II	37 °C, 22 h	Salat-Agar	5,6*10 <sup>9</sup>	1,5*10 <sup>9</sup>	Keine Anreicherung
A28 I, II	21 °C, 4 d	LB-Agar	4,6*10 <sup>9</sup>	4,1*10 <sup>8</sup>	Keine Anreicherung
A42 I, II	21 °C, 4 d	LB-Agar	2,9*10 <sup>9</sup>	1,8*10 <sup>9</sup>	Keine Anreicherung
A29 I, II	21 °C, 4 d	Salat-Agar	4,6*10 <sup>9</sup>	4,1*10 <sup>8</sup>	Keine Anreicherung
A60 I, II	21 °C, 4 d	Salat-Agar	4,2*10 <sup>9</sup>	3,6*10 <sup>9</sup>	Keine Anreicherung
A30 I, II	10 °C, 4 d	LB-Agar	4,6*10 <sup>9</sup>	4,1*10 <sup>8</sup>	Keine Anreicherung
A44 I, II	10 °C, 4 d	LB-Agar	2,9*10 <sup>9</sup>	1,8*10 <sup>9</sup>	Keine Anreicherung
A31 I, II	10 °C, 4 d	Salat-Agar	4,6*10 <sup>9</sup>	4,1*10 <sup>8</sup>	Keine Anreicherung
A45 I, II	10 °C, 4 d	Salat-Agar	2,9*10 <sup>9</sup>	1,8*10 <sup>9</sup>	Keine Anreicherung
A34 I, II	10 °C, 4 d	LB-Agar	4,6*10 <sup>9</sup>	4,1*10 <sup>8</sup>	Mit Anreicherung
A46 I, II	10 °C, 4 d	LB-Agar	2,9*10 <sup>9</sup>	1,8*10 <sup>9</sup>	Mit Anreicherung
A54 I, II	10 °C, 4 d	LB-Agar	5,2*10 <sup>9</sup>	3,0*10 <sup>9</sup>	Mit Anreicherung
A56 I, II	10 °C, 4 d	LB-Agar	3,1*10 <sup>9</sup>	2,5*10 <sup>9</sup>	Mit Anreicherung
A58 I, II	10 °C, 4 d	LB-Agar	3,1*10 <sup>9</sup>	2,5*10 <sup>9</sup>	Mit Anreicherung
A35 I, II	10 °C, 4 d	Salat-Agar	4,6*10 <sup>9</sup>	4,1*10 <sup>8</sup>	Mit Anreicherung
A47 I, II	10 °C, 4 d	Salat-Agar	2,9*10 <sup>9</sup>	1,8*10 <sup>9</sup>	Mit Anreicherung
A55 I, II	10 °C, 4 d	Salat-Agar	5,2*10 <sup>9</sup>	3,0*10 <sup>9</sup>	Mit Anreicherung
A61 I, II	10 °C, 4 d	Salat-Agar	4,2*10 <sup>9</sup>	3,6*10 <sup>9</sup>	Mit Anreicherung
A62 I, II	10 °C, 4 d	Salat-Agar	4,2*10 <sup>9</sup>	3,6*10 <sup>9</sup>	Mit Anreicherung

Um die Konjugationen zu beenden, durchliefen alle Konjugationsversuche aus Tabelle 21, die nicht selektiv angereichert wurden, das identische Aufarbeitungsprotokoll. Der Membranfilter wurde von der Agarplatte in eine 50-ml-Schrauböhre gegeben und die Bakterien mit 1 ml NaCl-Lösung [0,85 %] für eine Minute durch Vortexen gelöst. Von den gelösten Bakterienzellen wurde eine Verdünnungsreihe im Verhältnis von 1:10 in Ringerlösung (Viertelstark) hergestellt und die entsprechenden Verdünnungen auf Selektivagarplatten ausgespatelt. Zur Bestimmung der Keimzahl von CV601 am Ende der Konjugation wurden auf einem Sechstel einer LB+KA/RD-Agarplatte 10 µl je entsprechender Verdünnungsstufe im technischen Triplikate verteilt. Zur Detektion von Transkonjuganten wurden 100 µl der unverdünnten Probe und der entsprechenden Verdünnungsstufen im technischen Duplikate auf LB+KA/RD/TE-Agar verteilt. Die Platten inkubierten bei 37 °C für ein bis drei Tage.

Die Berechnung der Keimzahlen von CV601 am Ende der Konjugation erfolgte, indem der Mittelwert der auszählbaren Verdünnungsstufen errechnet wurde. Die Zahl wurde entsprechend mit der Verdünnungsstufe verrechnet, um "Koloniebildende Einheiten pro Milliliter" (KbE/ml) zu erhalten. Für die Detektion von Transkonjuganten wurden die Selektivagarplatten berücksichtigt, die zwischen 10 und 300 Kolonien pro Platte aufwiesen. Der Mittelwert der ausgezählten Kolonien wurde ebenfalls mit den Verdünnungsstufen so verrechnet, dass die Einheit KbE/ml erreicht wurde. Die Transferrate basiert auf der Populationsdichte der Empfänger und Transkonjuganten nach Beendigung der Konjugation (Dahlberg et al., 1998):

$$\text{Transferrate} = \frac{\text{Transkonjuganten (KbE/ml)}}{\text{Rezipient nach der Konjugation (KbE/ml)}}$$

Da die Konjugationsversuche bei 10 °C nach vier Tagen keine Transkonjuganten brachten, wurde ein selektiver Anreicherungsschritt nach der Konjugation durchgeführt. Dadurch sollten seltene Transferereignisse nachgewiesen werden. Nach der Konjugation bei 10 °C für vier Tage auf LB- bzw. Salat-Agar wurde der Membranfilter von der Agarplatte in 100 ml LB-Bouillon mit Kanamycin [50 µg/ml], Rifampicin [50 µg/ml] und Tetracyclin [50 µg/ml] gegeben. Der 500-ml-Erlenmeyerkolben wurde mit Alufolie verschlossen und für eine Minute rotiert. Einer einstündigen Inkubation bei 10 °C folgte eine Anreicherungsinkubation bei 37 °C und 130 rpm für eine Nacht. Anschließend wurde 1 ml der Anreicherung auf drei LB+KA/RD/TE-Agarplatten verteilt. Die Platten inkubierten bei 37 °C für zwei Tage. Alle ausgezählten koloniebildenden Einheiten wurden addiert und der Wert in der Einheit KbE/ml angegeben. Eine Transferrate konnte nicht errechnet werden, da der Empfängerstamm in dem Selektivmedium nicht wachsen konnte und die Transkonjuganten außerdem angereichert wurden.

Für alle anderen Versuche wurde die Anzahl der Transkonjuganten im technischen Duplikat detektiert und ausgewertet. Für die Überprüfung der Transkonjuganten-Identität wurde die auswertbare Selektivagarplatte (zwischen 10 und 300 Kolonien) des Duplikats mit der geringeren Koloniezahl verwendet. Für jede Konjugation wurden bis zu 94 Kolonien einer auswertbaren Platte zufällig gewählt, mittels Multiplex-PCR überprüft und eine Auswahl davon in die Stammsammlung aufgenommen (Kapitel 2.3.2).

### 2.3.5 Konjugationsversuche B: Konjugation auf pflanzlichen Lebensmitteln mit den Stämmen Kpneu28 und CV601

Bei diesen Versuchen wurde getestet, ob das Resistenzplasmid vom Spender Kpneu28 in den Empfänger CV601 bei 37 °C und 10 °C auf dem Lebensmittel übertragen werden kann. Die Sprossen (SP) und Mischsalate (MS) (Tabelle 22) wurden für die Konjugationsversuche B verwendet, nachdem mittels *real time* PCR ausgeschlossen wurde, dass sich STEC in den Produkten befindet (Kapitel 2.3.1).

Tabelle 22. Mischsalat (MS) und Sprossen (SP), die für die Konjugationsversuche B verwendet wurden. Für die Versuche wurden je zwei Sprossen (SP2, SP6) und Mischsalate (MS4, MS12) verwendet, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten erworben wurden.

	<b>Mischsalat (MS4 / MS12)</b>	<b>Sprossen (SP2 / SP6)</b>
Lebensmittelbezeichnung	Mischsalat	Sprossen
Zutaten	Feldsalat und Rucola	Alfalfa-, grüne Radieschen-, rote Radieschen-Sprossen
Bio / Konventionell	Konventionell	Bio
Füllmenge	100 g	100 g
Herkunft	Deutschland	Niederlande

Von den Stämmen CV601 und Kpneu28 wurden Übernachtkulturen hergestellt und zentrifugiert, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben. Nach zweimaligem Waschen mit Tris [10 mM] wurden die Pellets mit Ringerlösung (Viertelstark) auf das Ausgangsvolumen verdünnt. Jeweils 10 g einer repräsentativen Probe der Sprossen und Mischsalate wurde in einer 50-ml-Schraubröhre abgewogen (Abbildung 3). Jede Schraubröhre entspricht einem separaten Versuch. Pro Versuch wurden jeweils 500 µl der gewaschenen Übernachtkulturen von Kpneu28 und CV601 durch Vortexen homogenisiert und anschließend in die Schraubröhre gegeben. Durch einen Vortex-Schritt für eine Minute sollten die Zellen auf der Oberfläche der pflanzlichen Frischeprodukte verteilt werden. Der Deckel der Schraubröhre wurde nicht komplett geschlossen, um ein aerobes Wachstum zu ermöglichen. Die Inkubationszeiten und -temperaturen der jeweiligen Versuche sind Tabelle 23 zu entnehmen.



Abbildung 3: Konjugationsversuch B mit Spender Kpneu28 und Empfänger CV601 in einer 50-ml-Schraubröhre mit 10 g Sprossen (links) und 10 g Mischsalat (rechts).

Die Ermittlung der Keimzahlen der Übernachtkulturen von Kpneu28 und CV601 und das Testen der Selektivagarplatten wurden durchgeführt, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben.

Tabelle 23: Konjugationsversuche B mit Spender Kpneu28 und Empfänger CV601 sowie die jeweiligen Versuchsbedingungen. I und II sind separate Konjugationsversuche am selben Tag mit identischen Bedingungen.

Konjugation	Konjugations- bedingungen	Konjugations- medium	Keimzahl der Übernachtkulturen	
			Kpneu28 [KbE/ml]	CV601 [KbE/ml]
A/SP2-β I, II	37 °C, 22 h	Sprossen	4,9*10 <sup>9</sup>	2,7*10 <sup>9</sup>
A/SP6-β I, II	37 °C, 22 h	Sprossen	4,2*10 <sup>9</sup>	3,6*10 <sup>9</sup>
A/MS4-β I, II	37 °C, 22 h	Mischsalat	4,9*10 <sup>9</sup>	2,7*10 <sup>9</sup>
A/MS12-β I, II	37 °C, 22 h	Mischsalat	4,2*10 <sup>9</sup>	3,6*10 <sup>9</sup>
A/SP6-γ I, II	10 °C, 4 d	Sprossen	4,2*10 <sup>9</sup>	3,6*10 <sup>9</sup>
A/SP6-δ I, II	10 °C, 4 d	Sprossen	4,2*10 <sup>9</sup>	3,6*10 <sup>9</sup>
A/MS12-γ I, II	10 °C, 4 d	Mischsalat	4,2*10 <sup>9</sup>	3,6*10 <sup>9</sup>
A/MS12-δ I, II	10 °C, 4 d	Mischsalat	4,2*10 <sup>9</sup>	3,6*10 <sup>9</sup>

Für die Beendigung der Konjugation wurden 10 ml NaCl-Lösung [0,85 %] in die Schraubrohre gegeben und jeweils für eine Minute auf höchster Stufe durch Vortexen homogenisiert. Mit einer Stabpipette wurde anschließend so viel Flüssigkeit wie möglich entnommen (ca. 11 ml). Die Zellen wurden durch Zentrifugieren sedimentiert (5.000g, 10 min). Das Zell-Pellet wurde dann mit 1 ml NaCl-Lösung [0,85 %] gelöst. Eine Verdünnungsreihe im Verhältnis von 1:10 in Ringerlösung (Viertelstark) wurde hergestellt, und die jeweiligen Verdünnungen wurden auf unterschiedliche Selektivagarplatten verteilt, um den Empfänger und die Transkonjuganten zu selektieren. Zur Bestimmung der Empfängerkeimzahl nach der Konjugation wurden im technischen Triplikate jeweils 10 µl einer Verdünnungsstufe auf einem Sechstel einer LB+KA/RD-Agarplatte verteilt. Für die Bestimmung der Transkonjuganten wurden von den entsprechenden Verdünnungen jeweils 100 µl im Duplikate auf 90-mm-LB+KA/RD/TE-Agarplatten ausgespatelt. Für die Konjugationsversuche bei 10 °C wurden zusätzlich 100 µl bzw. 300 µl der unverdünnten Probe auf LB+KA/RD/TE-Agarplatten mit 90 mm bzw. 145 mm Durchmesser verteilt. Da bei den 10-°C-Versuchen nur wenige Transkonjuganten zu erwarten waren, sollte damit die Wahrscheinlichkeit für die Detektion von Transkonjuganten erhöht werden. Die Platten inkubierten anschließend bei 37 °C für ein bis drei Tage.

Die Ermittlung der Keimzahlen von CV601 am Ende der Konjugation erfolgte, indem der Mittelwert der auszählbaren Verdünnungsstufen errechnet wurde. Die Zahl wurde entsprechend mit der Verdünnungsstufe verrechnet, um die Einheit KbE/ml zu erhalten. Bei den 37-°C-Konjugationsversuchen wurden Agarplatten mit einer Anzahl von Transkonjuganten-Kolonien zwischen 10 und 300 ausgewertet und ein Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert wurde ebenfalls mit den Verdünnungsstufen so verrechnet, dass die Einheit KbE/ml erreicht wurde. Die Transferrate wurde errechnet, wie im Kapitel 2.3.4 beschrieben.

Jeweils von einer auswertbaren Platte einer Doppelbestimmung wurden bis zu 94 potenzielle Transkonjuganten gepickt und mittels Multiplex-PCR überprüft. Fünf zufällig ausgewählte Transkonjuganten pro Versuch wurden in die Stammsammlung überführt (siehe Kapitel 2.3.2). Die Multiplex-PCR war bei diesen Versuchen besonders wichtig, da eine Vielfalt natürlich vorkommender Mikroorganismen auf dem Lebensmittel vorhanden war, aber nur Transkonjuganten gewertet werden sollten.

Da bei den Konjugationsversuchen bei 10 °C weniger als 10 Kolonien pro Platte detektiert wurden, wurden alle Transkonjuganten der Doppelbestimmung der unverdünnten Proben gepickt und mittels Multiplex-PCR getestet. Für diese Konjugationen wurden keine Transferraten errechnet.


### 2.3.6 Konjugationsversuche C und D: exogene Plasmid-Isolierung

Mit der exogenen Plasmid-Isolierungsmethode können Antibiotikaresistenzplasmide aus Spenderstämmen, die Teil einer komplexen Mikrobiota sind, in einen Empfängerstamm eingefangen werden (Heuer und Smalla, 2012). Mobilisierbare und konjugative Plasmide können so nachgewiesen werden, allerdings sind die Spenderstämme unbekannt, da nur der Transkonjugant selektiert wird (Smalla et al., 2015; Blau et al., 2020). Entscheidend dabei ist, dass die eingefangenen Plasmide in den Empfängerstamm transferieren und dort replizieren können (Heuer und Smalla, 2012). Selektiert werden nur die Transkonjuganten, die eine phänotypische Resistenz gegen das zur Selektion verwendete Antibiotikum vermitteln (Smalla et al., 2015).

Die Konjugationsversuche C und D wurden mit dem Empfängerstamm *E. coli* CV601 durchgeführt. Ziel war es, unbekannte Plasmide aus unbekanntem Spenderstämmen, die sich auf Sprossen befinden, mit dem Empfängerstamm mittels Konjugation einzusammeln. Die exogene Plasmid-Isolierung von Blau et al. (2018) diente als Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, allerdings wurden die Versuche entsprechend angepasst. Selektiert wurde mit Tetracyclin bzw. mit Cefotaxim, um Plasmide zu erhalten, die dem Stamm eine phänotypische Resistenz gegen eines dieser Antibiotika vermitteln.

Ein Sprossenmix wurde für die Charakterisierung der übertragbaren Antibiotikaresistenzplasmide mittels exogener Plasmid-Isolierung ausgewählt (Tabelle 24). Dabei wurde der Sprossenmix des gleichen Herstellers im Zeitraum vom 19.07.2022 bis 09.08.2022 erworben. Nach dem Kauf der Produkte wurden diese zunächst auf STEC getestet (Kapitel 2.3.1) und lagerten bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

Tabelle 24: Für die exogene Plasmid-Isolierung verwendeter Sprossenmix.

<b>Sprossen (SP)</b>	
Abbildung des Produkts	
Produkt	Sprossen
Zutaten	Alfalfa-Sprossen, grüne und rote Radieschen-Sprossen
Bio / Konventionell	Bio
Füllmenge	100 g
Herkunft	Niederlande
Sonstige Hinweise auf dem Etikett	Vor dem Verzehr bitte waschen; Eignet sich perfekt für Brot und Salat



*E. coli* CV601 wurde einprozentig in 20 ml LB-Bouillon angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Anschließend wurde aus der 7-h-Kultur einprozentig in 20 ml LB-Bouillon mit Kanamycin [50 µg/ml] und Rifampicin [50 µg/ml] überimpft und bei gleichen Bedingungen für eine Nacht inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren gewonnen (5.000g, 5 min), das Pellet zweimal mit Tris [10 mM] gewaschen und mit Ringerlösung (Viertelstark) auf das Ausgangsvolumen zurückverdünnt. Alle verwendeten Selektivagarplatten wurden auf ihre Selektivität getestet, wie zuvor beschrieben (Kapitel 2.3.4).

### Versuch C

Für jeden Versuch C wurden 10 g Sprossenmix in einer 50-ml-Schraubröhre abgewogen. Pro Versuch wurde 1 ml gewaschene Übernachtskultur von CV601 zu den Sprossen in die Schraubröhre gegeben. Ein Vortex-Schritt für eine Minute auf höchster Stufe wurde durchgeführt, um den Empfängerstamm möglichst gut auf dem pflanzlichen Frischeprodukt zu verteilen. Die Inkubationszeiten und -temperaturen sind in Tabelle 25 gezeigt. Die Schraubröhren wurden für die Inkubation nicht komplett verschlossen, damit ein aerobes Wachstum möglich war. Nach der Konjugation wurden jeweils 10 ml NaCl-Lösung [0,85 %] in die Schraubröhre gegeben und die Zellen durch Vortexen gelöst. Mit der Pipette wurde so viel Flüssigkeit wie möglich entnommen und in eine Schraubröhre überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 5.000g für zehn Minuten gewonnen und das Pellet mit 1 ml NaCl-Lösung [0,85 %] gelöst. Eine Verdünnungsreihe im Verhältnis von 1:10 in Ringerlösung (Viertelstark) wurde hergestellt und die jeweiligen relevanten Verdünnungen auf die Selektivagarplatten verteilt. Für die Detektion von Transkonjuganten wurden im Duplikat 100 µl entsprechender Verdünnungsstufen und 100 µl bzw. 300 µl der unverdünnten Probe auf antibiotikahaltige Agarplatten mit 90 mm bzw. 145 mm Durchmesser verteilt. Je nach Versuch enthielten die Agarplatten neben Kanamycin [50 µg/ml] und Rifampicin [50 µg/ml] noch zusätzlich Tetracyclin [50 µg/ml] oder Cefotaxim [10 µg/ml]. Teilweise war nicht genug Volumen der unverdünnten Probe für ein Duplikat der 300-µl-Probe vorhanden. In diesen Fällen wurde nur eine einfache Bestimmung erzielt. Die Selektivagarplatten inkubierten für ein bis drei Tage bei 37 °C.

Tabelle 25: Versuchsbedingungen für die Konjugationsversuche C mit dem Empfänger *E. coli* CV601 (exogene Plasmid-Isolierung auf dem Lebensmittel). I und II sind separate Konjugationsversuche am selben Tag mit identischen Bedingungen.

Konjugation	Konjugationsbedingungen	Konjugationsmedium	Selektivagar
X/SP7-Cα I, II	37 °C; 22 h	Sprossen SP7	LB+KA/RD/TE
X/SP7-Cβ I, II	10 °C; 4 d	Sprossen SP7	LB+KA/RD/TE
X/SP7-Cγ I, II	37 °C; 22 h	Sprossen SP7	LB+KA/RD/CTX
X/SP7-Cε I, II	10 °C; 4 d	Sprossen SP7	LB+KA/RD/CTX
X/SP8-Cα I, II	37 °C; 22 h	Sprossen SP8	LB+KA/RD/TE
X/SP8-Cβ I, II	10 °C; 4 d	Sprossen SP8	LB+KA/RD/TE
X/SP8-Cγ I, II	37 °C; 22 h	Sprossen SP8	LB+KA/RD/CTX
X/SP8-Cε I, II	10 °C; 4 d	Sprossen SP8	LB+KA/RD/CTX
X/SP9-Cα I, II	37 °C; 22 h	Sprossen SP9	LB+KA/RD/TE
X/SP9-Cγ I, II	37 °C; 22 h	Sprossen SP9	LB+KA/RD/CTX
X/SP10-Cα I, II	37 °C; 22 h	Sprossen SP10	LB+KA/RD/TE
X/SP10-Cγ I, II	37 °C; 22 h	Sprossen SP10	LB+KA/RD/CTX
X/SP11-Cγ I, II	37 °C; 22 h	Sprossen SP11	LB+KA/RD/CTX

Versuch D

Für den Nachweis von STEC wurden die Sprossen mit gepuffertem Peptonwasser im Verhältnis 1:10 für 20 bis 24 Stunden angereichert (Kapitel 2.3.1). Die Anreicherung wurde nach negativer STEC-PCR im Versuch D für die Konjugation verwendet. Pro Versuch wurden 10 ml der Sprossenreicherung und 1 ml gewaschene Übernachtskultur von CV601 in einer 50-ml-Schraubröhre zusammengegeben und mit einem Vortex homogenisiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 5.000g für zehn Minuten gewonnen und das Pellet mit 200 µl Ringerlösung (Viertelstark) gelöst. Die Suspension wurde auf den Membranfilter gegeben, der sich auf einer LB-Agarplatte befand. Die Inkubationszeiten und -temperaturen sind in Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 26: Versuchsbedingungen für die Konjugationsversuche D: Filtermating auf LB-Agar mit dem Empfängerstamm *E. coli* CV601 und Sprossenreicherung (exogene Plasmid-Isolierung). I und II sind getrennte Konjugationsversuche am selben Tag mit identischen Bedingungen.

Konjugation	Konjugationsbedingungen	Konjugationsmedium	Frischprodukt	Selektivagar
X/SP7-Dα I, II	37 °C; 22 h	LB-Agar	Sprossen SP7	LB+KA/RD/TE
X/SP7-Dβ I, II	10 °C; 4 d	LB-Agar	Sprossen SP7	LB+KA/RD/TE
X/SP7-Dγ I, II	37 °C; 22 h	LB-Agar	Sprossen SP7	LB+KA/RD/CTX
X/SP7-Dε I, II	10 °C; 4 d	LB-Agar	Sprossen SP7	LB+KA/RD/CTX

Nach der Konjugation wurde der Membranfilter von der Agarplatte in eine 50-ml-Schraubröhre überführt und mit 1 ml NaCl-Lösung [0,85 %] versetzt. Durch einen einminütigen Vortex-Schritt wurden die Zellen gelöst. Die Detektion der Transkonjuganten durch Selektivagarplatten wurde wie bei Versuch C durchgeführt.

Auswertung der Transkonjuganten aus den Versuchen C und D

Für die Selektion von Transkonjuganten wurden die LB+KA/RD/TE- und LB+KA/RD/CTX-Agarplatten der Versuche C und D unter UV-Licht betrachtet. Die Transkonjuganten ließen sich visuell durch das grünfluoreszierende Protein bei einer Wellenlänge von 365 nm von anderen Kolonien auf der Selektivagarplatte unterscheiden. Von jeder Konjugation, bei der mögliche Transkonjuganten unter UV-Licht detektiert werden konnten, wurden bis zu 20 Kolonien von unterschiedlichen Verdünnungen gepickt. Die Kolonien wurden auf Selektivagarplatten (LB+KA/RD/TE- bzw. LB+KA/RD/CTX-Agarplatten) ausgestrichen und bei 37 °C für eine Nacht inkubiert. Von diesen Platten wurde von jedem Ausstrich eine Einzelkolonie gepickt und auf Selektivagar ausgestrichen. Nach einer Inkubation bei 37 °C für eine Nacht wurde die Reinheit durch visuelle Auswertung betätigt. Mit einer PCR wurde überprüft, ob es sich um den Empfängerstamm CV601 handelte. Anschließend wurden pro Versuch letztendlich nur fünf Transkonjuganten in die Stammsammlung überführt (Kapitel 2.3.2). In Tabelle 27 sind die Transkonjuganten aufgelistet, die mittels NextSeq und MinION sequenziert, mittels Unicycler assembliert und bioinformatisch charakterisiert wurden (Kapitel 2.3.8). Ein Agardiffusionstest wurde ebenfalls mit diesen Stämmen durchgeführt (Kapitel 2.3.7).

Tabelle 27: Transkonjuganten der Konjugationsversuche C, die für die Ganzgenomsequenzierung und weitere Untersuchungen ausgewählt wurden.

Konjugationsversuche	Fünf zufällig ausgewählte Transkonjuganten pro Versuch
X/SP7-Cal	X/SP7-Cal/2, X/SP7-Cal/7, X/SP7-Cal/11, X/SP7-Cal/13, 1X/SP7-Cal/19
X/SP7-CaII	X/SP7-CaII/2, X/SP7-CaII/3, X/SP7-CaII/5, X/SP7-CaII/6, X/SP7-CaII/7
X/SP8-Cal	X/SP8-Cal/1, X/SP8-Cal/5, X/SP8-Cal/8, X/SP8-Cal/13, X/SP8-Cal/19
X/SP8-CaII	X/SP8-CaII/1, X/SP8-CaII/7, X/SP8-CaII/13, X/SP8-CaII/16, X/SP8-CaII/19
X/SP9-Cal	X/SP9-Cal/3, X/SP9-Cal/7, X/SP9-Cal/11, X/SP9-Cal/14, X/SP9-Cal/18
X/SP9-CaII	X/SP9-CaII/1, X/SP9-CaII/6, X/SP9-CaII/13, X/SP9-CaII/16, X/SP9-CaII/20
X/SP10-Cal	X/SP10-Cal/3, 1X/SP10-Cal/7, X/SP10-Cal/9, X/SP10-Cal/14, X/SP10-Cal/19
X/SP10-CaII	X/SP10-CaII/2, X/SP10-CaII/5, 1X/SP10-CaII/9, X/SP10-CaII/13, X/SP10-CaII/17

### 2.3.7 Agardiffusionstest mit den Transkonjuganten der exogenen Plasmid-Isolierung

Mit der exogenen Plasmid-Isolierung der Konjugationsversuche C und D sollten unbekannte Plasmide, die Resistenzen gegen Tetracyclin bzw. Cefotaxim vermitteln, in den Empfängerstamm CV601 eingefangen werden. Ausgewählte Transkonjuganten wurden mittels Agardiffusionstest auf weitere Plasmid-vermittelte phänotypische Antibiotikaresistenzen getestet.

Jeweils fünf Transkonjuganten pro Versuch wurden für den Agardiffusionstest ausgewählt (Tabelle 27). Der Agardiffusionstest zur Antibiotikaresistenzbestimmung wurde nach dem Standard von CLSI (2022) durchgeführt. Getestet wurden die Antibiotika Meropenem (MEM), Tetracyclin (TE), Chloramphenicol (CHL), Streptomycin (S), Trimethoprim / Sulfamethoxazol (SXT) und Ciprofloxacin (CIP) (Tabelle 28).

Tabelle 28: Für den Agardiffusionstest verwendete Antibiotika und Resistenzgrenzwerte nach CLSI (2022).

Antibiotikaklassen (Subklasse)	Antibiotikum	Antibiotikakonzentration [µg/Testblättchen]	Grenzwert [mm]	
			sensitiv	resistent
β-Laktam-Antibiotika (Carbapeneme)	Meropenem	10	≥ 23	≤ 19
β-Laktam-Antibiotika (Cephalosporine)	Cefpodoxim	10	≥ 21	≤ 17
Tetracycline	Tetracyclin	30	≥ 15	≤ 11
Fenicole	Chloramphenicol	30	≥ 18	≤ 12
Aminoglykoside	Streptomycin	10	≥ 15	≤ 11
Diaminopyrimidine / Sulfonamide	Trimethoprim / Sulfamethoxazol	25	≥ 16	≤ 10
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	5	≥ 26	≤ 21

Für den Agardiffusionstest wurden die Stämme aus der Stammsammlung auf Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C für eine Nacht inkubiert. In NaCl-Peptonlösung wurden Einzelkolonien suspendiert, bis eine Trübung von 0,5 McFarland erreicht wurde. Mit einem Tupfer wurde die Bakteriensuspension aufgenommen und in dreifacher Richtung auf einer Müller-Hinton-Agarplatte ausgestrichen. Die Antibiotika-Testblättchen wurden mit einem Dispenser auf die Agarplatte aufgebracht. Die Platten inkubierten bei 35 ± 2 °C für 18 Stunden. Anschließend wurde der Hemmhof um die Antibiotika-Testblättchen mit einem Lineal gemessen und die Empfindlichkeit gegen das jeweilige Antibiotikum durch Vergleich mit den Grenzwerten des CLSI (2022) bestimmt. Die Bestimmung erfolgte im Duplikat und der Kontrollstamm *E. coli* ATCC25922 wurde stets mitgeführt.

### 2.3.8 Ganzgenomsequenzierung der Transkonjuganten, Hybridassemblierung und *in silico*-Auswertung

Ausgewählte Transkonjuganten aus den Konjugationsvorversuchen (Tabelle 17) und der exogenen Plasmid-Isolierung (Konjugationsversuche C, Tabelle 27) wurden mittels MiSeq-, bzw. NextSeq- und MinION-Sequenziergeräten sequenziert und die Sequenzierdaten anschließend in einer Hybridassemblierung (Unicycler) kombiniert.

#### MiSeq- bzw. NextSeq-Sequenzierung

Die Transkonjuganten wurden auf LB+KA/RD/TE-Agar ausgestrichen und für eine Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 20 ml LB-Bouillon in 100-ml-Erlenmeyerkolben mit einer Kolonie angeimpft und bei 130 rpm und 37 °C über Nacht inkubiert. Genomische DNA wurde aus 1,5 ml Übernachtskultur mit dem PeqGold Bacterial DNA Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die Überprüfung der DNA-Qualität und die MiSeq-Sequenzierung der Transkonjuganten aus Tabelle 17 wurde durchgeführt wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

Die Transkonjuganten aus Tabelle 27 wurden mit dem Sequenziergerät NextSeq 550 sequenziert. Hierfür wurden die Proben mit dem DNA-Prep Kit nach Herstellerangaben für die Sequenzierung vorbereitet. Die Fragmentierung der DNA erfolgte enzymatisch durch eine Transposase. Zur Ermittlung der durchschnittlichen Fragmentgröße wurden zufällig Proben ausgewählt und mit dem ScreenTape D1000 auf der TapeStation 4150 gemessen. Die fertige DNA-Bibliothek wurde auf dem NextSeq 550 mit dem NextSeq 500/550 Mid Output Kit mit 2 x 149 Zyklen paired-end sequenziert.

Die NextSeq-Daten liegen, wie die MiSeq-Daten, als FASTQ-Dateien vor. Trimmomatic wurde für eine Qualitätskontrolle und für die Sortierung der gepaarten und ungepaarten Sequenzstücke (paired und unpaired reads) verwendet. Die gepaarten Sequenzstücke wurden für die Hybridassemblierung verwendet.

#### MinION-Sequenzierung

Von den auf LB+KA/RD/TE-Agar ausgestrichenen Transkonjuganten wurde eine Kolonie gepickt, um damit 20 ml LB-Bouillon in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben anzuimpfen. 500 µl Übernachtskultur wurden für die Isolierung genomischer DNA mit dem Genomic Micro AX Bacteria Gravity Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA-Qualitätsprüfung wurde, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, durchgeführt. Die Fragmentgröße einzelner Proben wurde mit dem Genomic ScreenTape auf der TapeStation 4150 oder durch Auftrennung von 15 µl Probe mit 3 µl loading dye [6 x] auf einem Agarosegel [1 %] mit TBE [0,5 x] und 1 µl GelRed Nucleic Acid Stain für fünf Stunden bei 80 Volt bestimmt. Die DNA der Proben wurde für die Sequenzierung nach dem jeweiligen Protokoll (Tabelle 29) nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

Tabelle 29: Für die Sequenzierung der Transkonjuganten mit dem MinION verwendeten Flowcells und Kits.

Stämme	Protokoll	DNA-Menge pro Probe	Ligationskit	Barcoding Kit	Flowcell	Laufzeit
Transkonjuganten aus Tabelle 17, außer: A05/1 und A08/9	Native barcoding genomic DNA (SQK-LSK109)	270 ng - 500 ng	SQK-LSK 109	Native Barcoding Expansion Kit (EXP-NBD 103; EXP-NBD 114)	R9.4.1	72 h
Transkonjuganten A05/1 und A08/9	NBA_9137_v112_re vK_01Dec2021-minion	500 ng	SQK-NBD112.96	SQK-NBD112.96	R10.4	48,5 h
Transkonjuganten <sup>1</sup>	NBA_9137_v112_re vK_01Dec2021-minion	350 ng - 500 ng	SQK-NBD112.96	SQK-NBD112.96	R10.4	48,5 h
Transkonjuganten <sup>2</sup>	NBA_9137_v112_re vK_01Dec2021-minion	200 ng - 500 ng	SQK-NBD112.96	SQK-NBD112.96	R10.4	72 h

<sup>1</sup> alle Transkonjuganten aus Tabelle 27 außer: siehe <sup>2</sup>

<sup>2</sup> Transkonjuganten aus Tabelle 27: X/SP8-Cal/8, X/SP8-Cal/19, X/SP9-Cal/11, X/SP10-Cal/3, X/SP10-Cal/7, X/SP10-Cal/9, X/SP10-Cal/19, X/SP10-Cal/2, X/SP10-Cal/9, X/SP10-Cal/13.

Die elektronischen Rohsignale (FAST5-Format) des MinION-Sequenziergeräts wurden durch die Guppy-Software mit GPU-Einstellung in Basen übersetzt und in einem FASTQ-Format gespeichert. Mit der Guppy-Software (5.0.16 bzw. 6.1.2) wurden die Sequenzierdaten entsprechend ihren Adaptern voneinander getrennt (demultiplexed) und die Adapter von den Sequenzen entfernt.

#### Assemblierung der MinION- und MiSeq-/NextSeq-Sequenzierdaten und *in silico*-Charakterisierung

Die Sequenzierdaten der MinION- und der MiSeq- bzw. NextSeq-Sequenzierung wurden mit dem Programm Unicycler, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, bioinformatisch kombiniert. Die anschließende *in silico*-Charakterisierung der Transkonjuganten wurde durchgeführt, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Allerdings wurden die Transkonjuganten mittels dDDH (DSMZ) nicht mit aktuellen Typstämmen verglichen, sondern mit der Referenzsequenz des Empfängerstammes *E. coli* CV601 (Accession-Number bei NCBI: ACP043213.1). Die Annotation erfolgte zunächst auf der Plattform Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC) und die finale Annotation wurde mit PGAP durchgeführt.

#### Plasmid-Vergleich und -Darstellung

Der Vergleich von Plasmiden der Transkonjuganten bekannter Spender mit den Plasmiden der Spenderstämme erfolgte anhand der Annotationsdaten (PGAP) und mittels Vergleichsprogrammen (Mauve, *pairwise alignment*) von Geneious Prime®. Um die Übereinstimmung zwischen zwei Plasmiden zu ermitteln, wurde mit ausgewählten Plasmiden ein paarweiser Vergleich durchgeführt. Hierfür wurde ein paarweiser Vergleich (*pairwise alignment*) mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus im Programm Geneious Prime® durchgeführt. Die Darstellung der Antibiotikaresistenzplasmide X/SP7-Cal/2\_3 und X/SP10-Cal/9\_2 erfolgte – wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben – mit CGview.

## 2.4 16S rRNA-Gen Metagenom-Analyse der Sprossenmikrobiota mittels MinION-Sequenzierung

Um herauszufinden, welche bakterielle Vielfalt sich auf den Sprossen befand, die für die Konjugationsexperimente verwendet wurden, wurde von jeder Handelsprobe ( $n = 4$ ) eine 16S rRNA-Gen Amplikon-Sequenzierung mittels MinION-Sequenzierung durchgeführt. Zusätzlich sollten mögliche Spenderstämme für die eingefangenen Plasmide der Transkonjuganten identifiziert werden. Untersucht wurden die Sprossenmische, die für die exogene Plasmid-Isolierung verwendet wurden (Kapitel 2.3.6). Für die 16S rRNA-Gen Metagenom-Untersuchung wurden von jedem Produkt sowohl die nicht angereicherten als auch die 20 bis 24 Stunden bei 37 °C in gepuffertem Peptonwasser angereicherten Proben getestet. Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass fast die komplette Sequenz amplifiziert wurde (ca. 1.500 bp) (Frank et al., 2008), inklusive aller variablen Regionen (V1 bis V9).

Von dem Sprossenmix wurden 25 g aseptisch in einen Stomacherbeutel gegeben und zusammen mit 225 ml gepuffertem Peptonwasser zwei Minuten lang bei Stufe 3 homogenisiert. Für die nicht angereicherte Probe wurde daraus jeweils eine 10-ml-Probe entnommen, zentrifugiert (5.000g für 10 min) und das Pellet eingefroren. Die restliche Probe im Stomacherbeutel wurde für 20 bis 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend erneut bei identischen Bedingungen homogenisiert. Für die angereicherte Probe wurde davon 1 ml entnommen, zentrifugiert (5.000g für 10 min) und ebenfalls eingefroren. Von den eingefrorenen Pellets wurde mit dem NucleoSpin Microbial DNA Mini Kit Gemeinschafts-DNA (*community DNA*) nach Herstellerangaben isoliert. Die Zellwand der Bakterien wurde mit einem Zell-Disruptor für zehn Minuten aufgeschlossen.

Die 16S rRNA-Gen-PCR wurde durchgeführt, wie bei Borges et al. (2023) beschrieben. Verwendet wurden der Vorwärtsprimer 27F.1 (5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') und der Reverse-Primer 1492r (5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), an die für jede Probe spezifische Barcodes und Abstandssequenzen angefügt wurden (Kuske et al., 2006; Frank et al., 2008; Borges et al., 2023). Die Barcodes sind mit der Oxford Nanopore Technologie kompatibel (Krych et al., 2019) – somit konnten die PCR-Produkte direkt für die Sequenzierung mit dem MinION verwendet werden. Durch die PCR-Primer mit Barcodes war es möglich die 16S rRNA-Genfragmente eindeutig der jeweiligen Probe zuzuordnen. Für alle Proben wurde ein technisches Duplikat angefertigt. Das PCR-Protokoll für die Amplifikation der 16S rRNA-Genregion ist in Tabelle 30 gezeigt.

Tabelle 30: Bestandteile für die 16S rRNA-Gen-PCR zur Amplifikation und Barcodierung für die Metagenom-Sequenzierung mit dem MinION. +X: Platzhalter für individuelle Barcodes und Abstandssequenzen.

Menge	Bestandteil
2,5 µl	Primer 27F.1 +X [10 pmol/µl]
2,5 µl	Primer 1492r +X [10 pmol/µl]
6 µl	dNTP Mix
5 µl	DNA-Template
10 µl	5x <i>Taq</i> polymerase buffer
0,5 µl (1 Einheit)	Q5® High-Fidelity DNA Polymerase
23,5 µl	Nukleasefreies Wasser

Als Negativkontrolle wurden 5 µl nukleasefreies Wasser anstatt der DNA verwendet. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31: Bedingungen für die Amplifikation der 16S rRNA-Gensequenz.

Temperatur	Zeit	Schritt
94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
94 °C	30 s	Denaturierung
56 °C	30 s	32 Zyklen Annealing
72 °C	1 min 10 s	Elongation
72 °C	5 min	Finale Elongation

Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Auf einem Agarosegel [1,5 %] mit TAE [1 x] und 1 µl GelRed Nucleic Acid Stain wurden 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl loading dye [6 x] aufgetragen. Nach einer Stunde bei 100 Volt wurde der Erfolg der PCR mit einer Bande bei ca. 1.500 bp bestätigt. Die Zuordnung der Barcode-Nummern zu den PCR-Produkten der Sprossenproben ist in Tabelle 32 aufgeführt. Die Qualität der PCR-Produkte wurde mit dem NanoDrop 2000c überprüft.

Tabelle 32: Barcode-Zuordnung der 16S rRNA-Genfragmente nach der PCR-Amplifikation für die 16S rRNA-Gen Metagenom-Sequenzierung der Sprossenmikrobiota mittels MinION. Die Sequenzierung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, weshalb jeder Probe zwei Barcode-Nummern zugewiesen sind. SP = Sprossen.

Sprossenprobe	Barcode-Nummer	Barcode-Nummer
SP7 (nicht angereichert)	4	18
SP8 (nicht angereichert)	5	19
SP9 (nicht angereichert)	6	20
SP10 (nicht angereichert)	7	22
SP7 (angereichert)	11	27
SP8 (angereichert)	12	30
SP9 (angereichert)	13	31
SP10 (angereichert)	14	32

Die Fragmentgröße der PCR-Produkte wurde zusätzlich mit dem ScreenTape D5000 auf der TapeStation 4150 gemessen. Ein Aufreinigungsschritt wurde durchgeführt, der nicht gewünschte DNA-Fragmente durch Größenselektion eliminierte. Für die Entfernung von kleinen DNA-Fragmenten wurden zunächst 50 µl PCR-Produkt mit 22,5 µl Magnetperlen gemischt und für zehn Minuten im Überkopfmischer im Modus C3 mit 20 rpm inkubiert. Die Magnetperlen wurden durch fünfminütige Inkubation auf dem Magnetständer pelletiert, der Überstand entfernt und die Magnetperlen für 30 Sekunden getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl nukleasefreiem Wasser suspendiert und zehn Minuten im Überkopfmischer bei gleichen Bedingungen inkubiert. Durch eine zweiminütige Inkubation auf dem Magnetständer pelletierten die Magnetperlen, und 50 µl Überstand wurde für die Weiterverarbeitung entnommen. Für die Entfernung von großen DNA-Fragmenten wurden die 50 µl Überstand mit 17,5 µl Magnetperlen gemischt und für zehn Minuten im Überkopfmischer (Modus C3 mit 20 rpm) inkubiert. Anschließend pelletierten die Magnetperlen durch fünfminütige Inkubation auf dem Magnetständer. 50 µl Überstand wurden entnommen und die Fragmentgrößen erneut mit dem ScreenTape D5000 auf der TapeStation 4150 gemessen.

Für die Proben mit den Barcodenummern 7, 18, 22 erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt, um 100 bp große DNA-Fragmente zu entfernen. Hierzu wurden 50 µl des PCR-Produkts mit 50 µl Magnetperlen gemischt und fünf Minuten lang inkubiert. Das Pelletieren auf dem Magnetständer erfolgte für fünf Minuten. Die Pellets wurden zweimal mit je 200 µl Ethanol [80 %] gewaschen und der Überstand entfernt. Nach der Trocknung der Pellets für eine Minute, wurde die DNA mit 50 µl nukleasefreiem Wasser von den Magnetperlen gelöst. Nach einer Inkubation von zwei Minuten und dem Pelletieren für weitere zwei Minuten auf dem Magnetständer wurden 50 µl Eluat entnommen. Die Fragmentgrößen der drei Proben wurden mit dem ScreenTape D5000 erneut auf der TapeStation 4150 gemessen.

Die DNA-Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte wurde mit dem Qubit dsDNA BR Assay Kit auf dem Multimode-Mikroplattenlesegerät gemessen. Vor dem Ligationsschritt wurden die Proben äquimolar gepoolt, indem von jeder Probe 100 ng eingesetzt wurden. 200 ng DNA der gepoolten Probe wurden mit dem Ligation Sequencing Kit V14 nach dem genomic-dna-by-ligation-sqk-lsk114-GDE\_9161\_v114\_revL\_29Jun2022-minion-Protokoll nach Herstellerangaben für die Sequenzierung vorbereitet. Der Schritt „Barcode-Ligation“ wurde nicht durchgeführt, da die Proben bereits durch die PCR Barcodes besaßen. Die Laufzeit der Sequenzierung auf der R10.4.1 Flowcell betrug 16,5 Stunden.

Basecalling der Rohdaten wurde mit der GPU Guppy Basecalling Software (6.1.2) durchgeführt. Die FASTQ-Daten wurden mit Porechop (v. 0.2.4) entsprechend ihren Barcodes sortiert (demultiplexed). Der Q-Score wurde mittels Geneious Prime<sup>®</sup> ermittelt. Einen Q-Score von mindestens Q20 erreichten 81,8 % bis 83,2 %, mindestens Q30 erreichten 58,6 % bis 62,2 % der generierten Reads. Die Daten wurden anschließend mit NanoCLUST (NCBI-Datenbank 16S ribosomal RNA 2023-04-04; NCBI-Datenbank taxdb 2023-04-03) mit den Standardparametern in Cluster eingeteilt. Die Nanoclust-Ergebnisse (nanoclust\_out.txt) wurden in das Programm Excel überführt und die relative Abundanz der Gattungen anhand der gesamten geclusterten Reads errechnet. Die relative Abundanz der Gattungen wurde anschließend mit RStudio und dem ggplot2-Paket graphisch dargestellt.

## 2.5 Statistische Auswertung

Mit Ausnahme der Konjugationsversuche bei 10 °C (mit und ohne Anreicherungsschritt) aus Kapitel 2.3.4 wurden die Transferraten aller Konjugationsversuche des Kapitels berechnet und statistisch untersucht. Hierfür wurden die Einflüsse der Temperatur (21 °C, 37 °C) und des Nährmediums (LB-, Salat-Agar) auf die Transferrate auf signifikante Unterschiede geprüft. Die logarithmierten Transferraten ( $\log_{10}$ ) wurden zunächst mittels ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse) analysiert, gefolgt von Tukey-HSD-Post-Hoc-Test (Mehrfachvergleiche). Ebenfalls wurden die Einflüsse des Mediums (Sprossen, Mischsalat) auf die logarithmierte Transferrate ( $\log_{10}$ ) der Konjugationsversuche bei 37 °C (Kapitel 2.3.5) mit dem Tukey-HSD-Post-Hoc-Test (Mehrfachvergleiche) auf signifikante Unterschiede geprüft. Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm JMP<sup>®</sup> verwendet. Ein signifikantes Ergebnis lag vor bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  (\*) und ein hoch signifikantes Ergebnis bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  (\*\*).



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung von Enterobakterien pflanzlicher Frischeprodukte

Von pflanzlichen Frischeprodukten isolierte Enterobakterien (n = 22), die in vorangegangenen Arbeiten bereits phänotypisch charakterisiert wurden und zu denen teilweise MiSeq-Sequenzierdaten vorlagen, wurden in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert. Dabei war ein Ziel, die Plasmide der Isolate besser beschreiben und darstellen zu können. Von besonderem Interesse waren die konjugativen Antibiotikaresistenzplasmide, die an der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen beteiligt sein können. Teilweise zeigte PlasmidFinder in den MiSeq-Daten der vorangegangenen Arbeiten bereits Hinweise darauf, dass sich Plasmide in den Enterobakterien befinden (Loop, 2019; Cho et al., 2021). Allerdings ist es mit den MiSeq-Sequenzierdaten alleine bisher nicht gelungen, die Plasmide vollständig darzustellen. Somit konnte auch nicht festgestellt werden, ob bzw. welche Antibiotikaresistenzgene sich auf den Plasmiden befinden. Um die Chromosomen und die Plasmide vollständig darstellen zu können, wurden die 22 Enterobakterien mit einer weiteren Sequenziermethode (MinION) sequenziert. Ein weiteres Ziel der Charakterisierung der Plasmide war es, geeignete Kandidaten für Übertragungsexperimente zu identifizieren.

##### 3.1.1 Genotypische Charakterisierung der 22 Enterobakterien und ihrer Plasmide

Mit einer *de novo*-Hybridassemblierung (Unicycler) wurden die MiSeq- und MinION-Sequenzierdaten kombiniert. Dabei konnten die Chromosomen und alle 41 extrachromosomalen Sequenzen zirkulär geschlossen werden (Accession-Number bei NCBI: Tabelle 49, außer für Kpneu28 und Kpneu34). Die assemblierten Sequenzdaten wurden genutzt, um die Stämme mittels dDDH eindeutig zu identifizieren (Tabelle 33). Die Stämme wurden als *C. gillenii* (n = 1), *C. portucalensis* (n = 2), *C. werkmanii* (n = 2), *C. pasteurii* (n = 2), *C. freundii* (n = 1), *En. dykesii* (n = 2), *En. hormaechei* (n = 1), *En. bugandensis* (n = 1), *K. grimontii* (n = 1), *K. variicola* (n = 1), *K. pneumoniae* (n = 4) und *E. coli* (n = 4) identifiziert. Tabelle 33 zeigt weiterhin die Chromosomgrößen und die Resistenzgene, die auf den Chromosomen der Stämme detektiert wurden.

Tabelle 33: Ergebnisse der Identifizierung der 22 Enterobakterien durch digitale DNA-DNA-Hybridisierung (dDDH) mit *Enterobacteriaceae*-Typ-Stämmen (<sup>T</sup>). Die Chromosomgrößen, die mol% GC-Gehalte und auf dem Chromosom liegende Resistenzgene des jeweiligen Stammes sind aufgelistet. Alle Chromosomen waren zirkulär.

Stamm	dDDH-Ergebnis und Referenzgenom mit der höchsten Ähnlichkeit	Sequenzlänge [bp]	mol% GC-Gehalt	Resistenzgene auf dem Chromosom des Stammes
Cigi1	32,4 % <i>Citrobacter murlinae</i> P080CCL <sup>T*</sup>	5.035.347	52,50	
Cipo4	80,2 % <i>Citrobacter portucalensis</i> A60 <sup>T</sup>	4.909.244	51,88	<i>qnrB9<sup>1</sup></i> , <i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
Ciw5.1	70,1 % <i>Citrobacter werkmanii</i> NBRC 105721 <sup>T</sup>	5.085.698	52,09	<i>aadA1</i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>dfrA19</i> , <i>sul1</i> , <i>catB3</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>catA1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>qnrB34</i> , <i>bla<sub>CMY-98</sub></i>
Ciw5.2	70,1 % <i>Citrobacter werkmanii</i> NBRC 105721 <sup>T</sup>	5.076.889	52,08	<i>aadA1</i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>catA1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>qnrB34</i> , <i>bla<sub>CMY-98</sub></i>

Stamm	dDDH-Ergebnis und Referenzgenom mit der höchsten Ähnlichkeit	Sequenzlänge [bp]	mol% GC-Gehalt	Resistenzgene auf dem Chromosom des Stammes
Cipa6.1	94,3 % <i>Citrobacter pasteurii</i> CIP 55.13 <sup>T</sup>	4.696.996	51,63	
Cipa6.2	94,3 % <i>Citrobacter pasteurii</i> CIP 55.13 <sup>T</sup>	4.695.525	51,63	
Cif11	91,7 % <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 <sup>T</sup>	4.921.369	51,74	<i>bla</i> <sub>CMY-48</sub>
Cipo13	78,7 % <i>Citrobacter portucalensis</i> A60 <sup>T</sup>	4.882.283	52,03	<i>qnrB9</i> <sup>2</sup> , <i>qnrB7</i> <sup>3</sup> , <i>bla</i> <sub>CMY-34</sub>
Endy1	100 % <i>Enterobacter dykesii</i> DSM 111347 <sup>T</sup>	4.554.876	55,85	<i>bla</i> <sub>ACT-6</sub> , <i>fosA</i>
Endy2	100 % <i>Enterobacter dykesii</i> DSM 111347 <sup>T</sup>	4.554.873	55,84	<i>bla</i> <sub>ACT-6</sub> , <i>fosA</i>
Enh11	91,8 % <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> DSM16691 <sup>T</sup>	4.701.271	55,70	<i>bla</i> <sub>ACT-7</sub> , <i>fosA</i>
Enb12	84,3 % <i>Enterobacter bugandensis</i> EB247 <sup>T</sup>	4.836.219	56,07	<i>fosA</i>
Ec1115	75,1 % <i>Escherichia coli</i> DSM30083 <sup>T</sup>	4.859.272	50,88	
Ec1117	74,7 % <i>Escherichia coli</i> DSM30083 <sup>T</sup>	4.933.597	50,80	
Ec1119	74,1 % <i>Escherichia coli</i> DSM30083 <sup>T</sup>	4.750.609	50,79	
Ec1120	75,7 % <i>Escherichia coli</i> DSM30083 <sup>T</sup>	4.577.716	50,88	
Kgr1	95,5 % <i>Klebsiella grimontii</i> 06D021 <sup>T</sup>	5.850.048	55,89	<i>oqx</i> B, <i>bla</i> <sub>OXY-6-4</sub>
Kva3	92,7 % <i>Klebsiella variicola</i> DSM 15968 <sup>T</sup>	5.517.735	57,33	<i>oqx</i> B, <i>oqx</i> A, <i>bla</i> <sub>LEN7</sub> , <i>fosA</i>
Kpneu4	92,9 % <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <sup>T</sup>	5.315.652	57,33	<i>oqx</i> B, <i>oqx</i> A, <i>bla</i> <sub>SHV-26</sub> <sup>4</sup> , <i>fosA</i>
Kpneu8	93,8 % <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <sup>T</sup>	5.349.345	57,38	<i>oqx</i> B, <i>oqx</i> A, <i>bla</i> <sub>SHV-27</sub> <sup>5</sup> , <i>fosA</i>
Kpneu28	93,1 % <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <sup>T</sup>	5.264.246	57,49	<i>oqx</i> B, <i>oqx</i> A, <i>bla</i> <sub>SHV-40</sub> <sup>6</sup> , <i>fosA</i>
Kpneu34	92,9 % <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <sup>T</sup>	5.262.405	57,48	<i>oqx</i> B, <i>oqx</i> A, <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> <sup>7</sup> , <i>fosA</i>

<sup>1</sup> gleiche Identität, Sequenzabdeckung und Position im Contig wie *qnrB32*;

<sup>2</sup> Sequenzabdeckung von 38,44 %;

<sup>3</sup> gleiche Identität, Sequenzabdeckung und Position im Contig wie *qnrB9* und *qnrB78*;

<sup>4</sup> gleiche Identität, Sequenzabdeckung und Position im Contig wie *bla*<sub>SHV-78</sub>, *bla*<sub>SHV-98</sub>, *bla*<sub>SHV-145</sub>, *bla*<sub>SHV-179</sub>, *bla*<sub>SHV-195</sub> und *bla*<sub>SHV-199</sub>;

<sup>5</sup> gleiche Identität, Sequenzabdeckung und Position im Contig wie *bla*<sub>SHV-110</sub> und *bla*<sub>SHV-191</sub>;

<sup>6</sup> gleiche Identität, Sequenzabdeckung und Position im Contig wie *bla*<sub>SHV-56</sub>, *bla*<sub>SHV-79</sub>, *bla*<sub>SHV-85</sub> und *bla*<sub>SHV-89</sub>;

<sup>7</sup> gleiche Identität, Sequenzabdeckung und Position im Contig wie *bla*<sub>SHV-10</sub>;

\* die Genomsequenz des *Citrobacter gillenii*-Typstammes war nicht verfügbar (letzte Prüfung: 10.08.2023). Der Stamm wurde allerdings zuvor von Cho et al. (2021) als *Citrobacter gillenii* identifiziert.

Die Genomgrößen der untersuchten Stämme reichten von 4,55 Mbp bis 5,85 Mbp. Dabei waren die Genome von *Enterobacter* die kleinsten (4,55 Mbp bis 4,83 Mbp) und die von *Klebsiella* die größten (5,26 Mbp bis 5,85 Mbp) (Tabelle 33). Der chromosomale mol% GC-Gehalt variierte zwischen 50,79 % (Ec1119) und 57,49 % (Kpneu28) und war innerhalb der Gattungen ähnlich. *Escherichia* und *Citrobacter* zeigten niedrige mol% GC-Gehalte, die zwischen 50,79 % und 50,88 % bzw. 51,63 % und 52,50 % variierten. Die mol% GC-Gehalte von *Enterobacter* (55,70 % bis 56,07 %) und *Klebsiella* (55,89 % bis 57,49 %) waren deutlich höher.

Die *Enterobacter*-Stämme Endy1 und Endy2 sowie die *Citrobacter*-Stämme Cipa6.1 und Cipa6.2 bzw. Ciw5.1 und Ciw5.2 haben jeweils bereits in der vorangegangenen taxonomischen Studie eine hohe Ähnlichkeit gezeigt (Cho et al., 2021). Durch die Sequenzierung mit dem MinION konnten die Chromosomen nun vervollständigt werden. Die Stammpaare wurden mittels dDDH miteinander verglichen und zeigten untereinander jeweils eine Übereinstimmung von 100 %. Interessant waren besonders die Stämme Ciw5.1 und Ciw5.2. Diese zeigten phänotypische Resistenzunterschiede (Gentamicin; Tabelle 36), und das Chromosom von Ciw5.1 war 8.809 bp größer als das von Ciw5.2. Eine 8.152 bp lange chromosomale Sequenz, die der Stamm Ciw5.1 – nicht aber Ciw5.2 – besaß, bestand unter anderem aus einem zusätzlichen Integron (Abbildung 4). Die Stämme besaßen jeweils zwei Plasmide ohne Antibiotikaresistenzgene. Deren Plasmide Ciw5.1\_1 und Ciw5.2\_1 bzw. Ciw5.1\_2 und Ciw5.2\_2 zeigten jeweils eine Übereinstimmung von 100 %.

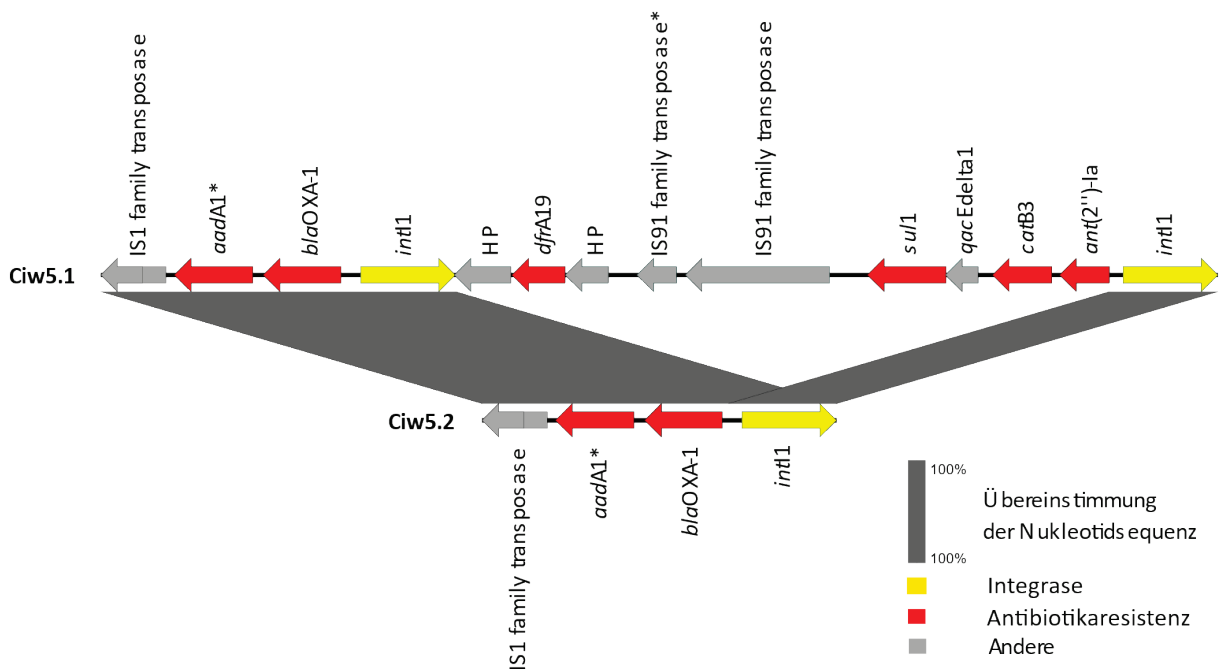


Abbildung 4: Vergleich der chromosomalen Sequenzabschnitte von Ciw5.1 (64.740 - 76.677) und Ciw5.2 (64.740 - 68.530) mittels Easyfig. Die Abbildung basiert auf den PGAP-Annotationsdaten. Wenn keine Genbezeichnung vorhanden war, wurde die Produktbezeichnung der kodierenden Sequenz gewählt.

Wie in Abbildung 4 gezeigt, wies der Stamm Ciw5.1 im Vergleich mit dem Stamm Ciw5.2 eine zusätzliche Resistenzregion auf dem Chromosom auf. In dieser Region waren – neben Genen für hypothetische Proteine – ein Desinfektionsmittelresistenzgen (*qacED1*), Antibiotikaresistenzgene (*dfrA19*, *catB3*, *sul1*, *ant(2'')-Ia*) und zusätzliche Gene für eine Integrase und eine Insertionssequenz vorhanden. Da das Resistenzgen *ant(2'')-Ia* eine Resistenz gegen Gentamicin vermittelt, könnte dies der Grund dafür sein, dass Ciw5.1 resistent gegen dieses Antibiotikum war, während Ciw5.2 sensitiv war. Ein Unterschied in der Resistenzfähigkeit gegen Chloramphenicol wurde nicht festgestellt, denn beide Stämme besaßen ein *catA1*-Gen.

Die häufigsten Resistenzgene auf den Chromosomen waren  $\beta$ -Laktam- (14 Stämme) und Fosfomycin-Antibiotikaresistenzgene (9 Stämme). Die *E. coli*-Stämme, Cigi1, Cipa6.1 und Cipa6.2 zeigten keine Resistenzgene auf ihren Chromosomen. Alle anderen *Citrobacter*-Stämme, trugen *bla<sub>CMY</sub>* auf dem Chromosom und vier der acht *Citrobacter*-Stämme besaßen das Chinolon-Resistenzgen *qnrB* auf dem Chromosom. Der Stamm Ciw5.1 wies die meisten und diversesten Antibiotikaresistenzgene auf dem Chromosom auf. Diese zehn Antibiotikaresistenzgene (*aadA1*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *dfrA19*, *sul1*, *catB3*, *ant(2'')-Ia*, *catA1*, *tet(B)*, *qnrB34*, *bla<sub>CMY-98</sub>*) können Resistenzen gegen Antibiotika sieben unterschiedlicher Antibiotikaklassen (Tetracycline,  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, Sulfonamide, Diaminopyrimidine, Fluorchinolone, Fenicole, Aminoglykoside) vermitteln. Die vier *Enterobacter*-Stämme zeigten ähnliche Resistenzgene auf ihrem Chromosom, denn alle besaßen *fosA* und bis auf den Stamm Enb12 auch *bla<sub>ACT</sub>*. Die *K. pneumoniae* und *K. variicola*-Stämme wiesen auf ihren Chromosomen *fosA*, *oqxA/oqxB* und das  $\beta$ -Laktam-Antibiotikaresistenzgen *bla<sub>SHV</sub>* oder *bla<sub>LEN</sub>* auf.

Von den insgesamt 22 Stämmen wiesen die fünf Stämme Cipa6.1, Cipa6.2, Endy1, Endy2, Kva3 keine extrachromosomalen Sequenzen auf. Die restlichen 17 Stämme enthielten zwischen einer und fünf extrachromosomalen Sequenzen, wobei die meisten Stämme eine oder zwei besaßen (Tabelle 34). Insgesamt wurden 41 extrachromosomale Sequenzen detektiert, die in ihrer Größe zwischen 2.000 bp und 326.000 bp variierten. Dabei zeigte die Annotation der kleineren extrachromosomalen Sequenz des Stammes Enb12 (Contig 3 mit 45.550 bp) überwiegend Phagengene. Die Sequenz konnte mittels PHASTER als Prophagensequenz identifiziert werden. Fast die komplette Sequenz (49 bp bis 45.026 bp) wurde als intakte Prophage (score = 105) bewertet und kodierte 58 Proteine. Der Phage in der Datenbank mit der höchsten Anzahl an homologen Proteinen war der Phage N15. Dieser liegt im Wirtsbakterium extrachromosomal als linearer Plasmid-Prophage vor (Rybchin und Svarchevsky, 1999; Ravin, 2011). Der Prophage MStein-2023a (Enb12, Contig 3; Accession-Number bei NCBI: CP115603) wird in den folgenden Auswertungen nicht berücksichtigt, da in der vorliegenden Arbeit nur die Plasmide der untersuchten Enterobakterien-Stämme charakterisiert werden sollten. Die verbleibenden extrachromosomalen DNA-Fragmente zeigten keine intakten Prophagenregionen und werden nachfolgend als Plasmide bezeichnet. Von den insgesamt 40 Plasmiden wurden 35 % als kleine (< 7.000 bp) und 65 % als große Plasmide (> 32.000 bp) eingestuft. Cipo13 war der einzige Stamm mit fünf Plasmiden (Tabelle 34). Alle fünf Plasmide wurden als große Plasmide klassifiziert, sodass dieser Stamm insgesamt ca. 0,6 Mbp an extrachromosomaler DNA aufwies. Bis auf *E. coli* Ec1115 besaßen alle *Enterobacter*- und *E. coli*-Stämme ausschließlich große Plasmide. Der Stamm Ec1115 wies neben drei großen Plasmiden auch ein weiteres kleines Plasmid auf. Die vier *K. pneumoniae*-Stämme besaßen

mindestens ein großes und ein kleines Plasmid. Bis auf Ciw5.1 und Ciw5.2, die jeweils über zwei kleine Plasmide verfügten, zeigten *Citrobacter*-Stämme nur große Plasmide (Tabelle 34).

Bis auf zwei Plasmide lag der mol% GC-Gehalt der Plasmide zwischen 41,49 % und 56,51 % (Tabelle 34). Die beiden 2.725 bp großen Plasmide von Ciw5.1 und Ciw5.2 wiesen mit 32,41 % den niedrigsten mol% GC-Gehalt auf. Ca. 83 % der Plasmide zeigten einen höheren mol% GC-Gehalt als das Wirtschromosom. Bei vier großen (pCIGI1\_1, pCIPO4\_1, pCIPO13\_3, pEC1115\_3) und drei kleinen Plasmiden (pCIW5.1\_1, pCIW5.2\_1, pEC1115\_4) war der mol% GC-Gehalt geringer als der des Wirtschromosoms.

Die Diversität der Antibiotikaresistenzgene auf den Plasmiden der von pflanzlichen Frischeprodukten isolierten Stämme war groß. Von den 40 Plasmiden, die in 17 Enterobakterien detektiert wurden, besaßen neun Stämme insgesamt elf Antibiotikaresistenzplasmide (Tabelle 34). Beide Plasmide des Stammes Cipo4 trugen jeweils ein Tetracyclin-Resistenzgen (*tet(A)* und *tet(D)*). Bei dem Stamm Kpneu34 wurden vier Plasmide detektiert, von denen zwei multiple Resistenzgene aufwiesen. Keines der Plasmide unter 7 kbp besaß Antibiotikaresistenzgene, ebenso wenig wie die drei größten Plasmide. Innerhalb der elf Antibiotikaresistenzplasmide ließ die Anzahl der Resistenzgene keinen Zusammenhang mit der Größe der Plasmide erkennen. Beispielsweise war das Plasmid mit den meisten Antibiotikaresistenzgenen (pKPNEU34\_2) nur 63.972 bp groß, während das Plasmid von Ec1117 bei einer Größe von 119.797 bp nur ein Resistenzgen zeigte (Tabelle 34). Keines der *Enterobacter*-Plasmide (0/2), 25 % der *Klebsiella*-Plasmide (4/16), 27 % der *Citrobacter*-Plasmide (4/15) und 43 % der *Escherichia*-Plasmide (3/7) zeigten Antibiotikaresistenzgene. Die Plasmide wiesen entweder ein, zwei, drei, sechs oder zwölf Resistenzgene pro Plasmid auf (Tabelle 34).

Die am häufigsten vertretenen Antibiotikaresistenzgene auf den Plasmiden waren Resistenzgene gegen Aminoglykoside (11 Gene), Tetracycline (10 Gene) und Sulfonamide (7 Gene). Bis auf ein Resistenzplasmid besaßen alle ein Tetracyclin-Resistenzgen (*tet(A)*, *tet(D)* und *tet(Y)*), wobei *tet(A)* am häufigsten vertreten war. Das *E. coli*-Plasmid pEC1115\_1 und die *K. pneumoniae*-Resistenzplasmide wiesen sechs bzw. zwölf Resistenzgene auf, die Resistenzen gegen mindestens vier Antibiotikaklassen vermitteln. Beide Resistenzplasmide des Stammes Kpneu34 hatten jeweils zwei Resistenzgene, die auf keinem weiteren Plasmid der untersuchten Stämme detektiert wurden. Das Plasmid pKNEU34\_1 besaß unter anderem das Makrolid-Resistenzgen *mph(A)* und ein Fenicol-Resistenzgen *catA1*. Das Plasmid pKNEU34\_2 wies insgesamt zwölf Antibiotikaresistenzgene auf, unter anderem das Rifampicin-Resistenzgen *arr-3* und das Gen *aac(6')-Ib-cr* (Tabelle 34). Letzteres kodiert eine Aminoglykosid-Acetyltransferase die Resistenzen gegen Fluorchinolon- und Aminoglykosid-Antibiotika vermittelt (Vetting et al., 2008).

Tabelle 34: Genotypische Charakterisierung von *Enterobacteriaceae*-Plasmiden. Die Ergebnisse von PlasmidFinder, ResFinder, MOB-suite werden gezeigt. Die Replikon-Typen und Resistenzgene sind nach der Reihenfolge im Contig angeordnet. Alle Plasmide waren zirkulär.

Plasmid	Sequenzlänge [bp]	mol% GC-Gehalt	Inc- / Replikon-Typen	Antibiotikaresistenzgene (Metallresistenzgene)	Prognostizierte Mobilität (MPF-Typ)	Prognostizierte Wirts-Reichweite
pCIGI1_1	119.408	54,22		<i>tet</i> (Y), <i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3'')-Ib	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )	<i>Enterobacteriaceae</i>
pCIGI1_2	107.458	50,87	IncFIB(pHCM2)		Nicht mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>
pCIGI1_3	55.797	51,89			Mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>
pCIPO4_1	91.909	52,06		<i>tet</i> (D)	Mobilisierbar	<i>Enterobacteriaceae</i>
pCIPO4_2	49.031	51,74	IncR	<i>tet</i> (A)	Mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>
pCIW5.1_1	5.410	52,26	Col(pHAD28) <sup>1</sup> , Col440II <sup>1</sup>		Mobilisierbar	<i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i>
pCIW5.1_2	2.715	32,41			Nicht mobilisierbar	
pCIW5.2_1	5.410	52,26	Col440II <sup>1</sup> , Col(pHAD28) <sup>1</sup>		Mobilisierbar	<i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i>
pCIW5.2_2	2.715	32,41			Nicht mobilisierbar	
pCIF11_1	228.564	47,47	pKPC-CAV1321	(Quecksilberresistenzgene)	Mobilisierbar	<i>Enterobacteriaceae</i>
pCIPO13_1	326.286	47,14	IncHI1A(NDM-CIT), IncHI1B(pNDM-CIT)	(Tellurresistenzgene)	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )	<i>Enterobacterales</i>
pCIPO13_2	108.873	50,5	IncFIB(pHCM2)		Nicht mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>
pCIPO13_3	91.270	53,01	IncFIB(K), IncFII(Yp)	<i>sul2</i> , <i>tet</i> (D)	Konjugativ (MPF <sub>T</sub> )	<i>Enterobacterales</i>
pCIPO13_4	39.641	48,54			Mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>
pCIPO13_5	32.965	50,35	IncN2		Konjugativ (MPF <sub>T</sub> )	<i>Gammaproteobacteria</i>
pENH11_1	158.457	52,42	IncFII(pECLA), IncFIB(pECLA)		Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )	<i>Enterobacterales</i>
pENB12_1	82.766	46,89			Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )	<i>Enterobacter</i>
pEC1115_1	179.575	50,62	IncFIB(AP001918), IncQ1 <sup>2</sup> , IncFII	<i>tet</i> (A), <i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id (Quecksilberresistenzgene)	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )	<i>Proteobacteria</i>
pEC1115_2	92.661	49,88	IncI1-I(Alpha)		Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )	<i>Enterobacterales</i>
pEC1115_3	68.264	51,81	IncFII(pHN7A8)		Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )	<i>Enterobacterales</i>
pEC1115_4	3.374	55,19			Mobilisierbar	<i>Enterobacteriaceae</i>
pEC1117_1	119.797	50,64	IncFIB(AP001918)	<i>tet</i> (A), <i>dfrA5</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )	<i>Enterobacterales</i>
pEC1119_1	34.007	48,71			Konjugativ (MPF <sub>T</sub> )	<i>Gammaproteobacteria</i>
pEC1120_1	90.204	48,92	p0111	<i>tet</i> (A)	Nicht mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>

Plasmid	Sequenzlänge [bp]	mol% GC-Gehalt	Inc- / Replikon-Typen	Antibiotikaresistenzgene (Metallresistenzgene)	Prognostizierte Mobilität (MPF-Typ)	Prognostizierte Wirts-Reichweite
pKGR1_1	5.665	48,7	Col440II <sup>1</sup> , Col(pHAD28) <sup>1</sup>		Mobilisierbar	<i>Proteobacteria</i>
pKGR1_2	4.721	52,09			Mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>
pKGR1_3	4.096	55,52	Col440I <sup>1</sup>		Mobilisierbar	<i>Actinobacteria, Proteobacteria</i>
pKGR1_4	3.173	48			Nicht mobilisierbar	<i>Proteobacteria</i>
pKPNEU4_1	234.572	51,1	IncFIB(K)(pCAV1099-114), IncFIA(pBK30683)	(Tellurresistenzgene)	Nicht mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>
pKPNEU4_2	6.455	54,64	Col440I <sup>1</sup>		Nicht mobilisierbar	<i>Actinobacteria, Proteobacteria</i>
pKPNEU8_1	51.693	54,13	IncR	<i>dfrA14, qnrS<sup>3</sup>, qnrS1<sup>4</sup>, bla<sub>LAP-2</sub>, tet(A), sul2</i>	Nicht mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>
pKPNEU8_2	2.987	45,36	Col440I <sup>1</sup>		Nicht mobilisierbar	<i>Enterobacteriaceae</i>
pKPNEU28_1	139.211	51,66	IncFIB(K)	(Kupfer-/Silberresistenzgene, Arsenresistenzgene)	Nicht mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>
pKPNEU28_2	121.449	51,76	IncR, IncFII(K)	<i>sul1, dfrA1, tet(A), qnrS1, bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )	<i>Enterobacterales</i>
pKPNEU28_3	42.330	50,34			Konjugativ (MPF <sub>T</sub> )	<i>Gammaproteobacteria</i>
pKPNEU28_4	4.686	44,15	Col440I <sup>1</sup>		Nicht mobilisierbar	<i>Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria</i>
pKPNEU34_1	209.900	53,29	IncFIB(K), IncFII(K)	<i>aph(3')-Ia, mph(A), sul1, aadA2, dfrA12, catA1</i> (Kupfer-/Silberresistenzgene, Arsenresistenzgene)	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )	<i>Enterobacterales</i>
pKPNEU34_2	63.972	52,71	IncFIA(HI1), IncR	<i>aac(3)-IId, bla<sub>SHV-2</sub>, tet(D), sul1, aadA16, dfrA27, arr-3, aac(6')-Ib-cr, sul2, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla<sub>TEM-1B</sub></i> (Quecksilberresistenzgene)	Mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>
pKPNEU34_3	4.167	41,49	Col(pHAD28) <sup>1</sup>		Nicht mobilisierbar	<i>Actinobacteria, Proteobacteria</i>
pKPNEU34_4	2.058	56,51			Nicht mobilisierbar	<i>Enterobacterales</i>

<sup>1</sup> Identität zwischen 83,57 % und 95,61 %;

<sup>2</sup> Sequenzabdeckung von 66 %;

<sup>3</sup> Sequenzabdeckung von 63 %; gleiche Identität, Sequenzabdeckung und Position in Contig wie *qnrS3, qnrS4, qnrS7, qnrS8, qnrS10, qnrS11, qnrS12, qnrS13*;

<sup>4</sup> Sequenzabdeckung von 38 %.

Mit dem PlasmidFinder wurden insgesamt elf verschiedene Replikon-Typen identifiziert. Unter anderem wurden IncFIB (n = 9), IncFII (n = 6), IncR (n = 4), IncFIA (n = 2), IncI (n = 1), IncHI1A/B (n = 1), IncQ (n = 1), IncN (n = 1) und Col-Replikon-Typen (n = 11) detektiert (Tabelle 34). Für insgesamt 13 komplette, zirkuläre Plasmide konnte keine Übereinstimmung mit den Replikon-Typen in der PlasmidFinder-Datenbank gefunden werden. In 16 Plasmiden wurde nur ein Replikon-Typ detektiert. Plasmide mit multiplen Replikon-Typen wurden in insgesamt elf Plasmiden gefunden, wobei nur das Plasmid pEC1115\_1 drei Replikon-Typen aufwies. Der häufigste Replikon-Typ war IncFIB, gefolgt von IncFII. Die beiden Replikon-Typen wurden teilweise gemeinsam gefunden, oder in Kombination mit den Replikon-Typen IncQ1 oder IncR. In kleinen Plasmiden wurden nur die Col-Replikon-Typen Col440I, Col440II und Col(pHAD28) detektiert. Die Replikon-Typen Col440II und Col(pHAD28) wurden fast immer zusammen auf einem Plasmid identifiziert (Tabelle 34), während Col440I ausschließlich allein gefunden wurde.

Nicht auf jedem Plasmid, bei dem IncF als Replikon-Typ identifiziert wurde, wurden Antibiotikaresistenzgene gefunden. Von den elf Antibiotikaresistenzplasmiden waren sechs IncF-Replikon-Typen (Tabelle 34). Weiterhin war IncR mit Antibiotikaresistenz assoziiert, denn auf jedem IncR-Plasmid (teilweise auch als Multireplikons), wurden Antibiotikaresistenzgene gefunden. Die Plasmide mit den Replikon-Typen IncN oder IncI besaßen keine Resistenzgene gegen Antibiotika. Zwei Plasmiden mit Antibiotikaresistenzgenen konnten keine Replikon-Typen zugewiesen werden.

Das Software-Tool MOB-suite trifft Vorhersagen über die Mobilität der Plasmide. Von den untersuchten Plasmiden wurden 35 % als konjugativ, 30 % als mobilisierbar und 35 % als nicht mobilisierbar eingestuft (Tabelle 34). Dabei war die Hälfte der großen Plasmide konjugativ, während die restlichen großen Plasmide entweder mobilisierbar oder nicht mobilisierbar waren.

Neben Resistenzgenen gegen antimikrobielle Substanzen, wurden auf den Plasmiden auch Resistenzgene gegen Metalle gefunden. Ähnlich wie Antibiotikaresistenzgene waren Metallresistenzgene nur auf großen Plasmiden zu detektieren (Tabelle 34). Das kleinste Plasmid, welches Resistenzgene gegen Metalle besaß, war 63.972 bp groß (pKPNEU34\_2). In *Enterobacter*-Stämmen wurden keine Metallresistenzgene auf Plasmiden gefunden. Das *E. coli*-Plasmid pEC1115\_1 besaß Resistenzgene gegen Quecksilber. Gene, die potenziell Resistenzen gegen Silber, Kupfer, Arsen sowie Quecksilber und Tellur vermitteln, wurden auf manchen der *Klebsiella*-Plasmide gefunden. *Citrobacter*-Plasmide zeigten Resistenzgene gegen Quecksilber und Tellur. Quecksilber-Resistenzgene wurden am häufigsten auf den untersuchten Plasmiden detektiert.



Mit dem Programm MobileElementFinder wurden mögliche Composite und Unit Transposons auf den Plasmiden identifiziert. Somit konnte auch herausgefunden werden, welche Antibiotikaresistenzgene möglicherweise zwischen DNA-Sequenzen mobilisiert werden können (Tabelle 35). Auf diesen Transposons wurden außerdem Resistenzgene gegen Metalle (pCIF11\_1, pKPNEU4\_1, pKPNEU28\_1, pKPNEU34\_1), Gene für Toxin-Antitoxin-Systeme (pCIPO4\_2, pCIF11\_1, pCIPO13\_1, pCIPO13\_3, pKPNEU4\_1, KPNEU28\_1, Kpneu34\_1) und Gene für Replikationsproteine (pCIPO4\_2 [IncR], pEC1115\_1 [IncQ], pKPNEU34\_2 [IncFIA]) detektiert. Verschiedene Insertionssequenzen waren mit Composite Transposons assoziiert. IS26 wurde als Insertionssequenz bei fast allen Composite Transposons identifiziert, die mit Antibiotikaresistenzgenen assoziiert waren. Die beiden *Enterobacter*-Plasmide zeigten weder Composite noch Unit Transposons. In den hier untersuchten Plasmiden waren 50 % der Antibiotikaresistenzgene mit Composite oder Unit Transposons assoziiert.

Tabelle 35: Mittels MobileElementFinder identifizierte Composite und Unit Transposons der Plasmide, die potenziell Antibiotikaresistenzgene innerhalb der Bakterienzelle mobilisieren können. IS = Insertionssequenz; Tn = Transposon.

Plasmid	Transposon Typ (IS / Tn)	Position im Plasmid	Antibiotikaresistenzgene
pCIPO4_1	Composite Transposons (IS26)	7.798 - 12.964	<i>tet(D)</i>
pCIPO13_3	Composite Transposons (IS26)	14.640 - 48.044	<i>sul2</i>
	Composite Transposons (IS5075)	40.843 - 53.719	<i>sul2, tet(D)</i>
	Composite Transposons (IS26)	47.224 - 52.387	<i>tet(D)</i>
pEC1115_1	Composite Transposons (IS26)	88.051 - 91.607	<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>
	Composite Transposons (IS26)	90.787 - 96.813	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, sul2</i>
pEC1120_1	Unit Transposon (Tn1721)	56.428 - 67.555	<i>tet(A)</i>
pKPNEU28_2	Composite Transposons (IS26)	3.452 - 15.375	<i>tet(A), sul1, dfrA1</i>
pKPNEU34_2	Composite Transposons (IS26)	900 - 7.267	<i>aac(3)-IId</i>
	Composite Transposons (IS26)	6.447 - 12.008	<i>bla<sub>SHV-2</sub></i>
	Composite Transposons (IS26)	11.188 - 21.182	<i>tet(D)</i>
	Composite Transposons (IS26)	20.362 - 32.258	<i>sul1, aadA16, dfrA27, aar-3, aac(6')-Ib-cr</i>
	Composite Transposons (IS26)	31.438 - 40.709	<i>sul2, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla<sub>TEM-1B</sub></i>

Mit dem IntegronFinder wurden Klasse-1-Integrone mit entsprechenden Genkassetten gefunden (Abbildung 5). Die Plasmide pEC1115\_1, pEC1117\_1, pKPNEU34\_1 und die Chromosomen der Stämme Ciw5.1 und Ciw5.2 besaßen Klasse-1-Integrone. In allen Genkassetten der Integrone wurden Antibiotikaresistenzgene detektiert. Die Klasse-1-Integrone von pEC1115\_1 und pEC1117\_1 waren identisch und schlossen eine Insertionssequenz IS26 mit ein. Die Chromosomen von Ciw5.1 und Ciw5.2 zeigten ein identisches Integron, jedoch besaß Ciw5.1 ein weiteres Integron, welches Ciw5.2 nicht besaß (Abbildung 4 und Abbildung 5).

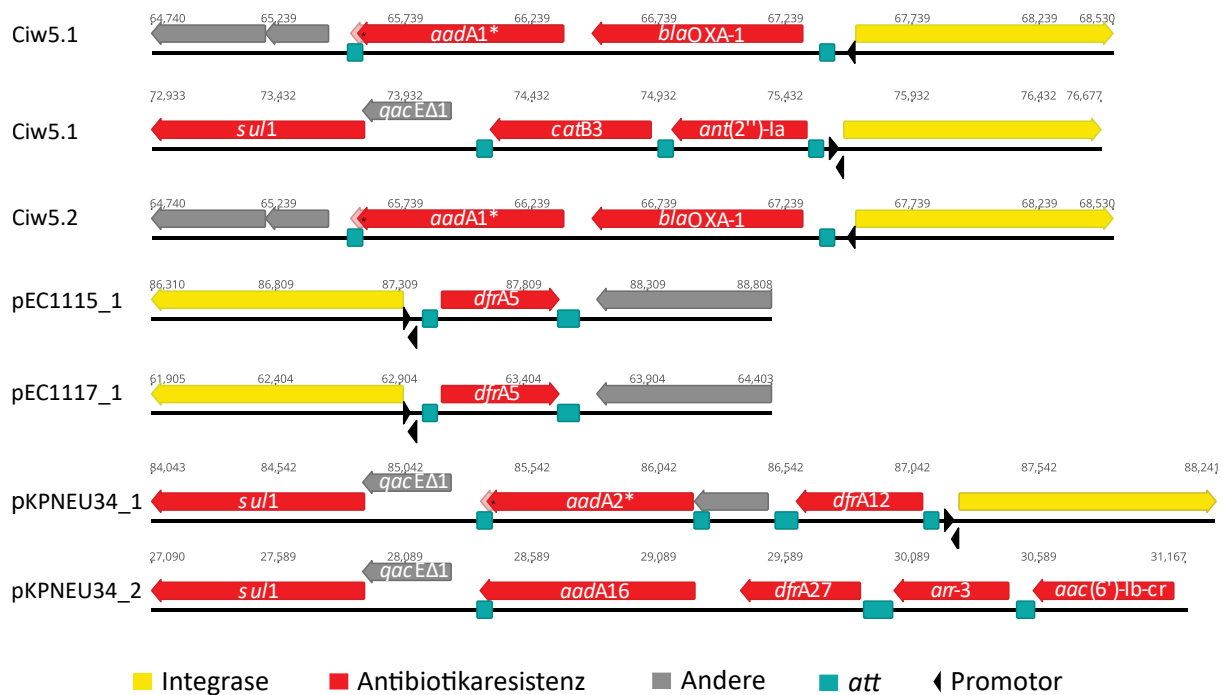


Abbildung 5: Klasse-1-Integrons, die mittels IntegronFinder auf den Chromosomen und den Plasmiden der untersuchten Enterobakterien detektiert wurden. Das Integron von pKPNEU34\_2 ist unvollständig, da eine Integron-Integrase fehlt. \*Pseudogen (PGAP).

Die Integrons von Ciw5.1, pKPNEU34\_1 und pKPNEU34\_2 zeigten das Desinfektionsmittelresistenzgen *qacEΔ1*, welches auf das Antibiotikaresistenzgen *sul1* folgte.

### 3.1.2 Phänotypische Antibiotikaresistenz der untersuchten Enterobakterien

Die 22 Enterobakterien wurden mit dem minimalen Hemmkonzentrationstest auf ihre phänotypische Antibiotikaresistenz getestet. Somit konnte außerdem ermittelt werden, welche Menge Antibiotikum [µg/ml] in dem Selektivmedium eingesetzt werden kann, um das Resistenzplasmid in den Konjugationsversuchen zu selektieren. Insgesamt zeigten die einzelnen Stämme unterschiedliche phänotypische Antibiotikaresistenzen. Teilweise waren die Stämme nur gegen eines der getesteten Antibiotika intermediär resistent bzw. resistent (Cipa6.1, Cipa6.2, Cif11, Enb12, Ec1119, Ec1120, Kva3 - Tabelle 36). Andererseits zeigte die Hälfte der Stämme Resistenzen gegen Antibiotika von mindestens drei Antibiotikaklassen. Insgesamt waren drei Stämme resistent gegen sechs (Ciw5.2) bzw. alle sieben getesteten Antibiotika (Ciw5.1 und Kpneu34).

Fast alle Stämme (86 %) waren resistent gegen Ampicillin und zwei weitere Stämme (9 %) waren intermediär resistent. Nur der Stamm Ec1120 war sensitiv gegenüber Ampicillin. Gegen Tetracyclin waren mehr als die Hälfte der Stämme (55 %) resistent. Acht (36 %) bzw. sieben Stämme (32 %) zeigten eine Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin bzw. Ciprofloxacin und nur vier Stämme (18 %) waren jeweils resistent gegen Chloramphenicol und Cefotaxim. Gegen Gentamicin waren nur die Stämme Ciw5.1 und Kpneu34 resistent (9 %).

Tabelle 36: Ergebnisse des minimalen Hemmkonzentrationstests für die 22 Enterobakterien. Die Richtgrenzwerte stammten von CLSI (2022) und für Streptomycin von NARMS (2019): Tetracyclin (TE;  $s \leq 4 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ), Streptomycin (S;  $s \leq 16 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 32 \mu\text{g/ml}$ ), Chloramphenicol (CHL;  $s \leq 8 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 32 \mu\text{g/ml}$ ), Ampicillin (AMP;  $s \leq 8 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 32 \mu\text{g/ml}$ ), Ciprofloxacin (CIP;  $s \leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 1 \mu\text{g/ml}$ ), Gentamicin (CN;  $s \leq 4 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ), Cefotaxim (CTX;  $s \leq 1 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 4 \mu\text{g/ml}$ ). Rot = resistent; gelb = intermediär; grün = sensitiv.

	Stamm	TE [ $\mu\text{g/ml}$ ]	S [ $\mu\text{g/ml}$ ]	CHL [ $\mu\text{g/ml}$ ]	AMP [ $\mu\text{g/ml}$ ]	CIP [ $\mu\text{g/ml}$ ]	CN [ $\mu\text{g/ml}$ ]	CTX [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<i>Citrobacter</i>	Cigi1	256	> 256	16	32	$\leq 0,25$	2	$\leq 0,5$
	Cipo4	256	64	8	32	$\leq 0,25$	2	$\leq 0,5$
	Ciw5.1	256	128	> 256	> 256	16	32	8
	Ciw5.2	256	128	> 256	> 256	8	1	32
	Cipa6.1	2	4	8	64	$\leq 0,25$	1	$\leq 0,5$
	Cipa6.2	2	4	8	16	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
	Cif11	2	16	8	256	$\leq 0,25$	1	1
	Cipo13	256	32	8	64	$\leq 0,25$	1	$\leq 0,5$
<i>Enterobacter</i>	Endy1	4	8	8	256	0,5	1	$\leq 0,5$
	Endy2	4	4	4	128	0,5	1	$\leq 0,5$
	Enh11	4	8	8	> 256	0,5	1	$\leq 0,5$
	Enb12	4	8	8	> 256	$\leq 0,25$	1	$\leq 0,5$
<i>Escherichia</i>	Ec1115	64	> 256	4	16	$\leq 0,25$	4	$\leq 0,5$
	Ec1117	64	> 256	8	> 256	$\leq 0,25$	1	$\leq 0,5$
	Ec1119	4	16	8	> 256	$\leq 0,25$	4	$\leq 0,5$
	Ec1120	256	16	8	8	$\leq 0,25$	2	$\leq 0,5$
<i>Klebsiella</i>	Kgr1	128	4	2	64	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
	Kva3	2	4	4	32	$\leq 0,25$	1	$\leq 0,5$
	Kpneu4	2	8	32	256	1	1	$\leq 0,5$
	Kpneu8	128	2	16	256	32	1	$\leq 0,5$
	Kpneu28	128	4	4	> 256	1	1	> 256
	Kpneu34	> 256	> 256	> 256	> 256	64	256	4

### 3.1.3 Auswahl der potenziellen Spenderstämme für Konjugationsversuche

Insgesamt wurden neun Stämme identifiziert, die 14 konjugative Plasmide besaßen. Mit der zusätzlichen Information von ResFinder bezüglich der Resistenzgene auf den Plasmiden konnten sechs Stämme mit jeweils einem konjugativen Antibiotikaresistenzplasmid gefunden werden. Da der IncF-Replikationstyp am häufigsten detektiert wurde und außerdem bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen innerhalb von *Enterobacteriaceae* eine wichtige Rolle spielt (Carattoli, 2009; Villa et al., 2010), wurden Stämme mit einem IncF-Replikon-Typ und dem Paarbildungssystem MPF<sub>F</sub> für die Konjugationsversuche ausgewählt. Insgesamt passten die Kriterien auf jeweils ein Plasmid der vier möglichen Spenderstämme Ec1115, Ec1117, Kpneu28 und Kpneu34. Zudem wurde eine phänotypische Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration mit Kanamycin und Rifampicin – Selektionsantibiotika für den Empfängerstamm CV601 – durchgeführt. Für Rifampicin ist bei CLSI (2022) kein Referenzwert vorhanden. Die Selektion sollte mit  $50 \mu\text{g/ml}$  Rifampicin durchgeführt werden (Blau et al., 2018), weshalb die MHK weniger als  $50 \mu\text{g/ml}$  betragen sollte. Kpneu34 war resistent gegen Kanamycin und wurde durch  $50 \mu\text{g/ml}$  Rifampicin nicht im Wachstum gehemmt (Tabelle 37). Deshalb wurde Kpneu34 als Spenderstamm ausgeschlossen.

Tabelle 37: Ergebnisse des minimalen Hemmkonzentrationstests für die möglichen Spenderstämme für Konjugationsversuche. Richtgrenzwert für Kanamycin-Resistenz:  $s \leq 16 \mu\text{g/ml}$ ;  $r \geq 64 \mu\text{g/ml}$  (CLSI, 2022). Eine Hemmung durch Rifampicin sollte bei  $< 50 \mu\text{g/ml}$  erfolgen.

	Rifampicin [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Kanamycin [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Kpneu28	32	2
Kpneu34	> 256	> 256
Ec1115	32	16
Ec1117	32	8

Somit wurden die *E. coli*-Stämme Ec1115, Ec1117 und der *Klebsiella*-Stamm Kpneu28 mit den Antibiotikaresistenzplasmiden pEC1115\_1 (Abbildung 6), pEC1117\_1 (Abbildung 7) und pKPNEU28\_2 (Abbildung 8) für die Konjugationsversuche ausgewählt.

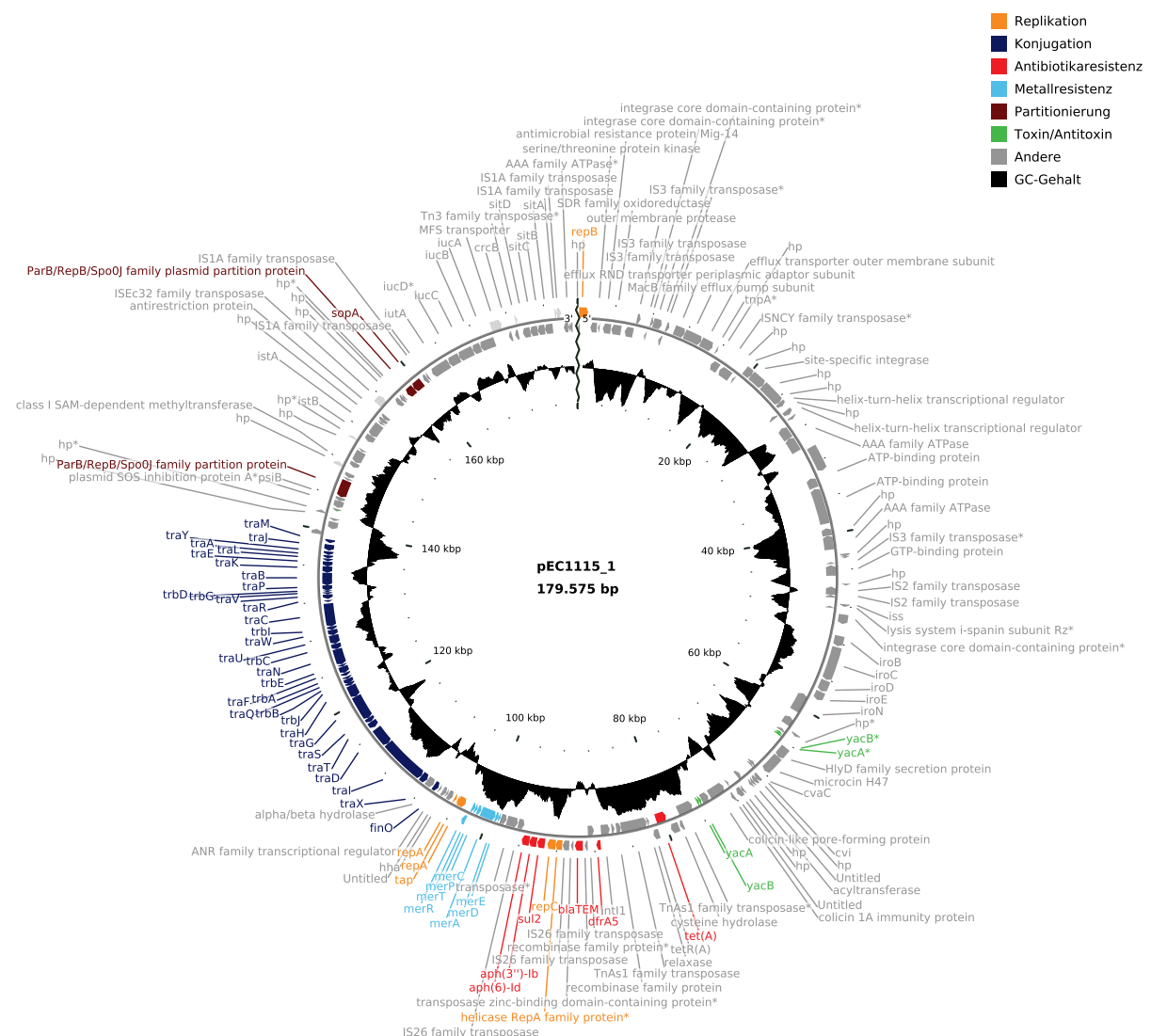


Abbildung 6: Plasmid-Karte des Antibiotikaresistenzplasmids pEC1115\_1 des Konjugations-Spenderstammes Ec1115. Die Abbildung wurde mit CGview anhand der PGAP-Annotationsdaten erstellt. Wenn keine Genbezeichnung vorhanden war, wurde die Produktbezeichnung der kodierenden Sequenz gewählt. HP = hypothetisches Protein. \*Pseudogen (PGAP).

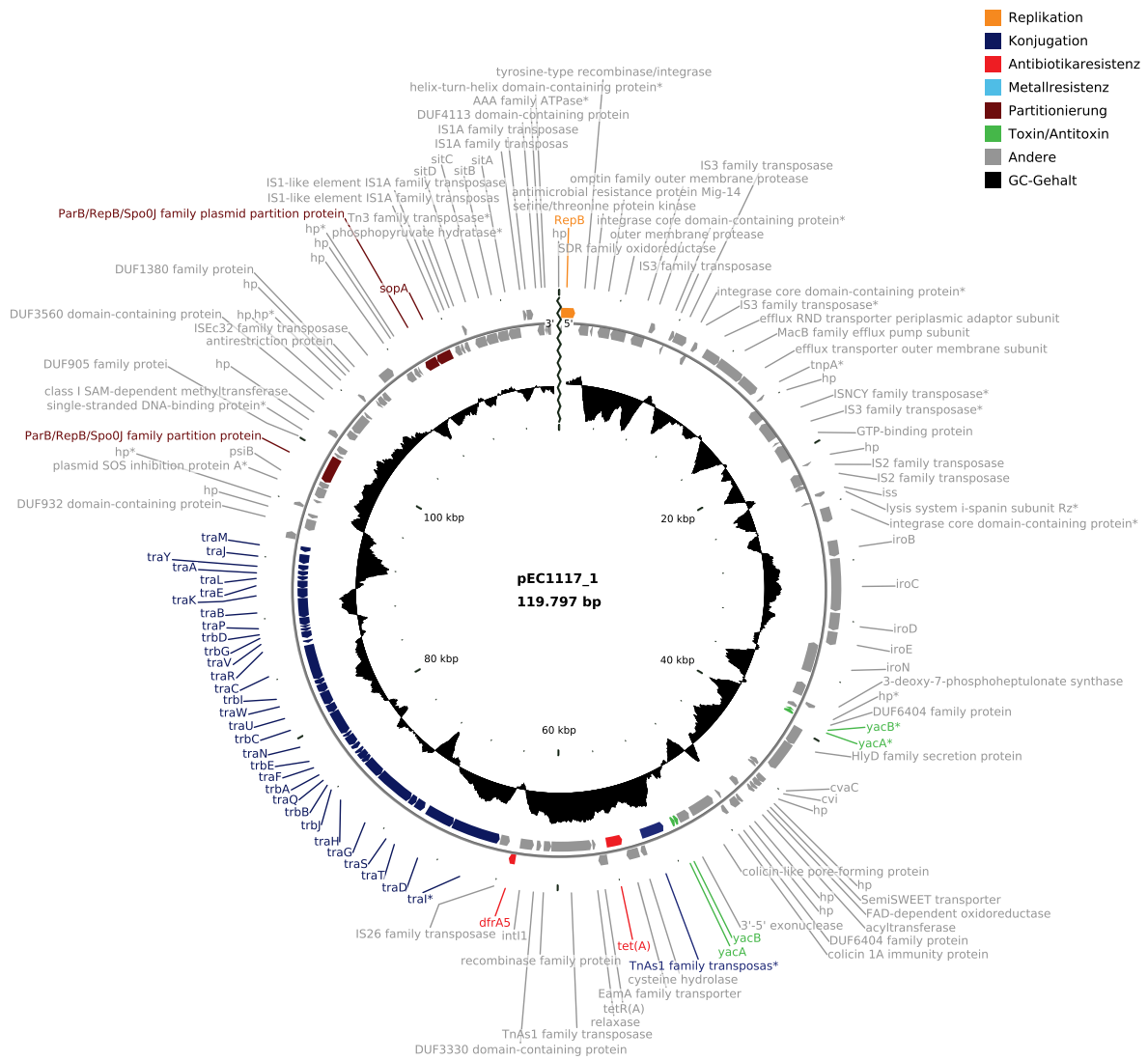


Abbildung 7: Plasmid-Karte des Antibiotikaresistenzplasmids pEC117\_1 des Konjugations-Spenderstammes Ec117. Die Abbildung wurde mit CGview anhand der PGAP-Annotationsdaten erstellt. Wenn keine Genbezeichnung vorhanden war, wurde die Produktbezeichnung der kodierenden Sequenz gewählt. HP = hypothetisches Protein. \*Pseudogen (PGAP).



### 3.2 Konjugationsversuche mit den Spenderstämmen Ec1115, Ec1117 und Kpneu28

Konjugationsversuche wurden mit den Spenderstämmen Ec1115, Ec1117, Kpneu28 (Tabelle 38) und dem Empfängerstamm CV601 durchgeführt. Zunächst sollte in den Konjugationsvorversuchen getestet werden, ob Konjugation möglich ist. Anschließend sollte die Transferhäufigkeit der Plasmide bei unterschiedlichen Nährstoffangeboten und Inkubationszeiten mit einem etablierten Spender-Empfänger-System getestet werden (Konjugationsversuche A und B).

Tabelle 38: Übersicht über die Plasmide der Spenderstämmen Ec1115, Ec1117 und Kpneu28, die für Konjugationsversuche verwendet wurden. Die konjugativen Antibiotikaresistenzplasmide sind grau hinterlegt.

Stamm	Plasmid	Sequenzlänge [bp]	Inc- / Replikon-Typen	Resistenzgene	Prognostizierte Mobilität (MPF-Typ)
Ec1115	pEC1115_1	179.575	IncFIB(AP001918), IncQ1, IncFII	<i>tet(A)</i> , <i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')</i> -Ib, <i>aph(6)</i> -Id	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	pEC1115_2	92.661	Inc11-I(Alpha)		Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
	pEC1115_3	68.264	IncFII(pHN7A8)		Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	pEC1115_4	3.374			Mobilisierbar
Ec1117	pEC1117_1	119.797	IncFIB(AP001918)	<i>tet(A)</i> , <i>dfrA5</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
Kpneu28	pKPNEU28_1	139.211	IncFIB(K)		Nicht mobilisierbar
	pKPNEU28_2	121.449	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	pKPNEU28_3	42.330			Konjugativ (MPF <sub>T</sub> )
	pKPNEU28_4	4.686	Col440I		Nicht mobilisierbar

#### 3.2.1 Konjugationsvorversuche

Für die Konjugationsvorversuche mit den Spenderstämmen Kpneu28, Ec1115, Ec1117 und dem Empfängerstamm CV601 wurde das Filtermating bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Außerdem sollte die Identitätsprüfung von Transkonjuganten mittels Multiplex-PCR getestet werden. Die Primerpaare für die Multiplex-PCR wurden zunächst in Simplex-PCRs mit den Spenderstämmen und dem Empfängerstamm getestet. Dabei konnten nach der PCR die gewünschten Banden mit erwarteter Fragmentgröße detektiert werden, und auch die Sanger-Sequenzierung ergab die Amplifikation der korrekten Zielregion. Die Primerpaare zur Detektion der Spenderstämmen und ihrer Plasmide erzeugten bei dem Empfängerstamm keine DNA-Banden auf dem Gel, wodurch die Exklusivität der Primerpaare bestätigt wurde. Weiterhin ergab auch die PCR zur Detektion des *gfp*-Gens kein Signal, wenn Spenderstämmen getestet wurden. Die jeweiligen Primerpaare waren auch kompatibel untereinander und amplifizierten die gewünschten Genabschnitte, wenn Spender- und Empfänger-DNA gleichzeitig in dem PCR-Ansatz eingesetzt wurden (Positivkontrollen). Bei den Konjugationsversuchen wurde die Identität eines Stammes als Transkonjugant bestätigt, wenn die Multiplex-PCR eine Bande für den Empfängerstamm bei 779 bp, eine Bande für das konjugative Resistenzplasmid (181 bp bis 278 bp) und keine Bande für das Spenderchromosom (410 bp bis 520 bp) zeigte (Beispiel: Abbildung 9).

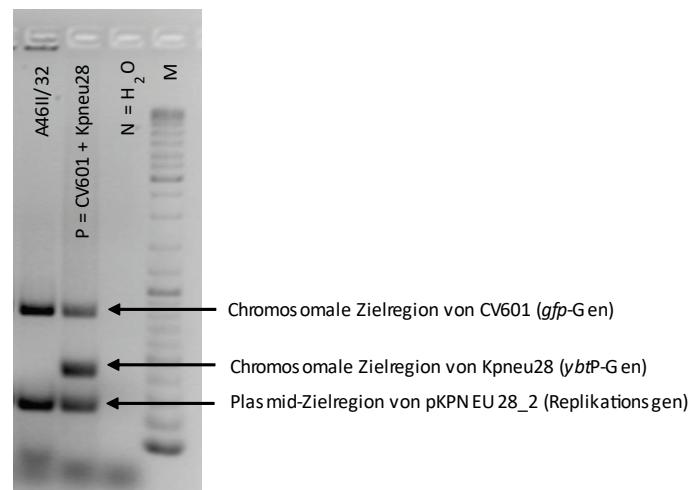


Abbildung 9: Gelelektrophorese-Ergebnis einer Multiplex-PCR zur Identifizierung des Transkonjuganten A46II/32 des Spenderstammes Kpneu28. N = Negativkontrolle; P = Positivkontrolle; M = GeneRuler DNA Ladder Mix.

Mit dem Spenderstamm Ec1117 wurden Filtermating-Experimente bei 37 °C für eine bis fünf Stunden sowie für 20 Stunden durchgeführt und zusätzlich bei 21 °C für zehn Tage. Da bei keinem dieser Versuche Transkonjuganten nachgewiesen wurden, wurde Ec1117 für die Hauptversuche nicht verwendet.

Andererseits waren die Konjugationsversuche mit den Spenderstämmen Ec1115 und Kpneu28 erfolgreich, denn Transkonjuganten konnten auf den entsprechenden Selektivagarplatten (LB+KA/RD/TE-Agar) detektiert werden. Die Transkonjuganten zeigten, wie erwartet, ein Wachstum auf den Selektivagarplatten und ein grünes Fluoreszenzsignal bei Betrachtung unter UV-Licht. Bei den Übertragungsversuchen mit dem Spender Kpneu28 konnten in allen Versuchen, bis auf die Versuche bei 4 °C für sieben Tage, Transkonjuganten detektiert werden. Bereits nach einer Stunde Konjugation wurde eine Übertragung nachgewiesen. Die Prüfung der Identität mittels Multiplex-PCR funktionierte für die Transkonjuganten des Kpneu28-Spenderstammes wie erwartet. In jedem Transkonjuganten wurde das Antibiotikaresistenzplasmid mittels PCR nachgewiesen. Insgesamt wurden von jeder erfolgreichen Konjugation ein bis zwei Stämme nach dem Zufallsprinzip ausgewählt (Tabelle 17) und mit den Sequenziergeräten MiSeq und dem MinION ganzgenomsequenziert. Mit der Sequenzierung sollten die Transkonjuganten überprüft und bestätigt werden.

Bei den Übertragungsversuchen mit dem Spenderstamm Ec1115 wurde weder nach einer Stunde bei 37 °C noch nach sieben Tagen bei 4 °C eine Übertragung nachgewiesen. Bei allen anderen Versuchen konnten Transkonjuganten detektiert werden. Die Transkonjuganten zeigten Wachstum auf dem Selektivmedium (LB+KA/RD/TE-Agar), ein grünes Fluoreszenzsignal unter UV-Licht, und ihre Identität wurde mittels Multiplex-PCR überprüft. Hier zeigte sich allerdings, dass nicht bei allen Stämmen, die auf dem LB+KA/RD/TE-Agar wuchsen, das übertragbare Resistenzplasmid (PCR-Zielsequenz: IncFIB-Replikationsregion) mit der Multiplex-PCR nachweisbar war. Die Bande für den Nachweis des *gfp*-Gens war andererseits deutlich ausgeprägt. Daraufhin wurden einige der Stämme in einer weiteren PCR auf die Anwesenheit des Resistenzgens *tet(A)* getestet. Da *tet(A)* eine Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin vermittelt, mit dem das Resistenzplasmid selektiert wurde, sollte überprüft werden, ob das Resistenzgen in den Empfänger übergegangen war. Die PCR bestätigte, dass *tet(A)* in allen getesteten



Transkonjuganten vorhanden war und somit Übertragung stattgefunden haben musste. Um herauszufinden, welche DNA-Fragmente in den Empfängerstamm übergegangen waren, wurden Stämme für die Ganzgenomsequenzierung mittels MiSeq und MinION ausgewählt. Dazu wurden Transkonjuganten mit dem erfolgreich übertragenen *tet(A)*-Resistenzgen nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Bei den Experimenten, bei denen Transkonjuganten mit und ohne Plasmid-PCR-Nachweis vorhanden waren, wurde jeweils ein Stamm mit und ein Stamm ohne Plasmid-Signal ausgewählt. Das Ziel war hierbei, die Transkonjuganten zu charakterisieren und vor allem herauszufinden, weshalb der Nachweis des übertragbaren Resistenzplasmids nicht funktionierte.

Die ganze (genomische) DNA der ausgewählten Transkonjuganten wurde mit MiSeq und MinION sequenziert und die Sequenzierdaten in einer Hybridassemblierung kombiniert. Das Chromosom der Transkonjuganten konnte nicht immer als vollständige Sequenz dargestellt werden. Das auf dem Chromosom des Empfängerstammes CV601 vorhandene Resistenzgen *aph(3')*-III, welches die Kanamycin-Resistenz vermittelt, war in jedem Transkonjuganten vorhanden. Die Transkonjuganten zeigten mit der Referenzsequenz des Empfängerstammes *E. coli* CV601 (Accession-Number bei NCBI: CP043213.1) eine Übereinstimmung von 99,9 % oder 100 % (dDDH). Die Übereinstimmung von CV601 mit den Spenderstämmen Ec1115 und Kpneu28 andererseits war wesentlich geringer und ergab Werte von 87,6 % bzw. 23,1 %. Da die chromosomale Sequenz zur Klärung der Fragestellung nicht relevant war, wurden chromosomale Fragmente von der weiteren Analyse ausgeschlossen und nur Plasmid-Sequenzen berücksichtigt. Das gilt für alle sequenzierten Transkonjuganten dieser Studie.

Die Plasmide der Transkonjuganten aus den Konjugationsvorversuchen mit dem Spender Kpneu28 und dem Empfänger CV601 sind in Tabelle 39 dargestellt. Jeder sequenzierte Transkonjugant (n = 10) des Spenders Kpneu28 besaß ein zirkuläres Plasmid. Die ResFinder- und PlasmidFinder-Ergebnisse der Transkonjuganten-Plasmide waren identisch mit dem Resistenzplasmid pKPNEU28\_2 (Tabelle 38). Die Multiplex-PCR konnte das Plasmid in jedem der Transkonjuganten nachweisen, und die IncFII-PCR-Zielregion war in allen Transkonjuganten vorhanden. Allerdings zeigte sich, dass die Größen der Plasmide teilweise von der des Resistenzplasmids pKPNEU28\_2 abwichen. Die Plasmide der Transkonjuganten A03/1, A04/1, A05/1 und A08/9 zeigten die gleiche Größe, wie pKPNEU28\_2. Der paarweise Vergleich dieser vier Transkonjuganten-Plasmide mit pKPNEU28\_2 zeigte jeweils 100 % Übereinstimmung.

Tabelle 39: Ergebnisse der bioinformatischen Auswertung der Plasmid-Sequenzen der Transkonjuganten (TK) des Spenderstammes Kpneu28.

Stamm	TK_Contig	Sequenzlänge [bp]	mol% GC-Gehalt	Vollständigkeit	Inc- /Replikon-Typen	Antibiotikaresistenzgene
A02/3	A02/3_2	164.607	51,39	Ja (zirkulär)	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
A02/27	A02/27_2	164.607	51,40	Ja (zirkulär)	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
A02/50	A02/50_3	163.294	51,39	Ja (zirkulär)	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
A03/1	A03/1_4	121.449	51,76	Ja (zirkulär)	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
A04/1	A04/1_2	121.449	51,76	Ja (zirkulär)	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
A05/1	A05/1_2	121.449	51,76	Ja (zirkulär)	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
A06/2	A06/2_2	164.606	51,40	Ja (zirkulär)	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
A07/1	A07/1_2	124.527	51,67	Ja (zirkulär)	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
A08/3	A08/3_7	165.806	51,40	Ja (zirkulär)	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
A08/9	A08/9_9	121.449	51,75	Ja (zirkulär)	IncR, IncFII(K)	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>

Neben den Plasmiden der Transkonjuganten, die mit dem Originalplasmid pKPNEU28\_2 übereinstimmten, gab es jeweils ein Plasmid in den restlichen sechs Transkonjuganten, die größer waren als das Originalplasmid. Bei näherer Betrachtung dieser Plasmide zeigte sich, dass diese eine Kombination der Originalplasmide pKPNEU28\_2 und pKPNEU28\_3 waren. Dabei war das Plasmid pKPNEU28\_2 komplett vorhanden und das Plasmid pKPNEU28\_3 komplett oder nur teilweise (A07/1\_2) integriert (Abbildung 10). Die Rekombinationsereignisse erfolgten bei allen Transkonjuganten-Plasmiden in derselben Region (siehe (B) in Abbildung 10). Die Plasmide A02/3\_2, A02/27\_2 und A06/2\_2 hatten ähnliche bzw. gleiche Größen, allerdings zeigte sich, dass das Plasmid pKPNEU28\_3 an unterschiedlichen Stellen für die Integration geöffnet wurde. Bei den Plasmiden A02/50\_3 und A07/1\_2 wurde nicht nur DNA eingebaut, sondern es kam auch an der Stelle der Integration zu Deletion von Sequenzabschnitten des Plasmids pKPNEU28\_2 (Abbildung 10). An der Stelle, an der das komplette pKPNEU28\_3 in pKPNEU28\_2 integriert wurde, wurden stets eine IS26-Genkopie und teilweise weitere Sequenzabschnitte verdoppelt. Bei dem Plasmid A07/1\_2, bei dem nur ein Teil von pKPNEU28\_3 in pKPNEU28\_2 integriert wurde, wurde keine zusätzliche IS26-Genkopie detektiert.

Von den Plasmiden pKPNEU28\_1 und pKpneu28\_4 wurden keine Sequenz-Fragmente in den Transkonjuganten detektiert.

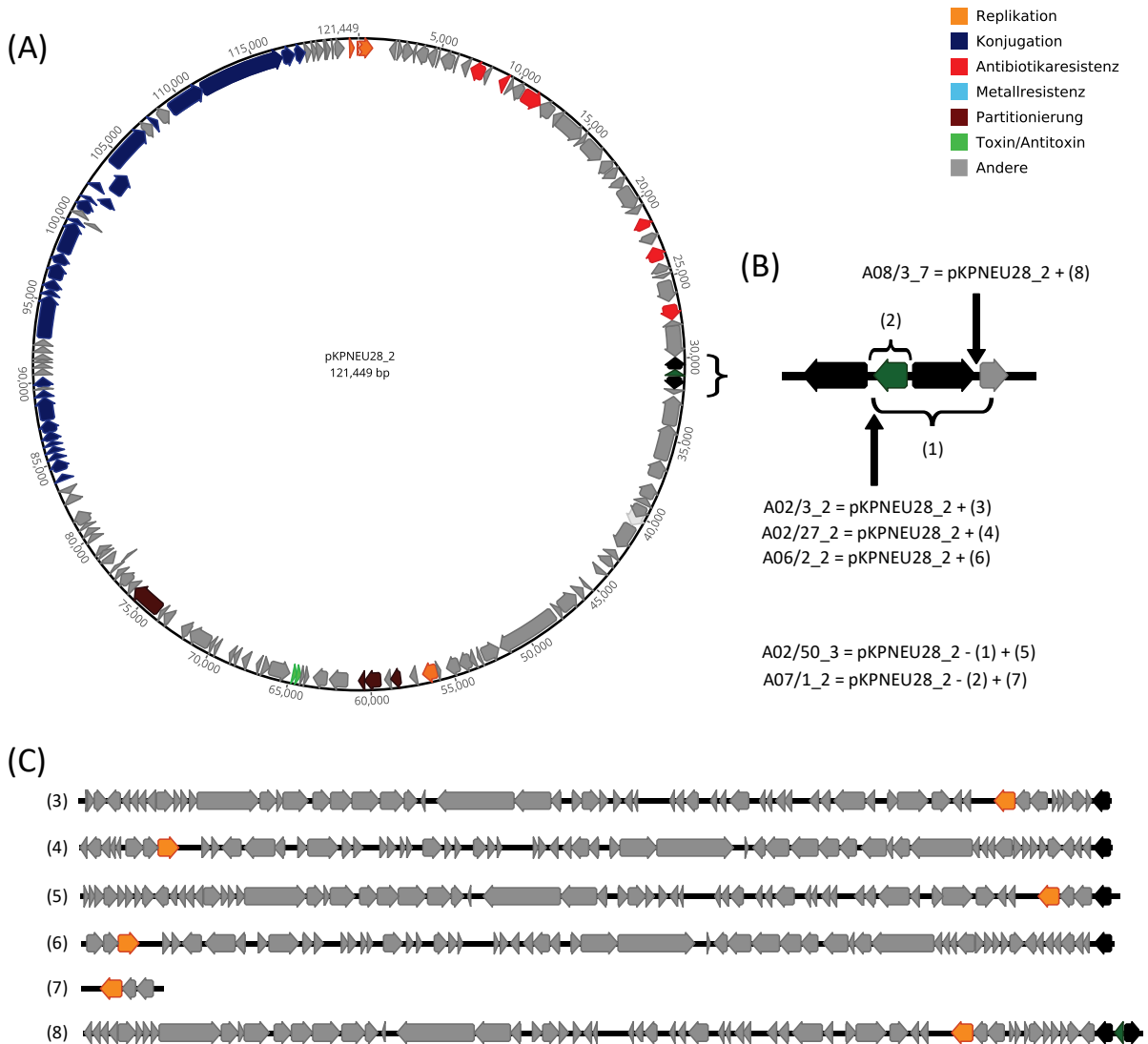


Abbildung 10: Schematische Veranschaulichung von Rekombinationen bei den Plasmiden, die in den Transkonjuganten A02/3, A02/27, A02/50, A06/2, A07/1, A08/3 des Spenderstammes Kpneu28 detektiert wurden. Dabei handelte es sich um Kombinationen der Plasmide pKPNEU28\_2 und pKPNEU28\_3 des Spenderstammes. Schwarz markiert sind für die Rekombination relevanten IS26-Genkopien. (A) Originalplasmid pKPNEU28\_2 des Spenderstammes Kpneu28. Die in (A) mit der Klammer markierte Sequenz wird in (B) vergrößert dargestellt. (B) Sequenzabschnitt des Plasmids pKPNEU28\_2, an der Integration von pKPNEU28\_3 stattfand. Pfeile: bei den angegebenen Plasmiden A02/3\_2, A02/27\_2, A06/2\_2 und A08/3\_7 lag an dieser Stelle von pKPNEU28\_2 zusätzlich die jeweilige Sequenz aus (C) integriert vor. Klammern: bei den angegebenen Plasmiden A02/50\_3 und A07/1\_2 lag anstatt dieser Sequenz von pKPNEU28\_2 die entsprechende Sequenz aus (C) vor. (C) Sequenzen der Transkonjuganten-Plasmide, die im Vergleich mit pKPNEU28\_2 zusätzlich vorhanden waren. Diese bestehen aus Sequenzen oder Sequenzanteilen (A07/1\_2) von pKPNEU28\_3 und teilweise Sequenzwiederholungen am rechten Sequenzende (alle, außer A07/1\_2). Zur Orientierung wurden in den Sequenzen (C) nur das Replikationsprotein und die duplizierten Sequenzabschnitte farblich markiert.

Von den Transkonjuganten des Spenders Ec1115 wurden Transkonjuganten – mit und ohne PCR-Nachweis des Plasmids (PCR-Zielssequenz: IncFIB-Replikationsregion) – sequenziert. In Tabelle 40 sind die Ergebnisse der assemblierten Plasmide gezeigt.

Tabelle 40: Ergebnisse der bioinformatischen Auswertung der Plasmid-Sequenzen der Transkonjuganten (TK) des Spenderstammes Ec1115. Grau markiert sind die Stämme, bei denen mittels Multiplex-PCR die PCR-Zielsequenz (IncFIB-Replikationsregion) nicht nachweisbar war.

Stamm	TK_Contig	Sequenzlänge [bp]	mol% GC-Gehalt	Vollständigkeit	Inc- / Replikon-Typen	Antibiotikaresistenzgene
C03/1	C03/1_2	239.645	50,55	Nein	IncQ1 <sup>1</sup> , IncFII, IncFII(pHN7A8), IncFIB(AP001918)	<i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id
	C03/1_3	5.488	63,32	Ja (zirkulär)		<i>tet</i> (A)
C04/1	C04/1_2	239.663	50,55	Nein	IncQ1 <sup>1</sup> , IncFII, IncFII(pHN7A8), IncFIB(AP001918)	<i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id
	C04/1_3	5.488	63,32	Ja (zirkulär)		<i>tet</i> (A)
C05/1	C05/1_2	239.663	50,55	Nein	IncFIB(AP001918), IncFII(pHN7A8), IncFII, IncQ1 <sup>1</sup>	<i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>dfrA5</i>
	C05/1_3	5.488	63,32	Ja (zirkulär)		<i>tet</i> (A)
C05/3	C05/3_2	98.505	51,63	Nein	IncFII(pHN7A8)	
	C05/3_4	5.488	63,32	Ja (zirkulär)		<i>tet</i> (A)
	C05/3_8	585	44,44	Nein	IncFII	
C06/1	C06/1_2	239.663	50,55	Nein	IncFIB(AP001918), IncFII(pHN7A8), IncFII, IncQ1 <sup>1</sup>	<i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>dfrA5</i>
	C06/1_3	5.488	63,32	Ja (zirkulär)		<i>tet</i> (A)
C07/1	C07/1_2	124.464	52,72	Ja (zirkulär)	IncQ1 <sup>1</sup> , IncI1-I(Alpha)	<i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>dfrA5</i> , <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (A)
	C07/1_3	3.374	55,19	Ja (zirkulär)		
C07/3	C07/3_2	239.663	50,55	Nein	IncQ1 <sup>1</sup> , IncFII, IncFII(pHN7A8), IncFIB(AP001918)	<i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id
	C07/3_3	5.488	63,32	Ja (zirkulär)		<i>tet</i> (A)
C08/4	C08/4_2	171.399	50,05	Nein	IncQ1 <sup>1</sup> , IncFII, IncFIB(AP001918)	<i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id
	C08/4_3	5.488	63,32	Ja (zirkulär)		<i>tet</i> (A)
C08/5	C08/5_2	89.381	53,85	Ja (zirkulär)	IncFII(pHN7A8)	<i>tet</i> (A), <i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>dfrA5</i>
C08/15	C08/15_2	89.381	53,85	Ja (zirkulär)	IncFII(pHN7A8)	<i>tet</i> (A), <i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>dfrA5</i>
C08/21	C08/21_2	212.503	52,59	Ja (zirkulär)	IncFIB(AP001918), IncQ1 <sup>1</sup> , IncFII	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (A), <i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id
C08/47	C08/47_2	171.399	50,05	Nein	IncQ1 <sup>1</sup> , IncFII, IncFIB(AP001918)	<i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id
	C08/47_3	5.488	63,32	Ja (zirkulär)		<i>tet</i> (A)
C08/102	C08/102_2	89.381	53,85	Ja (zirkulär)	IncFII(pHN7A8)	<i>tet</i> (A), <i>dfrA5</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>dfrA5</i>

<sup>1</sup> Sequenzabdeckung von 66 %.

Nicht alle Plasmide konnten vollständig zirkulär dargestellt werden (Tabelle 40). Kein Plasmid des Spenderstammes Ec1115, mit Ausnahme von pEC1115\_4 (3.374 bp), zeigte in den Transkonjuganten die zuvor beschriebenen Plasmid-Größen (Tabelle 34). Die 3.374 bp große zirkuläre DNA-Sequenz C07/1\_3 war identisch mit dem Plasmid pEC1115\_4 des Spenderstammes. Alle anderen Plasmide der Transkonjuganten waren entweder größer oder kleiner als die Originalplasmide von Ec1115 und somit Rekombinationen der Originalplasmide (Abbildung 11).

In acht der 13 Transkonjuganten waren kleine, zirkuläre 5.488 bp große DNA-Sequenzen vorhanden, die zu 100 % miteinander übereinstimmten und unter anderem das *tet(A)*-Resistenzgen und dessen Repressor *tetR(A)* besaßen. Zudem waren dort Gene vorhanden, die eine Relaxase, eine Tn3-like element TnAs1 family transposase, eine cysteine hydrolase und einen EamA family transporter kodieren, wobei die Tn3-like element TnAs1 family transposase von PGAP als Pseudogen gewertet wurde.

Die Contigs C07/1\_2 (124.464 bp), C07/1\_3 (3.374 bp), C08/5\_2 (89.381 bp), C8/15\_2 (89.381 bp), C08/21\_3 (212.503 bp) und C08/102\_2 (89.381 bp) waren zirkulär und wurden als Plasmide identifiziert. Die drei zirkulären 89.381 bp großen Plasmide (C08/5\_2, C8/15\_2, C08/102\_2) zeigten im paarweisen Vergleich eine 100 %ige Übereinstimmung. Der Replikon-Typ IncFIB wurde nicht nachgewiesen, hingegen besaßen die Plasmide den Replikon-Typ IncFII(pHN7A8) des Plasmids pEC1115\_3 und vier Resistenzgene des Plasmids pEC1115\_1. Diese waren *tet(A)*, *bla*<sub>TEM-1B</sub> und zwei Kopien von *dfrA5*.

Bei dem Plasmid C07/1\_3 handelte es sich, wie bereits erwähnt, um das Plasmid pEC1115\_4 des Originalstammes. Das Plasmid C07/1\_2 hingegen entsprach dem Plasmid pEC1115\_2 mit dem Replikon-Typen IncI1-(Alpha) und einer zusätzlichen Sequenz, die aus dem Plasmid pEC1115\_1 stammte. Dabei waren neben dem IncQ1-Replikon-Typ auch alle Resistenzgene nachweisbar, wobei *tet(A)* in zweifacher Kopie vorhanden war. C07/1 war der einzige Transkonjugant mit diesen beiden Plasmiden. Die Multiplex-PCR konnte bei diesem Stamm das IncFIB nicht nachweisen und auch mit PlasmidFinder wurde dieser Replikon-Typ nicht detektiert.

Das Plasmid C08/21\_3 lag ebenfalls zirkulär vor. Dieses Plasmid besaß die drei Replikon-Typen und alle Resistenzgene von pEC1115\_1. Die Analyse der Sequenz zeigte weiterhin, dass das *tet(A)*-Resistenzgen, inklusive umliegender Sequenzabschnitte, insgesamt sieben Mal hintereinander vorlag.

Weiterhin wurden unvollständige, nicht zirkuläre Contigs unterschiedlicher Größe detektiert, die Plasmid-Eigenschaften aufwiesen: C05/3\_8 (585 bp), C05/3\_8, (98.505 bp), C08/4\_2 (171.399 bp), C08/47\_2 (171.399 bp), C03/1\_2 (239.645 bp), C04/1\_2 (239.663 bp), C05/1\_2 (239.663 bp), C06/1\_2 (239.663 bp) und C07/3\_2 (239.663 bp). Die Analyse der Sequenzen von den insgesamt fünf Contigs über 200 kbp erbrachte, dass es sich hierbei um Kombinationen der Plasmide pEC1115\_1 und pEC1115\_3 handelte. Alle Replikon-Typen der beiden Originalplasmide waren vorhanden (IncFIB(AP001918), IncFII(pHN7A8), IncFII, IncQ1). Das Plasmid pEC1115\_3 wurde vollständig in das Plasmid pEC1115\_1 integriert. Dabei wurde pEC1115\_3 an derselben Stelle eingefügt. Alle Resistenzgene von pEC1115\_1 waren vorhanden, außer dem Resistenzgen *tet(A)*, welches in diesen Stämmen als zirkuläres DNA-Fragment vorlag. Die Plasmide konnten an der Stelle, an der das *tet(A)*-

Resistenzgenen und die umliegende Sequenzregion im Originalplasmid vorlagen, nicht vervollständigt werden. Die 239.663 bp großen Sequenzen zeigten im paarweisen Vergleich eine 100 %ige Übereinstimmung.

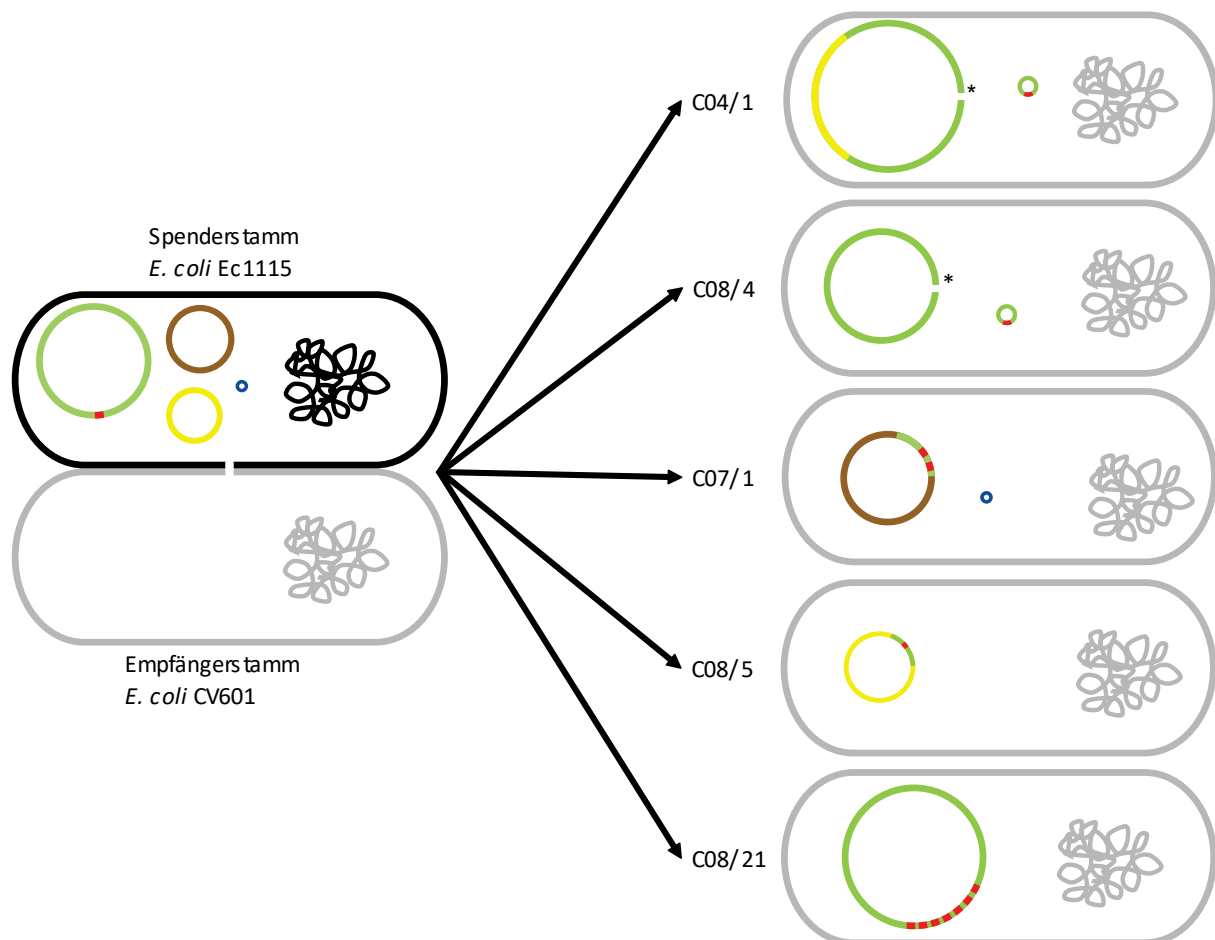


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Konjugation zwischen dem Spender Ec1115 und dem Empfänger CV601 (links) sowie den daraus resultierenden Transkonjuganten mit den detektierten Plasmiden (rechts). Die Plasmide im Spenderstamm sind in unterschiedlichen Farben dargestellt: grün = pEC1115\_1; braun = pEC1115\_2; gelb = pEC1115\_3; blau = pEC1115\_4. Das Tetracyclin-Resistenzgen ist rot markiert. Bei den in den Transkonjuganten detektierten Plasmiden handelte es sich um Rekombinationen der Plasmide des Spenderstammes. \*nicht zirkulär/nicht vollständig.

Zwei weitere Transkonjuganten zeigten identische extrachromosomale DNA-Fragmente. Die Stämme C08/4 und C08/47 besaßen jeweils ein DNA-Fragment, welches 171.399 bp groß war und nicht zirkularisiert werden konnte. Die beiden DNA-Fragmente zeigten eine Übereinstimmung von 100 %. Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich hierbei um das unvollständige Plasmid pEC1115\_1 handelte. Die Replikon-Typen IncFIB, IncFII, IncQ1 des Plasmids pEC1115\_1 mit allen Resistenzgenen des Originalplasmids mit Ausnahme von *tet(A)* waren vorhanden. Ähnlich wie die Plasmide mit einer Sequenzgröße von mehr als 200 kbp, waren diese Plasmide an der gleichen Stelle nicht zu schließen, während die 5.488 bp große Sequenz mit dem Resistenzgen *tet(A)* zirkulär vorlag.

Der Transkonjugant C05/3 zeigte neben der zirkulären 5.488 bp großen DNA-Sequenz zwei weitere unvollständige Contigs. Das Contig C05/3\_2 zeigte große Übereinstimmung mit dem pEC1115\_3-Originalplasmid und zusätzlich DNA-Abschnitte des Plasmids pEC1115\_1. Auf dem 585 bp großen Contig wurde der IncFII-Replikon-Typ von pEC1115\_1 detektiert. IncFIB wurde weder mittels Multiplex-PCR noch mittels PlasmidFinder in den Sequenzdaten nachgewiesen.

Das 5.488 bp große Fragment, das in den Transkonjuganten teilweise extrachromosomal und zirkulär vorlag, war im Spenderstamm Ec1115 nicht als zirkuläres extrachromosomales DNA-Fragment vorhanden, sondern war Teil des Plasmids pEC1115\_1. Auch in den Plasmiden der Transkonjuganten C07/1\_2 und C08/21\_3, die mehrere Kopien von *tet(A)* zeigten, war dieses identische 5.488 bp große Fragment mehrfach hintereinander eingebaut.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Multiplex-PCR bei den Transkonjugaten die jeweiligen Replikon-Typen (IncFII von pKPNEU28\_2 bzw. IncFIB von pEC1115\_1) überall dort detektieren konnte, wo auch bei der Sequenzierung das jeweilige Replikon nachgewiesen wurde. Bei den meisten Transkonjuganten wurden Rekombinationen der in den Spenderstämmen Kpneu28 bzw. Ec1115 vorhandenen Plasmide festgestellt. Dabei zeigte sich bei den Transkonjuganten des Kpneu28-Spenders jedoch weniger Rekombination und kein Co-Transfer von Plasmiden. Die Plasmide pKPNEU28\_1 und pKPNEU28\_4 wurden weder im Ganzen noch als Kombination mit den anderen beiden Plasmiden detektiert. Zwischen den Plasmiden pKPNEU28\_2 und pKPNEU28\_3 gab es allerdings Rekombinationen. Dabei fanden die Rekombinationen in der gleichen Region im Plasmid statt. Die Replikon-Typen und die Resistenzgene waren sowohl untereinander als auch verglichen mit dem Plasmid pKPNEU28\_2 identisch. Aufgrund dieser Regelmäßigkeit und der guten Detektion des Plasmids mit der Multiplex-PCR wurde dieser Stamm für die Hauptversuche ausgewählt.

Bei den Transkonjuganten des Spenders Ec1115 waren die Rekombinationen vielfältiger. Jedes der vier Plasmide von Ec1115 wurde komplett oder teilweise in mindestens einem der Transkonjuganten wiedergefunden. Zusätzlich waren unterschiedlich viele Resistenzgene in die Transkonjuganten übergegangen. In einem Transkonjuganten wurde nur *tet(A)* detektiert, in anderen waren *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *dfrA5* und *tet(A)* oder alle Resistenzgene von pEC1115\_1 übergegangen. Einzelne Resistenzgene (*tet(A)*, *dfrA5*) wurden in den Plasmiden der Transkonjuganten mehrfach detektiert. Auch die Größen der Plasmide ließen darauf schließen, dass Rekombination und Genaustausch stattgefunden hatten. Resistenzgene, die im Spenderstamm auf pEC1115\_1 mit den Replikon-Typen IncFIB/IncFII/IncQ1 lagen, wurden in den Transkonjuganten auf Plasmiden mit den Replikon-Typen IncI1/IncQ1, IncFII(pHN7A8), IncFIB/IncFII/IncQ1 oder IncFIB/IncFII/IncFII(pHN7A8)/IncQ1 gefunden. Das *tet(A)*-Resistenzgen wurde zusätzlich als zirkuläres extrachromosomales DNA-Fragment ohne einen Replikon-Typ detektiert. Durch Rekombinationen entstanden unterschiedliche Plasmide, die das *tet(A)*-Resistenzgen trugen und zu Tetracyclin-resistenten Transkonjuganten führten. Der Spenderstamm Ec1115 wurde deshalb für die Konjugationsversuche zum Vergleich der Transferraten nicht verwendet.

### 3.2.2 Konjugationsversuche A

Bei den Konjugationsversuchen auf LB- und Salat-Agar bei 37 °C für 22 Stunden und bei 21 °C für vier Tage war ein Plasmid-Transfer zwischen dem Spenderstamm Kpneu28 und dem Empfängerstamm CV601 nachweisbar. Die Transferraten auf Salat-Agar waren sowohl bei 37 °C als auch bei 21 °C signifikant höher als bei gleichen Temperaturen auf LB-Agar (Tabelle 41, Abbildung 12). Allerdings zeigten die Endkeimzahlen des Empfängerstammes, dass dessen Wachstum auf LB-Agar besser war als auf Salat-Agar. Auf Salat-Agar waren die Transferraten bei 37 °C signifikant höher als bei 21 °C. Auf LB-Agar gab es bei diesen Temperaturen hingegen keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 41: Transferraten der Konjugationsversuche mit dem Spender Kpneu28 und dem Empfänger CV601 auf Salat- und LB-Agar. Transferraten = TK [KbE/ml]/CV601 [KbE/ml]. TK = Transkonjuganten.

Konjugation	Konjugationsbedingungen	Konjugationsmedium	Keimzahl		Transferraten (log <sub>10</sub> -transformiert)
			TK [KbE/ml]	CV601 [KbE/ml]	
A26 I	37 °C, 22 h	LB-Agar	1,19*10 <sup>4</sup>	3,47*10 <sup>8</sup>	3,43*10 <sup>-5</sup> (-4,46)
A26 II	37 °C, 22 h	LB-Agar	1,15*10 <sup>4</sup>	8,17*10 <sup>8</sup>	1,41*10 <sup>-5</sup> (-4,85)
A65 I	37 °C, 22 h	LB-Agar	1,20*10 <sup>5</sup>	1,20*10 <sup>9</sup>	1,00*10 <sup>-4</sup> (-4,00)
A65 II	37 °C, 22 h	LB-Agar	4,00*10 <sup>4</sup>	8,90*10 <sup>8</sup>	4,49*10 <sup>-5</sup> (-4,35)
A27 I	37 °C, 22 h	Salat-Agar	1,69*10 <sup>5</sup>	1,23*10 <sup>8</sup>	1,37*10 <sup>-3</sup> (-2,86)
A27 II	37 °C, 22 h	Salat-Agar	6,75*10 <sup>5</sup>	1,25*10 <sup>8</sup>	5,40*10 <sup>-3</sup> (-2,27)
A64 I	37 °C, 22 h	Salat-Agar	3,00*10 <sup>6</sup>	2,40*10 <sup>8</sup>	1,25*10 <sup>-2</sup> (-1,90)
A64 II	37 °C, 22 h	Salat-Agar	4,00*10 <sup>6</sup>	2,10*10 <sup>8</sup>	1,90*10 <sup>-2</sup> (-1,72)
A28 I	21 °C, 4 d	LB-Agar	1,82*10 <sup>4</sup>	6,40*10 <sup>8</sup>	2,84*10 <sup>-5</sup> (-4,55)
A28 II	21 °C, 4 d	LB-Agar	1,00*10 <sup>4</sup>	8,13*10 <sup>8</sup>	1,23*10 <sup>-5</sup> (-4,91)
A42 I	21 °C, 4 d	LB-Agar	5,95*10 <sup>3</sup>	1,04*10 <sup>9</sup>	5,72*10 <sup>-6</sup> (-5,24)
A42 II	21 °C, 4 d	LB-Agar	1,11*10 <sup>4</sup>	1,09*10 <sup>9</sup>	1,01*10 <sup>-5</sup> (-4,99)
A29 I	21 °C, 4 d	Salat-Agar	1,07*10 <sup>4</sup>	9,19*10 <sup>7</sup>	1,16*10 <sup>-4</sup> (-3,94)
A29 II	21 °C, 4 d	Salat-Agar	1,66*10 <sup>4</sup>	9,59*10 <sup>7</sup>	1,73*10 <sup>-4</sup> (-3,76)
A60 I	21 °C, 4 d	Salat-Agar	3,05*10 <sup>4</sup>	3,27*10 <sup>8</sup>	9,34*10 <sup>-5</sup> (-4,03)
A60 II	21 °C, 4 d	Salat-Agar	3,70*10 <sup>4</sup>	2,00*10 <sup>8</sup>	1,85*10 <sup>-4</sup> (-3,73)
A30 I	10 °C, 4 d	LB-Agar	0,00	2,70*10 <sup>7</sup>	
A30 II	10 °C, 4 d	LB-Agar	0,00	2,90*10 <sup>7</sup>	
A44 I	10 °C, 4 d	LB-Agar	0,00	5,03*10 <sup>7</sup>	
A44 II	10 °C, 4 d	LB-Agar	0,00	9,47*10 <sup>7</sup>	
A31 I	10 °C, 4 d	Salat-Agar	0,00	1,77*10 <sup>7</sup>	
A31 II	10 °C, 4 d	Salat-Agar	0,00	2,23*10 <sup>7</sup>	
A45 I	10 °C, 4 d	Salat-Agar	0,00	6,13*10 <sup>6</sup>	
A45 II	10 °C, 4 d	Salat-Agar	0,00	2,70*10 <sup>6</sup>	

Auf LB- und Salat-Agar wurde außerdem getestet, ob der Transfer des Resistenzplasmids auch bei 10 °C möglich war. Dies wurde jeweils zweimal in Doppelbestimmung getestet. Bei keinem der Versuche wurden Transkonjuganten detektiert.



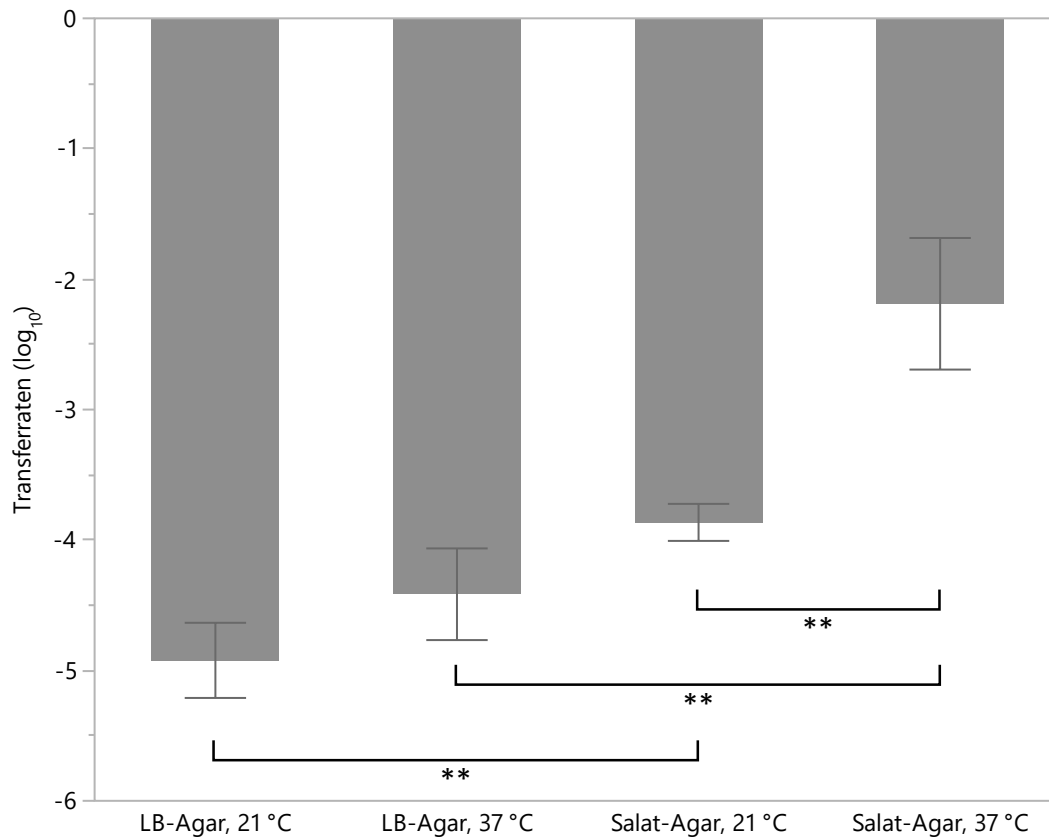


Abbildung 12: Mittelwerte der  $\log_{10}$ -transformierten Transferraten der Konjugationsversuche mit dem Spender Kpneu28 und dem Empfänger CV601 auf LB- und Salat-Agar bei 21 °C und 37 °C. Zusätzlich zum Mittelwert sind die Standardabweichungen angegeben. \*\*: hoch signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,01$  (Tukey-HSD-Post-Hoc-Test).

Um zu überprüfen, ob ein Transfer unterhalb der Nachweisgrenze stattfand, wurde der 10-°C-Versuch mit anschließendem Anreicherungsschritt durchgeführt. Die Konjugation fand also bei 10 °C für vier Tage statt. Anschließend wurde der Membranfilter zur Anreicherung von Transkonjuganten in LB-Bouillon mit Kanamycin [50 µg/ml], Rifampicin [50 µg/ml] und Tetracyclin [50 µg/ml] bei 37 °C für eine Nacht bebrütet. Bei keinem der zehn Übertragungsversuche auf Salat-Agar mit anschließender Anreicherung wurden Transkonjuganten detektiert. Hingegen wurden bei dem Versuch auf LB-Agar bei vier der zehn Versuche nach Anreicherung Transkonjuganten zwischen 10 KbE/ml und 265 KbE/ml detektiert.

### 3.2.3 Konjugationsversuche B

Die Transferraten waren bei 37 °C auf Sprossen signifikant höher als auf Mischsalat (Abbildung 13). Allerdings zeigten die Ergebnisse auch, dass sich die Transferraten zwischen den Mischsalat-Proben MS4 und MS12 stärker unterschieden, als die Transferraten zwischen den Sprossen-Proben SP2 und SP6. Die Transferraten der Versuche A/MS12-β I und A/MS12-β II waren deutlich geringer als die Transferraten der Versuche A/MS4-β I und A/MS4-β II (Tabelle 42).

Tabelle 42: Transferraten der Konjugationsversuche B mit dem Spender Kpneu28 und dem Empfänger CV601 auf Sprossen (SP) und Mischsalat (MS). Transferraten = TK [KbE/ml]/CV601 [KbE/ml]. TK = Transkonjuganten. \*\* Kolonien sichtbar, aber < 10 Kolonien/Platte.

Konjugation	Konjugations- bedingungen	Konjugations- medium	Keimzahl		Transferraten (log <sub>10</sub> -transformiert)
			TK [KbE/ml]	CV601[KbE/ml]	
A/SP2-β I	37 °C, 22 h	Sprossen	1,34*10 <sup>6</sup>	9,84*10 <sup>8</sup>	1,36*10 <sup>-3</sup> (-2,87)
A/SP2-β II	37 °C, 22 h	Sprossen	7,00*10 <sup>5</sup>	8,03*10 <sup>8</sup>	8,71*10 <sup>-4</sup> (-3,06)
A/SP6-β I	37 °C, 22 h	Sprossen	1,75*10 <sup>5</sup>	5,37*10 <sup>8</sup>	3,26*10 <sup>-4</sup> (-3,49)
A/SP6-β II	37 °C, 22 h	Sprossen	4,40*10 <sup>5</sup>	5,30*10 <sup>8</sup>	8,30*10 <sup>-4</sup> (-3,08)
A/MS4-β I	37 °C, 22 h	Mischsalat	3,50*10 <sup>5</sup>	1,03*10 <sup>9</sup>	3,40*10 <sup>-4</sup> (-3,47)
A/MS4-β II	37 °C, 22 h	Mischsalat	7,80*10 <sup>4</sup>	7,42*10 <sup>8</sup>	1,05*10 <sup>-4</sup> (-3,98)
A/MS12-β I	37 °C, 22 h	Mischsalat	1,75*10 <sup>3</sup>	4,57*10 <sup>8</sup>	3,83*10 <sup>-6</sup> (-5,42)
A/MS12-β II	37 °C, 22 h	Mischsalat	1,00*10 <sup>3</sup>	1,30*10 <sup>9</sup>	7,67*10 <sup>-7</sup> (-6,11)
A/SP6-γ I	10 °C, 4 d	Sprossen	0,00	2,57*10 <sup>8</sup>	0,00
A/SP6-γ II	10 °C, 4 d	Sprossen	0,00	2,90*10 <sup>8</sup>	0,00
A/SP6-δ I	10 °C, 4 d	Sprossen	0,00**	4,40*10 <sup>8</sup>	
A/SP6-δ II	10 °C, 4 d	Sprossen	0,00**	2,20*10 <sup>8</sup>	
A/MS12-γ I	10 °C, 4 d	Mischsalat	0,00	2,87*10 <sup>8</sup>	0,00
A/MS12-γ II	10 °C, 4 d	Mischsalat	0,00	2,47*10 <sup>8</sup>	0,00
A/MS12-δ I	10 °C, 4 d	Mischsalat	0,00**	3,90*10 <sup>8</sup>	
A/MS12-δ II	10 °C, 4 d	Mischsalat	0,00**	2,80*10 <sup>8</sup>	

Bei den Konjugationsversuchen auf Sprossen und auf Mischsalat bei 10 °C für vier Tage zeigten sich jeweils in zweien der vier Versuche einige wenige Transkonjuganten, allerdings weniger als 10 Kolonien pro Platte (Tabelle 42). Die PCR bestätigte, dass es sich dabei um Transkonjuganten handelte.

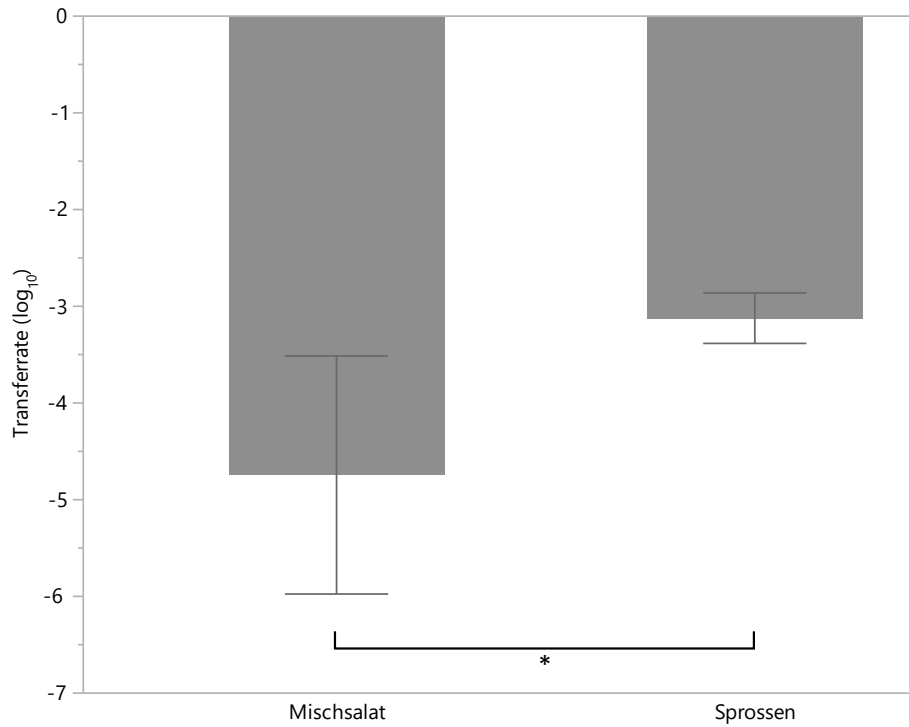


Abbildung 13: Mittelwerte der log<sub>10</sub>-transformierten Transferraten der Konjugationsversuche mit dem Spender Kpneu28 und dem Empfänger CV601 auf Mischsalat und Sprossen bei 37 °C. Zusätzlich zum Mittelwert sind die Standardabweichungen angegeben. \*: signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$  (Tukey-HSD-Post-Hoc-Test).

### 3.3 Exogene Plasmid-Isolierung von Antibiotikaresistenzplasmiden unbekannter Spender auf Sprossen

Tetracycline bzw.  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sind in der Veterinär- bzw. Humanmedizin für die Behandlung von Infektionen mit Enterobakterien von großer Bedeutung (De Briyne et al., 2014; Collignon et al., 2016; Velazquez-Meza et al., 2022). Bei der exogenen Plasmid-Isolierung sollten deshalb Plasmide selektiert werden, die eine phänotypische Tetracyclin- bzw. Cefotaxim-Resistenz vermitteln. Mit der exogenen Plasmid-Isolierung sollte getestet werden, ob Plasmide von Bakterien der Sprossenmikrobiota in einen Rezipienten übertragen werden können (Abbildung 14).

Um die Sprossenmixe für die Versuche verwenden zu können, wurde eine *real time* PCR zur Detektion von Shigatoxin-Genen durchgeführt. Dabei wurden keine Shigatoxin-Gene nachgewiesen.

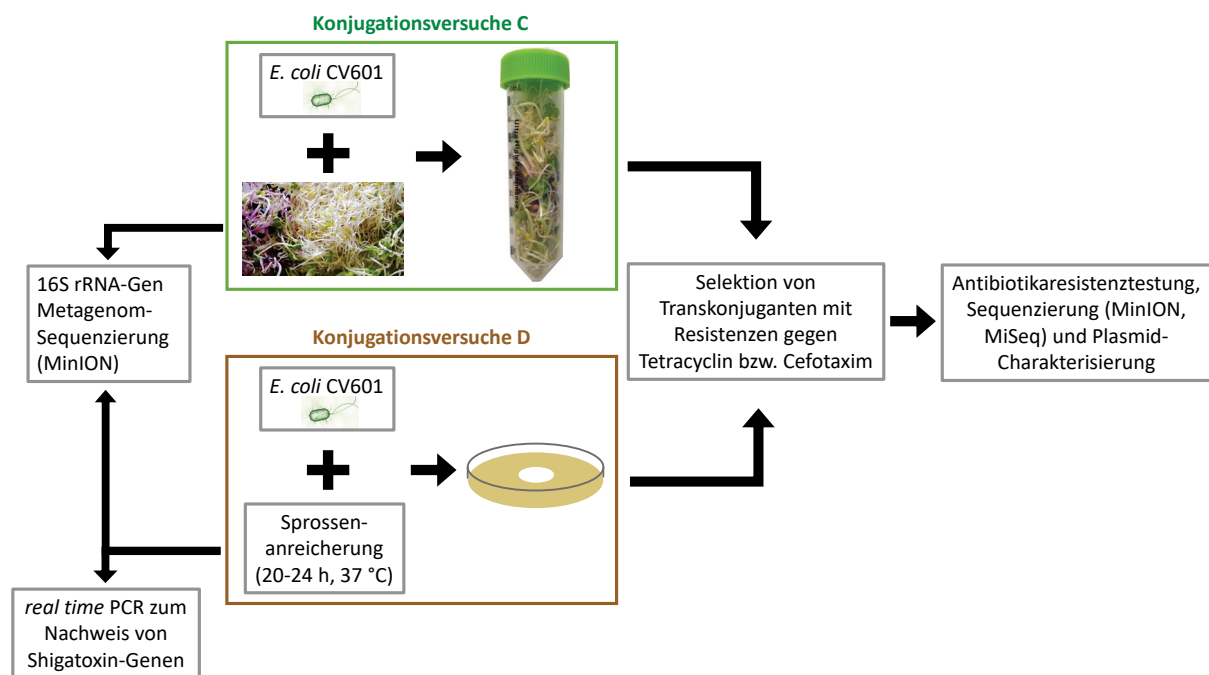


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der exogenen Plasmid-Isolierung. Konjugation wurde mit dem Empfängerstamm CV601 auf den Sprossen (Konjugationsversuche C) bzw. mit der Sprossen-anreicherung (Konjugationsversuche D) durchgeführt. Die Transkonjuganten wurden charakterisiert und die Sprossenmikrobiota mittels 16S rRNA-Gen Metagenom-Sequenzierung analysiert.

### Konjugationsversuche C

Für den Konjugationsversuch C wurde der Empfängerstamm gemeinsam mit den Sprossen inkubiert. Die Versuche wurden bei 10 °C für vier Tage und bei 37 °C für 22 Stunden durchgeführt und insgesamt wurden fünf Sprossenmische getestet. Die Konjugationen bei 10 °C ergaben nach vier Tagen keine Transkonjuganten. Ebenso wenig wurden Cefotaxim-resistente Transkonjuganten nach der Konjugation bei 37 °C gefunden (SP7, SP8, SP9, SP10, SP11). Die Konjugationsversuche bei 37 °C erbrachten Tetracyclin-resistente Transkonjuganten. Von den vier Sprossenmischen (SP7, SP8, SP9, SP10) wurden insgesamt 40 Tetracyclin-resistente Transkonjuganten (5 pro Doppelbestimmung) nach dem Zufallsprinzip für die MiSeq- und MinION-Sequenzierung ausgewählt. Zuvor wurde das *gfp*-Gen mittels Multiplex-PCR erfolgreich nachgewiesen. Weiterhin wurde mit dem Agardiffusionstest das phänotypische Resistenzprofil der Transkonjuganten ermittelt.

### Konjugationsversuche D

Für den Konjugationsversuch D wurde der Empfängerstamm gemeinsam mit dem Überstand von in Peptonwasser angereichertem Sprossenmix inkubiert. Die Versuche wurden in Doppelbestimmung mit den Sprossen SP7 bei 10 °C für vier Tage und bei 37 °C für 22 Stunden durchgeführt. Transkonjuganten wurden auf Selektivagarplatten mit Kanamycin, Rifampicin und Tetracyclin bzw. Cefotaxim isoliert, wobei bei keinem der Versuche Transkonjuganten detektiert wurden. Da die Konjugationsversuche C mit dem gleichen Sprossenmix (SP7) Transkonjuganten ergaben, wurde der Versuchsaufbau D nicht weiter durchgeführt.

#### 3.3.1 Phänotypische Antibiotikaresistenzbestimmung der Transkonjuganten

Die 40 Transkonjuganten mit den unbekanntem Plasmiden wurden mittels Agardiffusionstest auf ihre phänotypische Resistenz gegen ausgewählte Antibiotika getestet. Eine phänotypische Resistenz ergab sich durch den Vergleich der gemessenen Hemmhofdurchmesser mit den Grenzwerten des CLSI (2022).

Alle Transkonjuganten waren sensitiv gegenüber den Antibiotika Meropenem, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Cefpodoxim und Streptomycin. Die Ergebnisse des Agardiffusionstests mit Tetracyclin und Trimethoprim / Sulfamethoxazol sind in Tabelle 43 gezeigt. Gegen Tetracyclin waren alle Stämme entweder resistent oder intermediär resistent. Insgesamt 15 Transkonjuganten waren sensitiv gegenüber Trimethoprim / Sulfamethoxazol, die restlichen Transkonjuganten waren resistent.

Tabelle 43: Ergebnisse des Agardiffusionstests der Transkonjuganten der exogenen Plasmid-Isolierungsversuche. Alle Stämme waren sensitiv gegenüber Meropenem, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Cefpodoxim und Streptomycin. Die Referenzwerte stammen von CLSI (2022): Tetracyclin (TE;  $r \leq 11$  mm;  $s \geq 15$  mm), Trimethoprim / Sulfamethoxazol (SXT;  $r \leq 10$  mm;  $s \geq 16$  mm). Rot = resistent; gelb = intermediär; grün = sensitiv.

Stamm	TE30	SXT25	Stamm	TE30	SXT25
X/SP7-Cal/2	Rot	Rot	X/SP9-Cal/3	Rot	Rot
X/SP7-Cal/7	Rot	Rot	X/SP9-Cal/7	Gelb	Rot
X/SP7-Cal/11	Rot	Rot	X/SP9-Cal/11	Rot	Grün
X/SP7-Cal/13	Rot	Rot	X/SP9-Cal/14	Rot	Grün
X/SP7-Cal/19	Rot	Rot	X/SP9-Cal/18	Gelb	Rot
X/SP7-Cal/2	Rot	Rot	X/SP9-Cal/1	Gelb	Rot
X/SP7-Cal/3	Rot	Rot	X/SP9-Cal/6	Rot	Rot
X/SP7-Cal/5	Rot	Rot	X/SP9-Cal/13	Gelb	Rot
X/SP7-Cal/6	Rot	Rot	X/SP9-Cal/16	Gelb	Rot
X/SP7-Cal/7	Rot	Rot	X/SP9-Cal/20	Gelb	Rot
X/SP8-Cal/1	Rot	Rot	X/SP10-Cal/3	Rot	Grün
X/SP8-Cal/5	Rot	Grün	X/SP10-Cal/7	Rot	Grün
X/SP8-Cal/8	Rot	Grün	X/SP10-Cal/9	Rot	Grün
X/SP8-Cal/13	Rot	Grün	X/SP10-Cal/14	Rot	Grün
X/SP8-Cal/19	Rot	Rot	X/SP10-Cal/19	Rot	Grün
X/SP8-Cal/1	Rot	Rot	X/SP10-Cal/2	Rot	Grün
X/SP8-Cal/7	Rot	Rot	X/SP10-Cal/5	Rot	Grün
X/SP8-Cal/13	Rot	Rot	X/SP10-Cal/9	Rot	Grün
X/SP8-Cal/16	Rot	Rot	X/SP10-Cal/13	Rot	Grün
X/SP8-Cal/19	Rot	Rot	X/SP10-Cal/17	Rot	Grün

### 3.3.2 Genotypische Charakterisierung der von Sprossen exogen eingefangenen Plasmiden

Die 40 Transkonjuganten der exogenen Plasmid-Isolierung wurden sequenziert (MinION, MiSeq), die Sequenzierdaten mittels Unicycler kombiniert und die Daten bioinformatisch ausgewertet, um die unbekanntes Antibiotikaresistenzplasmide zu charakterisieren.

Wie schon in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurde die chromosomale DNA ebenfalls sequenziert und assembliert. Die Chromosome konnten teilweise vollständig und teilweise auf mehrere Contigs verteilt dargestellt werden. Das Genom des Empfängerstammes ist bekannt und ist für die Beantwortung der Fragestellungen nicht relevant. Jedoch wurde mit dem ResFinder bestätigt, dass das Kanamycin-Resistenzgen (*aph(3')-III*) vorhanden war. Mittels dDDH wurden die assemblierten Transkonjuganten mit der Referenzsequenz des Empfängerstammes CV601 (Accession-Number bei NCBI: CP043213.1) verglichen – die Übereinstimmungen lagen bei 99,9 % bzw. 100 %.



Weitere zwölf der 40 Transkonjuganten zeigten Plasmide mit ähnlichen Charakteristika. Diese zwölf Antibiotikaresistenzplasmide variierten in der Größe: 179.751 bp (n = 2), 179.659 bp (n = 1), 180.007 bp (n = 8), 181.207 bp (n = 1). Alle zwölf Antibiotikaresistenzplasmide zeigten den Replikon-Typ IncFIB(K) und besaßen nur das Resistenzgen *tet(D)*. Während die Transkonjuganten X/SP10-CaI/19 und X/SP10-CaII/17 nur ein Plasmid besaßen, wiesen die anderen zehn Transkonjuganten neben dem Antibiotikaresistenzplasmid, auch Col-Plasmide auf. Diese waren entweder das 3.574 bp große Col(pHAD28)-Plasmid (X/SP8-CaI/8), oder das 4.624 bp große Col440I- und das 3.574 bp große Col(pHAD28)-Plasmid (Tabelle 44). Das Antibiotikaresistenzplasmid X/SP10-CaII/9 ist als Beispiel in Abbildung 16 dargestellt.

Bei zwei der 40 Transkonjuganten, die ebenfalls die Col-Plasmide Col(pHAD28) und Col440I besaßen (X/SP9-CaI/11, X/SP10-CaI/9), konnten die Antibiotikaresistenzplasmide nicht zirkulär in einem Contig dargestellt werden. In den Sequenzen wurde ebenfalls der Replikon-Typ IncFIB(K) und das *tet(D)*-Resistenzgen detektiert.

Das Isolat X/SP8-CaI/13 besaß das größte Plasmid (X/SP8-CaI/13\_2, 192.360 bp) mit den Resistenzgenen *tet(D)*, *sul1* und *aadA1* sowie das Col440II-Plasmid (X/SP8-CaI/13\_5) mit einer Größe von 4.052 bp.

Durch paarweisen Vergleich konnte bestätigt werden, dass alle 3.574 bp (Col(pHAD28)) bzw. 4.624 bp (Col440I) großen Plasmide jeweils zu 100 % übereinstimmten und die 180.007 bp großen Plasmide zu 99,98 % bis 100 %.



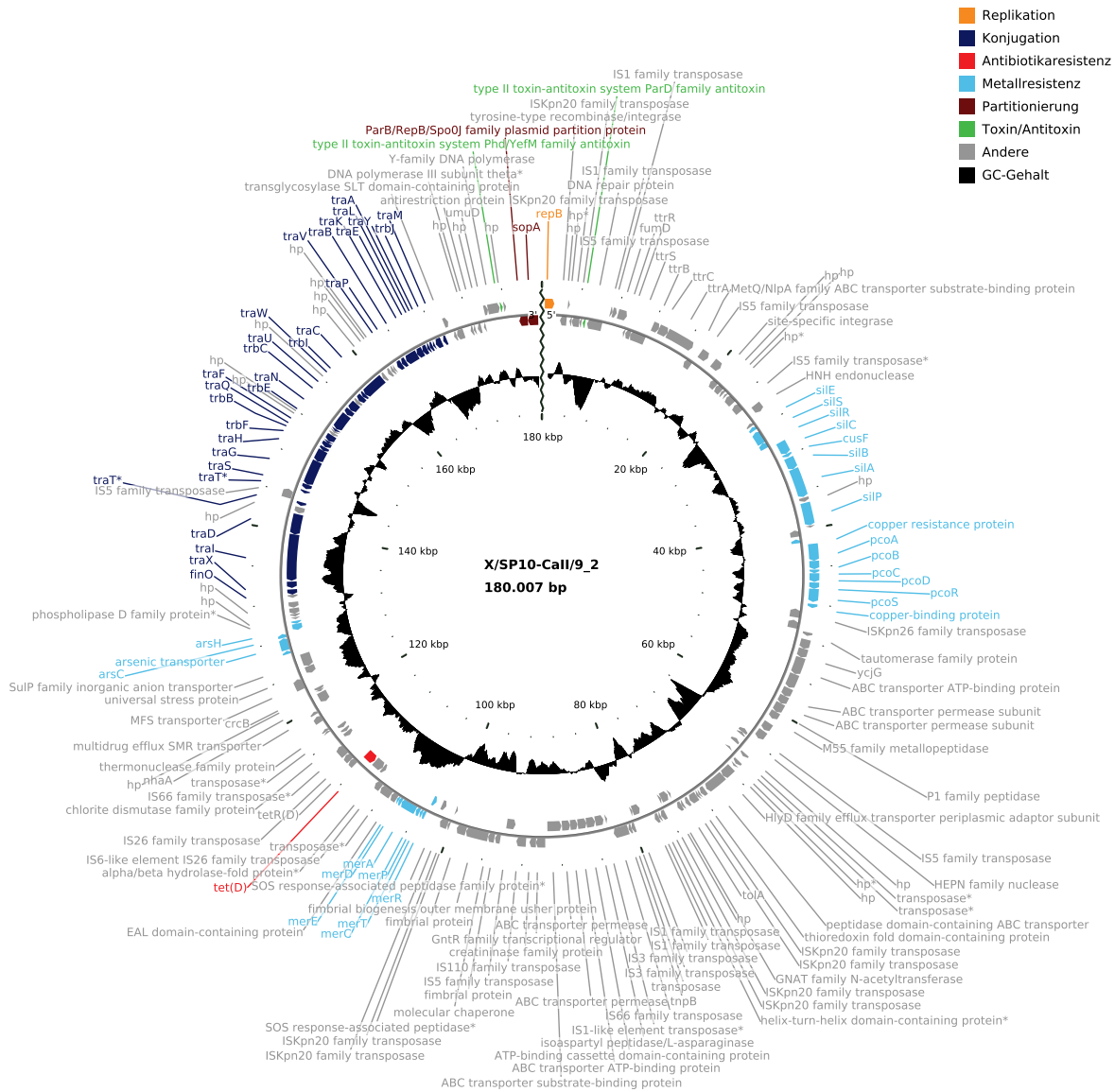


Abbildung 16: Plasmid-Karte des Antibiotikaresistenzplasmids des Transkonjuganten X/SP10-Call/9, welches von einem unbekanntem Spender des Sprossenmixes SP10 in den Empfängerstamm *E. coli* CV601 eingefangen wurde. Die Abbildung wurde mit CGview anhand der PGAP-Annotationsdaten erstellt. Wenn keine Genbezeichnung vorhanden war, wurde die Produktbezeichnung der kodierenden Sequenz gewählt. HP = hypothetisches Protein. \*Pseudogen (PGAP).

Die Plasmide mit einer Größe von ca. 71 kbp wurden als IncFII-Replikon-Typen identifiziert und hatten das Paarungsbildungssystem MPF<sub>I</sub>. Die großen Plasmide (ca. 180 kbp) wurden als IncFIB-Replikon-Typen identifiziert und hatten das Paarungsbildungssystem MPF<sub>F</sub>. Alle kleinen Plasmide, bis auf das Col440II-Plasmid des Transkonjuganten X/SP8-Cal/13 wurden als nicht-mobilisierbar eingestuft.

Von Sprossen konnten keine Cefotaxim-resistenten Transkonjuganten isoliert werden, und auf den Plasmiden wurden auch keine Resistenzgene gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika detektiert. Resistenzgene wurden in den Transkonjuganten gegen Tetracycline (*tet(A)*, *tet(D)*; n = 40), Sulfonamide (*sul1*; n = 26), Diaminopyrimidine (*dfrA1*; n = 25), Chinolone (*qnrS1*; n = 25) und Aminoglycoside (*aadA1*; n = 1) gefunden (Tabelle 44).

In dem zuerst untersuchten Sprossenmix (SP7) wurde ausschließlich das 71.155 bp große Plasmid detektiert, in dem zuletzt untersuchten Sprossenmix (SP10) wurden nur die großen Plasmide (ca. 180 kbp) mit dem *tet(D)*-Resistenzgen, teilweise in Kombination mit den kleinen Col-Plasmiden, nachgewiesen. In den Sprossenmischen SP8 und SP9 gab es sowohl Antibiotikaresistenzplasmide mit ca. 71 kbp als auch mit ca. 180 kbp.

Der Stamm X/SP7-Cal/13 zeigte neben dem 71.155 bp großen Plasmid ein weiteres extrachromosomales DNA-Fragment (Contig 2). PHASTER identifizierte fast die komplette Sequenz (147.585 bp von 149.450 bp) als intakte (score = 141) Prophagenregion mit 281 Proteinen. Der Prophage zeigte die höchste Übereinstimmung mit dem *Cronobacter* Phagen CR8 (Accession-Number bei NCBI: NC\_024354.1).

Tabelle 44: Genotypische Charakterisierung der Transkonjuganten-Plasmide der exogenen Plasmid-Isolierung. Die Replikon-Typen und Resistenzgene sind nach der Reihenfolge im Contig angeordnet. MOB-suite prognostizierte für alle konjugativen Plasmide und Col(pHAD28) den Wirtsbereich *Enterobacteriales* und für die restlichen Col-Plasmide den Wirtsbereich *Actinobacteria*, *Proteobacteria*.

Stamm	Contig	Sequenzlänge [bp]	mol% GC-Gehalt	Vollständigkeit	Inc- / Replikon-Typ	Resistenzgene	Prognostizierte Mobilität (MPF-Typ)
X/SP7-Cal/2	3	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, sul1, dfrA1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP7-Cal/7	9	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, sul1, dfrA1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP7-Cal/11	4	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>tet(A), dfrA1, sul1, qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP7-Cal/13	3	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, sul1, dfrA1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP7-Cal/19	10	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, tet(A), dfrA1, sul1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP7-Call/2	16	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>dfrA1, sul1, qnrS1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP7-Call/3	19	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>tet(A), dfrA1, sul1, qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP7-Call/5	3	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>tet(A), dfrA1, sul1, qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP7-Call/6	9	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>sul1, dfrA1, tet(A), qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP7-Call/7	13	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, sul1, dfrA1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP8-Cal/1	2	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>sul1, dfrA1, tet(A), qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP8-Cal/5	3	180.007	52,04	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
	6	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
	7	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar
X/SP8-Cal/8	2	179.751	52,02	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	3	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar
X/SP8-Cal/13	2	192.360	52,78	Ja (zirkulär)	IncFIB(K), IncFII(K)	<i>tet(D), sul1, aadA1</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	5	4.052	53,65	Ja (zirkulär)	Col440II		Mobilisierbar
X/SP8-Cal/19	23	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, sul1, dfrA1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP8-Call/1	19	71.035	53,72	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, sul1, dfrA1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP8-Call/7	16	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>sul1, qnrS1, tet(A), dfrA1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP8-Call/13	4	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, sul1, dfrA1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP8-Call/16	22	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, sul1, dfrA1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP8-Call/19	2	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>tet(A), dfrA1, sul1, qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP9-Cal/3	2	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>tet(A), dfrA1, sul1, qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP9-Cal/7	6	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>tet(A), dfrA1, sul1, qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP9-Cal/11	4	157.683	52,21	Nein		<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	7	10.102	46,27	Nein	IncFIB(K)		Nicht mobilisierbar
	9	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
	10	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar

Stamm	Contig	Sequenzlänge [bp]	mol% GC-Gehalt	Vollständigkeit	Inc- / Replikon-Typ	Resistenzgene	Prognostizierte Mobilität (MPF-Typ)
X/SP9-Cal/14	2	180.007	52,04	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	4	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
	5	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar
X/SP9-Cal/18	19	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>tet(A), dfrA1, sul1, qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP9-Call/1	10	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>tet(A), dfrA1, sul1, qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP9-Call/6	5	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, sul1, dfrA1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP9-Call/13	10	71.047	53,67	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>tet(A), dfrA1, sul1, qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP9-Call/16	11	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>qnrS1, sul1, dfrA1, tet(A)</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP9-Call/20	18	71.155	53,69	Ja (zirkulär)	IncFII(pCRY)	<i>tet(A), dfrA1, sul1, qnrS1</i>	Konjugativ (MPF <sub>I</sub> )
X/SP10-Cal/3	2	180.007	52,04	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	5	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
	6	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar
X/SP10-Cal/7	2	179.659	52,04	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	3	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
	4	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar
X/SP10-Cal/9	2	168.248	51,89	Nein	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	4	9.731	54,62	Ja (zirkulär)			Nicht mobilisierbar
	5	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
X/SP10-Cal/14	2	179.751	52,04	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	3	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
	4	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar
X/SP10-Cal/19	2	180.007	52,04	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
X/SP10-Call/2	2	180.007	52,04	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	3	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
	4	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar
X/SP10-Call/5	2	180.007	52,04	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	3	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
	4	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar
X/SP10-Call/9	2	180.007	52,04	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	3	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
	4	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar

Stamm	Contig	Sequenzlänge [bp]	mol% GC-Gehalt	Vollständigkeit	Inc- / Replikon-Typ	Resistenzgene	Prognostizierte Mobilität (MPF-Typ)
X/SP10-CaII/13	2	180.007	52,04	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Konjugativ (MPF <sub>F</sub> )
	3	4.624	43,73	Ja (zirkulär)	Col440I		Nicht mobilisierbar
	4	3.574	43,84	Ja (zirkulär)	Col(pHAD28)		Nicht mobilisierbar
X/SP10-CaII/17	2	181.207	52,01	Ja (zirkulär)	IncFIB(K)	<i>tet(D)</i>	Nonjugativ (MPF <sub>F</sub> )

### 3.4 16S rRNA-Gen Mikrobiom-Analyse von Sprossenproben

Von den nicht angereicherten und angereicherten Sprossenproben sollte deren Mikrobiotavielfalt mittels 16S rRNA-Gen Metagenom-Analyse ermittelt werden. Da jedes Bakterium die 16S rRNA-Gensequenzen besitzt, die aus konservierten und neun hoch-variablen Regionen besteht (Clarridge, 2004; Johnson et al., 2019), eignet sich diese Sequenz für die Bestimmung der Vielfalt der bakteriellen Mikrobiota (Matsuo et al., 2021). Mit der MiSeq-Sequenzieretechnologie kann die 16S rRNA-Genregion nicht am Stück sequenziert werden, sondern maximal zwei der hoch-variablen Regionen (Johnson et al., 2019). Deshalb wurde die MinION-Sequenzieretechnologie verwendet, um fast die komplette 16S rRNA-Gensequenz zu sequenzieren. Die erhaltenen Reads wurden mit Nanoclust in Cluster eingeteilt und anschließend die relative Abundanz der Gattungen in den einzelnen Proben errechnet. Neben der Entschlüsselung der bakteriellen Vielfalt, sollten zudem mögliche Spenderstämme der exogen isolierten Plasmide aus Kapitel 3.3 identifiziert werden. Von der Sprossenprobe SP11 wurde keine 16S rRNA-Gen Metagenom-Analyse durchgeführt, da aus dieser Probe keine Transkonjuganten hervorgingen.

Die nicht angereicherten Proben zeigen die Zusammensetzung der von Sprossen abgelösten mikrobiellen Fraktion direkt nach der Lagerung bei 4 °C. Abbildung 17 zeigt die hohe bakterielle Diversität, die auf den vier Sprossenproben (SP7 bis SP10) vorhandenen Bakteriengattungen. Dabei zeigte sich, dass die technischen Replikate eine hohe Ähnlichkeit aufwiesen. Insgesamt wurden an die 100 verschiedenen Gattungen detektiert, wobei nicht jede Gattung in jeder Probe vorhanden war. In allen Proben machte die Gattung *Pseudomonas* den höchsten Anteil aus. Bei der Probe SP9 war *Pseudomonas* besonders prominent. Weiterhin waren die Gattungen *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Chryseobacterium*, *Yokenella*, *Erwinia* und *Pantoea* unter den am häufigsten vorkommenden Bakteriengattungen. *Salmonella*-DNA wurde in allen Proben nachgewiesen.



Abbildung 17: Relative Abundanz der bakteriellen Vielfalt von nicht angereicherten Sprossenproben anhand der MinION-Sequenzierungsergebnisse der kompletten 16S rRNA-Gensequenz. Die Cluster wurden mittels Nanoclust erstellt und die relative Abundanz anhand der verwendeten Reads errechnet. I und II: technische Replikate der jeweiligen Probe. SP = Sprossen.

Die angereicherten Proben zeigen die Bakteriengattungen, die nach einer Anreicherung der Sprossenproben in Peptonwasser für 20 bis 24 Stunden bei 37 °C vorhanden waren. Dafür wurde die relative Abundanz der vorhandenen Bakteriengattungen errechnet. Hierbei zeigte sich, dass nach Anreicherung nur noch knapp 50 Gattungen nachweisbar waren (Abbildung 18). Auch hier waren nicht alle Gattungen in allen Proben vorhanden. Bei den angereicherten Sprossen wurden Gattungen detektiert, die bei den nicht angereicherten Proben unterhalb der Nachweisgrenze lagen, unter anderem *Bacillus*, *Bowmanella*, *Enterococcus*, *Scandinavium*, *Serratia* und *Vibrio*. Die Gattung mit der höchsten relativen Häufigkeit war in allen Proben *Enterobacter*. Nach *Enterobacter* waren *Citrobacter*, *Lactococcus* und *Klebsiella* am häufigsten vertreten. Nur in der Probe SP8 II wurde die

Gattung *Escherichia* nachgewiesen (0,07 %). Die angereicherten Proben zeigten einen hohen Anteil an *Enterobacteriaceae*, der sich zwischen den Sprossenproben nur geringfügig unterschied. Auch die technischen Replikate der angereicherten Proben zeigten hohe Ähnlichkeiten.

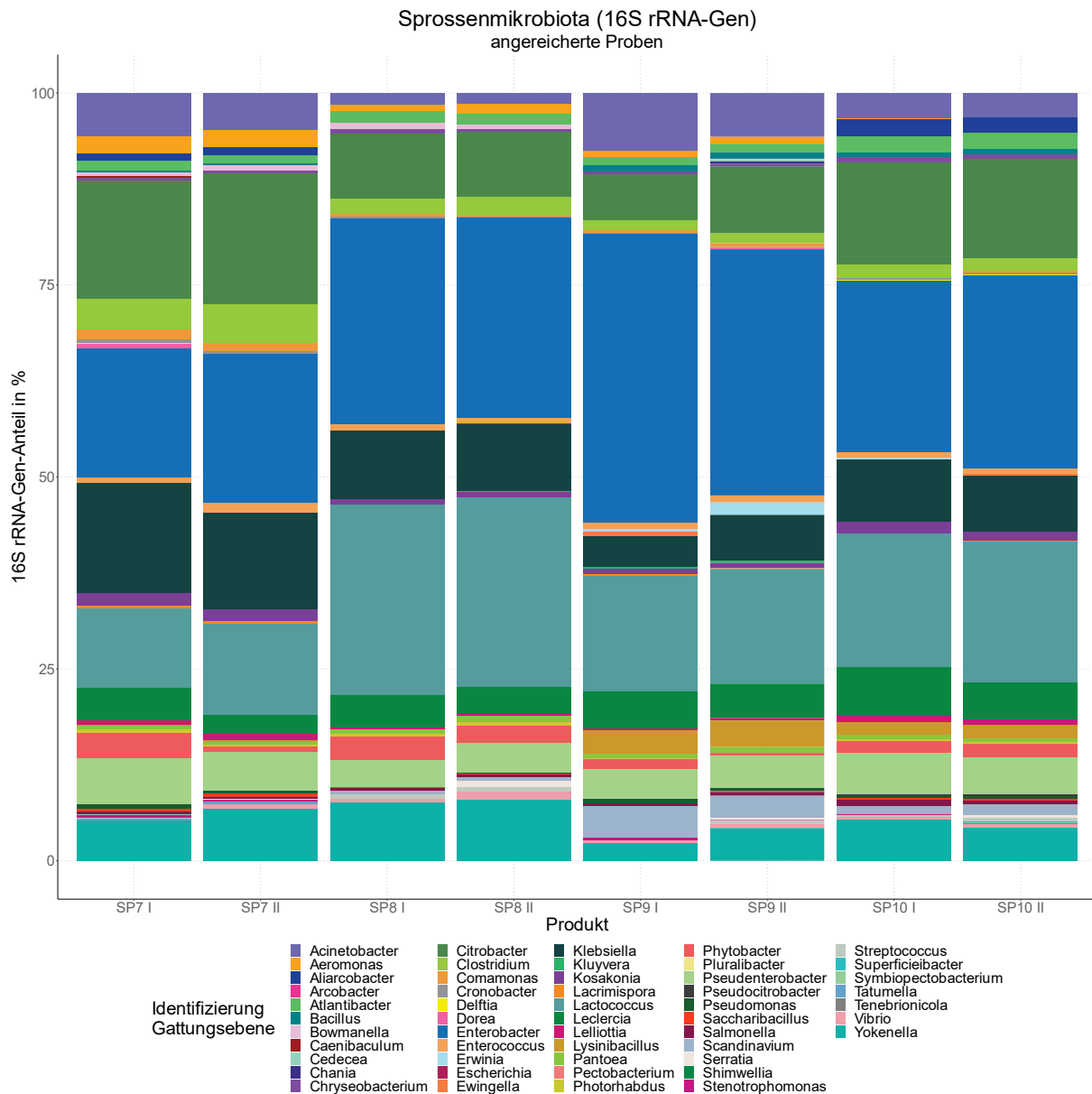


Abbildung 18: Relative Abundanz der bakteriellen Vielfalt von angereicherten Sprossenproben anhand der MinION-Sequenzierungsergebnisse der kompletten 16S rRNA-Gensequenz. Die Cluster wurden mittels Nanoclust erstellt und die relative Abundanz anhand der verwendeten Reads errechnet. I und II: technische Replikate der jeweiligen Probe. SP = Sprossen.



## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung der Plasmide von Enterobakterien aus pflanzlichen Frischeprodukten

Zum Verständnis der Ausbreitungswege von Antibiotikaresistenzen und um Lösungen für das weltweite Antibiotikaresistenzproblem zu finden, ist es wichtig die voneinander abhängigen Lebensbereiche Mensch - Umwelt - Tier zu betrachten (WHO, 2015; McEwen und Collignon, 2018; Hernando-Amado et al., 2019). Lebensmittel bilden dabei, bezogen auf Bakterien, eine Verbindung zwischen Mensch, Landwirtschaft und Umwelt. Somit ist es nötig antibiotikaresistente Bakterien von pflanzlichen Lebensmitteln zu untersuchen, um beurteilen zu können, in wie weit pflanzliche Lebensmittel an der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen entlang der Farm-to-Fork-Route beteiligt sind.

Um die Wissenslücke im Bereich antibiotikaresistenter Bakterien in Lebensmitteln zu schließen, wurden insgesamt 22 *Enterobacteriaceae*-Isolate mittels MiniON-Sequenzier Technologie sequenziert und deren Plasmide charakterisiert. Die Stämme wurden im Rahmen vorangegangener Studien von pflanzlichen Frischeprodukten, wie Sprossen, Salaten, Karotten, Gurken und Kräutern isoliert (Loop, 2019; Cho et al., 2021). Die 22 Isolate setzten sich aus *Citrobacter* spp. (n = 8), *Enterobacter* spp. (n = 4), *Escherichia coli* (n = 4) und *Klebsiella* spp. (n = 6) zusammen. Dabei sind besonders *Escherichia* spp. und *Klebsiella* spp. als häufigste nosokomiale Infektionserreger bekannt (Weiner-Lastinger et al., 2020). Deshalb liegt bei der Untersuchung von antibiotikaresistenten Bakterien auf pflanzlichen Lebensmitteln der Fokus häufig auf diesen Gattungen, bzw. speziell auf *E. coli* und *K. pneumoniae* (Kim et al., 2015; Jongman und Korsten, 2016; Blau et al., 2018; Reid et al., 2019). Allerdings ist es wichtig, neben Vertretern dieser Gattungen weitere antibiotikaresistente und potenziell pathogene Enterobakterien-Stämme zu untersuchen (Iseppi et al., 2018; Cho et al., 2021), um deren Reservoir an Antibiotikaresistenzgenen nicht zu übersehen (Sheppard et al., 2016). Denn durch Konjugation von unter anderem IncF-Plasmiden können Antibiotikaresistenzgene innerhalb der *Enterobacteriaceae*-Familie verbreitet werden (Villa et al., 2010; Iseppi et al., 2018).

Die Isolate wurden anhand der Daten aus den vorangegangenen Studien ausgewählt und stellen keine repräsentative Stichprobe der Vielfalt an Enterobakterien auf den unterschiedlichen pflanzlichen Frischeprodukten dar. Trotzdem wurde mit der Auswahl gezeigt, dass sich antibiotikaresistente Enterobakterien auf zum Verzehr geeigneten pflanzlichen Frischeprodukten befinden. In Deutschland sind roh verzehrte, pflanzliche Lebensmittel als Träger pathogener Bakterien durch den STEC-Ausbruch, der auf kontaminierte Sprossen zurückgeführt werden konnte, in den Fokus gerückt (Buchholz et al., 2011; Frank et al., 2011). Auch weltweit werden pflanzliche Frischeprodukte immer mehr als Träger antibiotikaresistenter *Enterobacteriaceae* mit unterschiedlicher phänotypischer Antibiotikaresistenz wahrgenommen (Boehme et al., 2004; Schwaiger et al., 2011; Campos et al., 2013; Kim et al., 2015; Jongman und Korsten, 2016; Blau et al., 2018; Iseppi et al., 2018; Al-Kharousi et al., 2019; Richter et al., 2019; Cho et al., 2021). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass auf pflanzlichen Frischeprodukten neben Bakterien mit geringer Resistenz auch Stämme mit multipler phänotypischer

Antibiotikaresistenz vorhanden sind. In der Studie von Blau et al. (2018) wurden von 24 pflanzlichen Lebensmittelproben (Koriander, Rucola, gemischter Salat) aus deutschen Supermärkten, insgesamt 63 *E. coli*-Isolate auf Tetracyclin-haltigem Agar isoliert. Dabei zeigten die Isolate ebenfalls unterschiedliche Antibiotikaresistenz-Phänotypen. Abgesehen von den Isolaten von Rucola, waren neben einer Unempfindlichkeit gegenüber Tetracyclin, die meisten Isolate resistent gegen Ampicillin (Blau et al., 2018). In der vorliegenden Studie waren fast alle Isolate resistent gegen Ampicillin. Dabei könnte die Resistenz der Stämme teilweise auf deren intrinsische Resistenz gegen Ampicillin zurückgeführt werden (CLSI, 2023). Die Kombination einer Tetracyclin- und Streptomycin-Resistenz wurde in der Studie von Blau et al. (2018) ähnlich wie in der vorliegenden Studie beobachtet. Weiterhin wurden bei Blau et al. (2018) Stämme mit einer Resistenz gegen nur zwei Antibiotika gefunden und Isolate mit multipler Resistenz, ähnlich wie bei den Isolaten Ciw5.1, Ciw5.2 und Kpneu34 der vorliegenden Studie. In einer weiteren Studie aus Deutschland wurden 109 *Enterobacteriaceae*-Isolate von Sprossen, Misch- und ready-to-eat-Salaten nicht selektiv isoliert und hinsichtlich ihrer Resistenz gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika getestet (Stoll et al., 2018). Während Resistenzen gegen unterschiedliche  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gefunden wurden, war keines der Isolate ESBL-positiv (Stoll et al., 2018). Deshalb schlossen Stoll et al. (2018), dass diese Lebensmittel im Hinblick auf ESBL-produzierende Enterobakterien als unauffällig und sicher gewertet werden können. Holvoet et al. (2013) untersuchten Proben von Salat, Erde, Bewässerungswasser und Setzlings-Torfboden von Salatproduktionsstätten auf das Vorhandensein von *E. coli*. Dabei war die Prävalenz an *E. coli* auf den Salat-Proben gering, allerdings waren die Resistenzraten bei *E. coli* von Salat-Proben höher verglichen mit anderen Proben (Holvoet et al., 2013). Allgemein waren nur wenige Isolate resistent gegen mindestens ein Antibiotikum (11,4 %), mit der höchsten Resistenzrate gegen Ampicillin von 7 % (Holvoet et al., 2013). Holvoet et al. (2013) folgerten aus den Ergebnissen, dass eine Kontamination mit resistenten *E. coli* durch Vieh möglich wäre, da das Resistenzmuster von *E. coli*-Isolaten von Vieh dem von Salatproduktionsstätten ähnelte. In der vorliegenden Studie handelte es sich um Lebensmittelproben, die im Supermarkt erworben wurden und nicht direkt von der Produktionsstätte stammten. Trotzdem konnten auch hier einige Isolate identifiziert werden, die nur eine geringe phänotypische Antibiotikaresistenz zeigten, wobei es sich auch um Umweltkeime handeln könnte. Weiterhin könnte die Multiresistenz einiger Isolate auf eine Kontamination mit tierischem oder menschlichem Ursprung hinweisen.

Sprossen weisen hohe Gesamt- und Enterobakterien-Keimzahlen auf (Boehme et al., 2004; Abadias et al., 2008) und enthalten auch antibiotikaresistente Bakterien (Freitag et al., 2018; Huizinga et al., 2018). Interessant an den vorliegenden Ergebnissen war, dass sowohl die phänotypisch resistentesten Stämme (Ciw5.1, Ciw5.2, Kpneu28, Kpneu34) als auch phänotypisch wenig resistente Isolate (Cipa6.1, Cipa6.2, Enb12) von Sprossen isoliert wurden. Die Stämme Kpneu28 und Kpneu34 wurden auf ESBL-Agar isoliert und deren ESBL-Produktion bestätigt (Loop, 2019). In der vorliegenden Studie wurde nicht die Häufigkeit von Stämmen mit einem bestimmten Resistenzphänotyp einer Produktgruppe bestimmt, was einen Vergleich der Prävalenz mit resistenten Stämmen anderer Studien schwierig macht. Allerdings bestätigten einige Studien, dass ESBL-positive Stämme auf Sprossen vorkommen. So zeigten Freitag et al. (2018), dass in fünf von 43 Sprossen-Proben ESBL-positive *E. coli* vorhanden

waren, hingegen waren nur in zwei von 202 Salat-Proben ESBL-positive *E. coli* vorhanden. In den Niederlanden besaßen von 131 Sprossenproben, die zwischen 2013 und 2016 gesammelt wurden, insgesamt 19 % der Proben ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* (Huizinga et al., 2018). Eine Studie von Nuesch-Inderbinnen et al. (2015) zeigte hingegen, dass in keiner der 23 getesteten Sprossen-Proben ESBL-positive *Enterobacteriaceae* vorhanden waren. Somit zeigen sich große Unterschiede in dem Vorkommen von ESBL-positiven Enterobakterien auf Sprossenproben.

Der Eintrag resistenter Bakterien kann auf dem kompletten Weg von der Samenproduktion bis zur Verpackung der Sprossen erfolgen. Dabei wurde eine Kontamination der Samen diskutiert (Mahon et al., 1997; NACMCF, 1999; Kim et al., 2013), allerdings wäre auch ein Eintrag innerhalb des Betriebs während der Verarbeitung, durch Bewässerungswasser oder durch Mitarbeitende vorstellbar (Boehme et al., 2004; Iseppi et al., 2018). Bei Produkten, die vor dem Verpacken industriell gewaschen werden, wurde außerdem nachgewiesen, dass Bakterien mittels des Waschwassers zwischen den Produkten verteilt werden können (Fiedler, 2021; Rosberg et al., 2021). Somit könnten auch antibiotikaresistente Bakterien, insbesondere solche mit Resistenzplasmiden, während des Waschens zwischen den Produkten verteilt werden. Das BfR weist deshalb auf die Wichtigkeit hin, durch gute Praxis im Bereich der Landwirtschaft und der herstellenden Betriebe, die Kontamination mit pathogenen und antibiotikaresistenten Bakterien zu vermeiden (BfR, 2019). Somit ist es vorstellbar, dass die Isolate mit multiplen Antibiotikaresistenzen entlang der Produktionskette auf die Produkte gelangt sein könnten.

Besonders relevant bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenz sind durch den horizontalen Gentransfer übertragbare Antibiotikaresistenzgene (Sheppard et al., 2016; von Wintersdorff et al., 2016). Aus diesem Grund wurde der Fokus in der vorliegenden Studie auf die in den Isolaten vorhandenen Plasmide und die transferierbaren Resistenzgene gelegt. Die MiSeq-Sequenzierdaten waren dabei für die vollständige Darstellung der Chromosomen und der Plasmide nicht ausreichend (Loop, 2019; Cho et al., 2021). Dabei zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die vollständige Darstellung wichtig ist, um abschätzen zu können, ob die Antibiotikaresistenzgene auf den Plasmiden liegen und eventuell übertragen werden können. Durch die Sequenzierung mit dem MinION und der bioinformatischen Kombination von kurzen und langen Sequenzierdaten mittels Unicycler ist es gelungen, die Chromosomen und Plasmide der 22 Enterobakterien-Stämme vollständig und in jeweils einem Contig darzustellen. Der Hybridansatz zur Kombination von kurzen und langen Sequenzierdaten mittels Unicycler wurde auch in anderen Studien bereits erfolgreich für die vollständige Sequenzaufklärung von Chromosomen und Plasmiden verwendet (Sun et al., 2019; Martins et al., 2020; Stein et al., 2020; Amadesi et al., 2023). Dabei war erst durch die Hybridassemblierung möglich, die Plasmide und deren Eigenschaften näher zu charakterisieren. Somit wurden Plasmide mit Antibiotikaresistenzgenen identifiziert, die möglicherweise selbst übertragbar sind. Darüber hinaus wurden in den Stämmen Ec1119 und Enb12 Plasmide identifiziert, die in den MiSeq-Daten nicht aufgefallen waren bzw. als solche nicht identifiziert wurden. Der Grund hierfür war, dass PlasmidFinder in den Sequenzdaten keine Übereinstimmung mit Replikon-Typen der Datenbank finden konnte. Die Ergebnisse zeigen somit, wie wichtig eine vollständige Darstellung der Sequenzen ist, um neue Plasmide zu identifizieren, deren Replikon-Typen nicht in einer Datenbank hinterlegt sind.

In den meisten Plasmiden von *E. coli* und *K. pneumoniae* wurde mit Hilfe von PlasmidFinder der jeweilige Replikon-Typ identifiziert. Hingegen wurde bei 40 % der *Citrobacter*-Plasmide keine Übereinstimmung mit den Replikon-Typen in der PlasmidFinder-Datenbank gefunden. Für die initiale PlasmidFinder-Datenbank wurden anhand von ca. 560 Plasmiden insgesamt 116 Sonden entwickelt (Carattoli et al., 2014). Die Plasmide stammten überwiegend aus *E. coli*, *Salmonella enterica* und *K. pneumoniae* – Plasmide von *Citrobacter* waren kaum vertreten (Carattoli et al., 2014). Um die Übertragungswege von Plasmiden zu detektieren, ist es allerdings wichtig, Informationen zu den verschiedenen Plasmid-Typen zu haben (Carattoli et al., 2014; Orlek et al., 2017b; Robertson et al., 2020). Die Identifizierung anhand einer Datenbank-gestützten Abgleichs ist allerdings nur so gut, wie die Datenbank selbst, weshalb die Identifizierung neuer bzw. nicht bekannter Plasmide schwierig ist (Robertson und Nash, 2018). Im Sinne des One-Health-Ansatzes wäre es deshalb wichtig, auch Plasmid-Replikon-Typen von *Enterobacteriaceae*-Stämmen in der Datenbank zu hinterlegen, die klinisch weniger relevant sind. Dadurch könnten die Plasmide einfacher identifiziert und die Verbreitungsrouten der Antibiotikaresistenzgene via HGT besser verfolgt werden.

Durch die vollständige Darstellung der Plasmide wurde gezeigt, wie unterschiedlich die Plasmide von Bakterien sind, die mit pflanzlichen Lebensmitteln assoziiert sind. Von den 22 untersuchten Enterobakterien besaßen folgende fünf Isolate keine Plasmide: *C. portucalensis* (n = 2), *En. dykesii* (n = 2) und *K. variicola* (n = 1). In den restlichen 17 Isolaten wurden insgesamt 40 Plasmide detektiert, die sich unter anderem in der Größe, der Mobilisierbarkeit, dem mol%-GC-Gehalt und der Ausstattung mit Metall- und Antibiotikaresistenzgenen unterschieden. Die kleinen Plasmide waren dabei zwischen 2.058 bp bis 6.455 bp groß. Die großen Plasmide erreichten Größen zwischen 32.965 bp und 326.286 bp. Auch in Studien mit umfangreicheren Stichproben wurde eine mehrgipflige Größenverteilung von *Enterobacteriaceae*-Plasmiden festgestellt (de Toro et al., 2014; Orlek et al., 2017a; Balbuena-Alonso et al., 2022). Die Größenverteilung von 255 *E. coli*-Plasmiden zeigte dabei mittlere Größenhöhepunkte von 1,6 kbp, 5,1 kbp und 87 kbp mit wenigen Plasmiden mit Größen zwischen 10 kbp und 30 kbp (de Toro et al., 2014). Eine ähnliche Größenverteilung zeigte sich auch bei 161 Plasmiden von 77 *E. coli*-Isolaten aus Lebensmittelproben und 1.624 Plasmiden von 649 klinischen *E. coli*-Isolaten, wobei der mittlere Höhepunkt bei Plasmiden klinischer Isolate mit 110 kbp größer war als bei Plasmiden von Lebensmittelproben mit 93 kbp (Balbuena-Alonso et al., 2022). Die Größen der Plasmide reichten von 1,1 kbp bis 404 kbp (Balbuena-Alonso et al., 2022), wobei die Größen der Plasmide in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in diesem Bereich liegen.

Die häufigsten Inc-Typen der großen Plasmide waren IncF-Plasmide (IncFIB und IncFII). Die kleinen Plasmide zeigten, wenn mittels PlasmidFinder typisierbar, höchste Ähnlichkeit mit Col-Replikon-Typen. In einer Studie von Reid et al. (2019) waren in 120 von pflanzlichen Frischeprodukten isolierten *E. coli*-Isolaten ebenfalls IncFIB, IncFII und Col-ähnliche Replikon-Typen am häufigsten vertreten. Huizinga et al. (2018) untersuchten Sprossen aus den Niederlanden mit dem Schwerpunkt auf ESBL-produzierenden Isolaten, wobei 26 Stämme mittels MiSeq sequenziert und die Plasmide somit nicht vollständig dargestellt wurden. Ähnlich wie in der vorliegenden Studie waren Col- und IncF-Plasmide die Prävalentesten, wobei auch mehrere IncF-Replikon-Typen in einem Isolat detektiert wurden (Huizinga et al., 2018). Allerdings kann mit den vorhandenen Daten nicht geklärt werden, ob die IncF-

Replikon-Typen auf den selben Contigs lagen und es sich somit um Multireplikon-Plasmide handelte (Huizinga et al., 2018), wie dies in Plasmiden der vorliegenden Studie vorkam. Der Replikon-Typ IncU, der bei Huizinga et al. (2018) gefunden wurde, war in der vorliegenden Studie nicht präsent, hingegen wurde der IncN-Replikon-Typ, der ebenfalls bei Huizinga et al. (2018) vorkam, nur bei pCIPO13\_5 detektiert. Neben den ESBL-Genen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> und *bla*<sub>SHV-2</sub>, die in der vorliegenden Studie nur in jeweils einem Plasmid detektiert wurden (pKPNEU28\_2, pKPNEU34\_2), wurden bei Huizinga et al. (2018) noch weitere ESBL-Gene (z. B. *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, *bla*<sub>SHV-99</sub>) detektiert. Die Stämme mit den ESBL-kodierenden Plasmiden der vorliegenden Studie wurden auf ESBL-Agar isoliert (Loop, 2019), während die restlichen Isolate auf Tetracyclin-haltigem Agar isoliert wurden (Cho et al., 2021). Neben den Resistenzgenen gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wurden in der Studie von Huizinga et al. (2018) weitere Gene detektiert, die Resistenzen gegen Fluorchinolone (*qnrS1*), Aminoglykoside (*aph(3')*-Ia, *aac(6')*Ib-cr, *aadA16*, *aph(6)*-Id, *aph(3'')*-Ib), Sulfonamide (*sul1*, *sul2*), Tetracycline (*tet(A)*, *tet(D)*) sowie Makrolid-Antibiotika (*mph(A)*) vermitteln. Diese Gene wurden ebenfalls auf den Plasmiden in der vorliegenden Studie gefunden. Allerdings zeigten diese 26 ESBL-positiven Stämme allgemein ein höheres Antibiotikaresistenzgen-Niveau (Huizinga et al., 2018), verglichen mit den Isolaten der vorliegenden Studie. Somit ähnelten die ebenfalls von Sprossen stammenden ESBL-positiven Stämme Kpneu28 und Kpneu34 der vorliegenden Studie am ehesten den Stämmen in der Studie von Huizinga et al. (2018). Eine Zuordnung der Resistenzgene zu Plasmiden oder Chromosomen war in der Studie von Huizinga et al. (2018) hingegen nicht möglich. In der Studie von Darphorn et al. (2021) wurden Plasmide von 28 *E. coli*-Isolaten von Hühner-, Truthahn- oder Rindfleisch mit einem resistenten Phänotyp gegen Tetracyclin oder  $\beta$ -Laktam-Antibiotika untersucht. Dabei waren neben IncI- und IncX-Replikon-Typen, auch IncF-Plasmide häufig zu finden (Darphorn et al., 2021). Auch Plasmide mit multiplen Replikon-Typen, wie beispielsweise IncFIB/IncFII/IncQ1 oder IncFIB/IncFII, ähnlich wie in der vorliegenden Studie, wurden detektiert (Darphorn et al., 2021). Auch der pathogene Stamm *E. coli* O104:H4, der zu einem Sprossen-assoziierten Infektionsausbruch führte, besaß ein IncF-Plasmid (Brzuszkiewicz et al., 2011; Wibberg et al., 2013). Die Shigatoxin-Gene waren hingegen auf einem Prophagen lokalisiert (Brzuszkiewicz et al., 2011). Bei einem Vergleich von *E. coli*-Plasmiden aus der Klinik (n = 1.624) und von Lebensmitteln (n = 161) wurde gezeigt, dass Plasmide aus beiden Gruppen Resistenzgene gegen die gleichen Antibiotikafamilien trugen (Balbuena-Alonso et al., 2022). In der vorliegenden Studie wurden Resistenzgene, wie beispielsweise *aph(6)*-Id, *aph(3'')*-Ib, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *qnrS*, *aac(6')*-Ib-cr, *sul1*, *sul2*, *tet(A)* und *tet(B)* auf den Plasmiden detektiert, die in der Studie von Balbuena-Alonso et al. (2022) sowohl auf Plasmiden klinischer als auch auf Lebensmittel-Isolaten vorhanden waren. Dabei wurden Resistenzgene, die ausschließlich auf Plasmiden klinischer Isolate detektiert wurden, wie Fosfomycinresistenzgene (*fosA2*, *fosA3*, *fosA4*) und Efflux-Pumpengene (*adeF*, *evgA*, *mdtM*) (Balbuena-Alonso et al., 2022) auf den Plasmiden in der vorliegenden Studie nicht gefunden. Dies zeigt, wie weit verbreitet Bakterien mit Plasmiden bestimmter Inc-Typen und Antibiotikaresistenzgenen sind und gibt einen Hinweis darauf, dass es zwischen den unterschiedlichen Lebensbereichen zu einem Austausch dieser Bakterien bzw. Plasmide kommt.

Von den 40 Plasmiden, die in 17 der 22 untersuchten Enterobakterien nachgewiesen wurden, besaß die überwiegende Mehrheit keine Antibiotikaresistenzgene (73 %). Dabei wurden in 7.396 Plasmiden

von *Escherichia*, *Klebsiella* und *Salmonella* nur in 38 % der Plasmide Antibiotikaresistenzgene gefunden (Wang et al., 2022). Dies weist darauf hin, dass die Mehrheit der Plasmide nicht an der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen beteiligt sein könnte. Obwohl Antibiotikaresistenzgene zuvor auf relativ kleinen Plasmiden detektiert wurden (Handford et al., 2009; Both et al., 2016; Branger et al., 2018; Branger et al., 2019), waren auf den 14 kleinen Plasmiden in der vorliegenden Studie keine Antibiotikaresistenzgene vorhanden. Wein et al. (2020) zeigten, dass kleine Plasmide im Gegensatz zu großen in *E. coli*-Isolaten selten Antibiotikaresistenzgene trugen. Eine Unterbrechung essenzieller Sequenzen bei Insertion neuer Gene ist bei kleinen Plasmiden wahrscheinlicher als bei größeren, denn die für den Erhalt und die Replikation wichtigen Sequenzen nehmen bei kleinen Plasmiden im Verhältnis einen größeren Teil der Plasmid-Sequenz ein (Wein et al., 2019; Wein et al., 2020). Dies könnte ein Grund sein, weshalb in keinem der kleinen Plasmide in dieser Studie Antibiotikaresistenzgene vorhanden waren.

Nicht alle IncF-Plasmide in der vorliegenden Arbeit wiesen Antibiotikaresistenzgene auf, allerdings wurden sechs der elf Plasmide, die Antibiotikaresistenzgene trugen, als IncF-Replikon bzw. als Multireplikon-Typen mit IncF-Replikon identifiziert. Fünf dieser Plasmide wurden als potenziell konjugativ eingestuft, was die Bedeutung von IncF-Plasmiden an der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen zwischen Enterobakterien hervorhebt. IncF-Plasmide gehören zu den prävalentesten Replikon-Typen in Enterobakterien und sind dafür bekannt, bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen innerhalb der *Enterobacteriaceae*-Familie eine wichtige Rolle zu spielen (Villa et al., 2010; Rozwandowicz et al., 2018). Denn Antibiotikaresistenzgen-tragende IncF-Plasmide werden weltweit in klinischen Isolaten (Bielaszewska et al., 2011; Rafai et al., 2015; Balbuena-Alonso et al., 2022), bei Menschen (Johnson et al., 2007; Wang et al., 2013; Both et al., 2016; Benz et al., 2021), in der Umwelt (Wibberg et al., 2013; Lyimo et al., 2016), in Lebensmitteln (Blau et al., 2018; Darphorn et al., 2021; Balbuena-Alonso et al., 2022; Zhao et al., 2022) und bei Tieren (Johnson et al., 2007; Wang et al., 2013) gefunden. Wegen des engen Wirtsspektrums der IncF-Plasmide ist die Resistenzverbreitung auf Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* beschränkt (Villa et al., 2010; Rozwandowicz et al., 2018). Trotzdem tragen IncF-Plasmide mit  $\beta$ -Laktamase-kodierenden Genen, wie *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, zur rapiden, weltweiten Verbreitung der klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgene bei (Novais et al., 2007; Rafai et al., 2015; Wyres et al., 2019). Auch in der vorliegenden Studie wurde ein konjugatives Plasmid mit einem ESBL-vermittelnden Phänotyp detektiert. Das Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> war in dem konjugativen Plasmid pKPNEU28\_2 vorhanden und eine Übertragung des Resistenzplasmids wurde in Konjugationsversuchen nachgewiesen (siehe Kapitel 3.2). Somit bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, wie wichtig IncF-Plasmide für die Verbreitung von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen sind.

Die kleinen Plasmide der mehrfach resistenten Stämme Ciw5.1 und Ciw5.2 besaßen keine Antibiotikaresistenzgene. Alle Resistenzgene, bis auf *bla*<sub>CMY-98</sub> und *qnrB34*, lagen vielmehr auf einer hoch variablen Resistenzregion im Chromosom nahe beieinander. Da es sich dabei auch um Antibiotikaresistenzgene wie *tet(B)*, *sul1* und *aadA* handelte, die auch auf Plasmiden vorkommen können (Wang et al., 2022), war es wichtig durch die vollständige Darstellung aller DNA-Fragmente die Position und die mögliche Mobilität der Antibiotikaresistenzgene abschätzen zu können. Diese Region

enthielt neben den Antibiotikaresistenzgenen auch Insertionssequenzen und mögliche Transposons und Integrone. Somit zeigt diese Region in den Chromosomen von Ciw5.1 und Ciw5.2 eine Region mit hohem Potenzial für unterschiedliche Rekombinationen und Insertion bzw. Deletion von Resistenzgenen. Es ist denkbar, dass die Resistenzgene mittels mobiler Plasmide in die Bakterienzelle gelangt sind und durch das Zusammenspiel zwischen den mobilen genetischen Elementen in das Chromosom eingebaut wurden. Daraufhin könnten die vermutlich ursprünglichen Trägerplasmide verloren gegangen sein.

Besonders hinsichtlich der Antibiotikaresistenzgene war, neben den *Citrobacter*-Isolaten Ciw5.1 und Ciw5.2, auch der Stamm Kpneu34. Dieser besaß gleich zwei Plasmide (konjugativ und mobilisierbar) mit multiplen Antibiotikaresistenzgenen (sechs bzw. zwölf je Plasmid). Im Vergleich mit den anderen Stämmen ist es höchst wahrscheinlich, dass dieser Stamm aus einem Umfeld mit hoher Antibiotikakonzentration und großem Selektionsdruck, z. B. einem Krankenhaus stammt, und es hier entlang der Produktionskette zur Verunreinigung mit diesem Stamm gekommen sein könnte. Die Antibiotikaresistenzgene *tet(D)*, *aadA16*, *dfrA27*, *aar-3* wurden auf dem Plasmid pKPNEU34\_2 gefunden. In der Studie von Balbuena-Alonso et al. (2022) zum Vergleich von *E. coli*-Isolaten aus Klinik und Lebensmitteln waren diese Resistenzgene nur auf Plasmiden aus klinischen *E. coli*-Isolaten vorhanden, nicht aber auf Plasmiden von Lebensmittel-assoziierten *E. coli*.

Die Mobilisierbarkeit der Plasmide wurde mittels MOB-suite abgeschätzt. Insgesamt wurden 35 % als konjugativ und 30 % als mobilisierbar eingestuft. Die restlichen 35 % waren nicht mobilisierbar. Smillie et al. (2010) zeigten, dass 54 % der Plasmide (n = 487) von *Proteobacteria* konjugativ bzw. mobilisierbar waren und die restlichen 46 % nicht mobilisierbar. In einer Stichprobe von 255 *E. coli*-Plasmiden lag der Anteil an nicht transferierbaren Plasmiden bei nur 27 % (de Toro et al., 2014). Der Anteil an nicht mobilisierbaren Plasmiden in der vorliegenden Studie liegt somit in dem Bereich dieser Studien. Allerdings handelt es sich bei der vorliegenden Stichprobe nicht um eine repräsentative Auswahl. Bei den Antibiotikaresistenzplasmiden waren 82 % (9 von 11) entweder mobilisierbar oder konjugativ.

Mit der Charakterisierung der Bakterien wurde gezeigt, dass sich antibiotikaresistente Bakterien auf pflanzlichen Frischeprodukten befinden. Untersuchungen zur Detektion von antibiotikaresistenten Bakterien werden in den herstellenden Betrieben nicht durchgeführt. Deshalb sind Studien wie die vorliegende, die das Vorkommen von antibiotikaresistenten Bakterien und besonders von Bakterien mit konjugativen Antibiotikaresistenzplasmiden untersuchen, wichtig. Dies zeigt beispielhaft auch eine Studie, die in Salat aus Portugal einen multiresistenten *E. coli*-Stamm mit einem *mcr-1*-Resistenzgen-tragenden Plasmid isolierten, welches mittels Konjugation übertragbar war (Jones-Dias et al., 2016; Manageiro et al., 2020). Das Gen *mcr-1* vermittelt eine Resistenz gegen Colistin, welches ein Reserveantibiotikum für die Behandlung von resistenten Gram-negativen Bakterien ist (Paterson und Harris, 2016). Allerdings wurde nur ein *E. coli* mit diesem Resistenzgen detektiert, somit scheint die Prävalenz sehr gering zu sein (Jones-Dias et al., 2016).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass pflanzliche Frischeprodukte Bakterien mit Antibiotikaresistenzplasmiden besitzen, die an einer möglichen Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen vom Lebensmittel auf den Menschen beitragen können.

## 4.2 Transfer von Antibiotikaresistenzplasmiden zwischen Bakterien – *in vitro* und auf dem Lebensmittel

Mit Konjugationsversuchen kann die Übertragung phänotypischer Eigenschaften zwischen einem Spender und einem Empfänger qualitativ nachgewiesen werden. Durch die Quantifizierung kann zusätzlich herausgefunden werden, welche Faktoren die Plasmid-Übertragung beeinflussen (Sheppard et al., 2020). In der vorliegenden Studie wurde deshalb zunächst getestet, ob die Übertragung von Resistenzgen-tragenden Plasmiden zwischen zwei *E. coli*- bzw. einem *K. pneumoniae*-Spender und einem *E. coli*-Empfänger möglich ist. Dabei wurde bei zwei von drei Spenderstämmen eine phänotypische Tetracyclin-Resistenz auf den Empfängerstamm übertragen. Zuvor wurde mit MOB-suite die Mobilisierbarkeit der Plasmide prognostiziert. Dabei stuft MOB-suite ein Plasmid als konjugativ ein, wenn eine Relaxase und ein Paarbildungssystem (MPF) vorhanden sind (Robertson und Nash, 2018). Ein Plasmid wird als mobilisierbar identifiziert, wenn eine Relaxase oder ein Transferursprung (*oriT*) vorhanden ist (Robertson und Nash, 2018). Für die von MOB-suite als konjugativ eingestuften Plasmide pKPNEU28\_2, pEC1115\_1, pEC1115\_2, pEC1115\_3 und für das als mobilisierbar eingestufte Plasmid pEC1115\_4, wurde deren Mobilität durch die Konjugationsversuche bestätigt. Hingegen erbrachten mehrere Konjugationsversuche bei unterschiedlichen Bedingungen mit dem Spenderstamm Ec1117 keine Transkonjuganten, obwohl MOB-suite das Plasmid pEC1117\_1 als konjugativ prognostizierte. Für die Konjugation sind bestimmte Transferegene essenziell (Fernandez-Lopez et al., 2016). Die Analyse der Annotationsdaten des Plasmids ergab, dass alle für die IncF-Konjugation essenziellen Gene vorhanden waren. Allerdings wurde das *tral*-Gen von PGAP als Pseudogen eingestuft, da der hintere 3'-Teil des *tral*-Gens nicht vollständig war. Ein vollständiges *tral*-Gen von IncF-Plasmiden kodiert 1.756 Aminosäuren (Matson und Ragonese, 2005). Das unvollständige *tral*-Gen von pEC1117\_1 kodierte nur 1.208 Aminosäuren. Das *tral*-kodierende Protein besitzt Relaxase- und Helikase-Aktivität, wodurch der Einzelstrang an der Schnittstelle (*nic site*) geschnitten und der DNA-Strang entwunden wird, der in den Empfängerstamm übertragen wird (Wong et al., 2012). Das durch *tral*-kodierte intakte Protein ist deshalb essenziell für eine erfolgreiche Konjugation (Matson und Ragonese, 2005). Der hintere Teil des Gens kodiert den Teil des Proteins, der die Helikase-Funktion vermittelt (Matson und Ragonese, 2005). Dieser Teil ist bei pEC1117\_1 nicht vollständig, weshalb davon auszugehen ist, dass dies der Grund dafür ist, weshalb keine Transkonjuganten detektiert wurden. MOB-suite erwies sich somit als geeignetes Programm, um einen schnellen Überblick über die Mobilität der Plasmide zu erhalten, wenn komplette Sequenzdaten vorliegen. So werden neben der Mobilisierbarkeit auch der mögliche Wirtsbereich und das Paarbildungssystem angegeben (Robertson und Nash, 2018; Robertson et al., 2020). Allerdings ist es wichtig, die an der Konjugation beteiligten Gene in den Annotationsdaten zu überprüfen und zusätzlich mit Konjugationsversuchen die *in silico*-Daten zu bestätigen.

Wie oben beschrieben waren zwei Stämme (*K. pneumoniae* Kpneu28 und *E. coli* Ec1115) für Konjugationsversuche geeignet, da diese konjugative Antibiotikaresistenzplasmide (pKPNEU28\_2 und pEC1115\_1) besaßen. Sowohl die Übertragung der phänotypischen Tetracyclin-Resistenz als auch der Übergang des *tet(A)*-Resistenzgens konnte bei beiden Stämmen erfolgreich nachgewiesen werden. Für die Konjugationsversuche zur Ermittlung der Transferraten wurde jedoch nur der Spenderstamm



Kpneu28 verwendet. Ec1115 wurde als Spenderstamm nicht verwendet, da die Multiplex-PCR das targetierte Plasmid in den Transkonjuganten nicht immer nachweisen konnte. Dies lag daran, dass *tet(A)* durch drei konjugative Plasmide in den Empfängerstamm übertragen wurde und die mit der PCR targetierte Replikationsregion nicht immer vorhanden war. Das *tet(A)*-Resistenzgen wurde somit mittels zwei unterschiedlichen Transfersystemen (MPF<sub>F</sub>, MPF<sub>I</sub>) übertragen. Da allerdings nicht klar war, wie die intrazelluläre Mobilität die Transferraten zusätzlich beeinflusst, wurde der Spenderstamm Ec1115 nicht für weitere Konjugationsversuche verwendet.

Auch die Transkonjuganten des Spenderstammes Kpneu28 zeigten Rekombinationen. Allerdings war in diesem Fall die PCR zum Nachweis des Plasmids stets erfolgreich. Weiterhin zeigte die Sequenzierung, dass bei Konjugationsversuchen mit diesem Stamm immer mindestens das konjugative Plasmid pKPNEU28\_2 übertragen wurde. In manchen Plasmiden wurden zusätzlich Anteile oder das komplette Plasmid pKPNEU28\_3 in das Plasmid pKPNEU28\_2 integriert. Folglich bezieht sich die Diskussion auf Konjugationsversuche zwischen dem Spenderstamm Kpneu28 und dem Empfängerstamm CV601.

Für das etablierte Spender-Empfänger-System wurde im weiteren Verlauf der Konjugationsversuche getestet, wie sich unterschiedliche Temperaturen sowie *in vitro*-Bedingungen und Bedingungen auf dem Lebensmittel auf die Transferraten auswirken. Dabei wurden als Konjugationsmatrix neben LB- und Salat-Agar auch Sprossen und Mischsalat getestet. Ein Vergleich der Transferraten mit anderen Studien ist aufgrund der Unterschiede in den gewählten Bedingungen schwierig. Denn neben der Temperatur und dem Nährstoffangebot kann Konjugation von vielen weiteren biotischen und abiotischen Bedingungen beeinflusst werden (Sheppard et al., 2020). Großen Einfluss scheinen die Wahl des Empfängerstammes, das Medium (z. B. flüssig, fest) und Plasmid-eigene Systeme zur Unterdrückung des Transferapparates zu haben (Sheppard et al., 2020). Weiterhin ist die Transferrate sowohl abhängig von dem verwendeten Spenderstamm und dem Plasmid als auch vom Empfängerstamm (Benz et al., 2021). Somit ist ein Vergleich mit anderen Studien schwierig, da sich die genannten Faktoren zwischen den meisten Studien unterscheiden. Desweiteren ist ein Vergleich schwierig, weil meist keine Informationen zu dem Transfersystem (MPF<sub>F</sub>, MPF<sub>I</sub>, etc.) des Plasmids bekannt sind und die Transferraten unterschiedlich berechnet werden. Schließlich gibt es für die Bestimmung der Transferraten keine als allgemeingültig akzeptierte Formel, vielmehr gibt es verschiedene Formeln, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können (Huisman et al., 2022). Der in dieser Studie verwendete Ansatz, der auf dem Verhältnis der Populationsdichten von Transkonjugant zu Empfänger basiert (Dahlberg et al., 1998), unterscheidet dabei nicht zwischen Plasmid-Transfer und Transkonjugantenwachstum (Sorensen et al., 2005). Ein Vergleich der internen Ergebnisse in dieser Studie ist dennoch möglich, da die Versuchsabläufe, bis auf einzelne Parameter identisch waren. Zudem wurde stets das gleiche Spender-Empfänger-System verwendet, weshalb unterschiedliche Spender-, Plasmid-, und Rezipienten-Kombinationen – wie in der Studie von Benz et al. (2021) – hier keinen Einfluss haben.

Die Konjugationsversuche (Filtermating) bei 10 °C für vier Tage ohne anschließenden Anreicherungsschritt erbrachten weder auf Salat- noch auf LB-Agar Transkonjuganten. Bei den Konjugationsversuchen bei 10 °C auf LB-Agar mit anschließender Anreicherung wurde jedoch in vier

von zehn Versuchen eine geringe Menge von Transkonjuganten (< 300 KbE/ml) ermittelt. Auf Salat-Agar war auch nach Anreicherung kein Transfer nachweisbar. Bei den Konjugationsversuchen bei 10 °C für vier Tage auf Mischsalat- und Sprossenproben wurden in jeweils zwei der vier Versuche Transkonjuganten detektiert, allerdings weniger als zehn Kolonien pro Platte. Bei den Versuchen auf Sprossen und Mischsalat muss berücksichtigt werden, dass die 10-fache Menge des Spenders und Empfängers hinzugegeben wurde, verglichen mit den Filtermating-Versuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei kühler Lagerung von Mischsalaten und Sprossen innerhalb der kurzen Haltbarkeit (hier angenommen vier Tage), die Übertragung von Antibiotikaresistenzplasmiden zwischen Bakterien auf den Produkten als sehr gering einzuschätzen ist. Die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung bei geringeren Temperaturen, wie 4 °C (untere Kühlschranktemperatur), könnte somit noch geringer sein. Weiterhin wurden in den Versuchen Empfänger- und Spenderstämme mit Keimzahlen in einer Höhe eingesetzt, welche die Abundanz an potenziellen Spendern und Empfängern auf den Produkten wahrscheinlich übersteigt. Denn bei der exogenen Plasmid-Isolierung mit dem Empfängerstamm CV601 wurden bei 10 °C keine Transkonjuganten detektiert (Kapitel 3.3), was dafür spricht, dass die Menge an möglichen Spenderstämmen mit Antibiotikaresistenzplasmiden auf Sprossen niedriger ist. Dies schmälert zusätzlich die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung bei niedrigen Temperaturen. In der Studie von Luo und Matthews (2023) zur Übertragung von einem Colistin-Resistenz vermittelnden Plasmid, von einem *E. coli*-Spender- in pathogene *E. coli*-Empfängerstämme, wurden Konjugationsversuche in Flüssigmedium bei 4 °C, 24 °C und 37 °C durchgeführt. Übertragung wurde bei 24 °C und 37 °C festgestellt, allerdings nicht bei 4 °C. Angaben über das Plasmid wurden allerdings nicht gemacht (Luo und Matthews, 2023). In der Studie von Jung und Matthews (2016) wurde der Plasmid-Transfer zwischen *K. pneumoniae*-Stämmen untersucht. Während Plasmid-Transfer bei 15 °C, 24 °C und 37 °C in Flüssigmedium (Trypton-Soja-Bouillon) und auf geschnittenem Römersalat detektiert wurde, war bei 4 °C kein Transfer nachweisbar (Jung und Matthews, 2016). Auf Hähnchenfleisch hingegen wurde Plasmid-Transfer auch bei niedrigen Temperaturen nachgewiesen. Bei Konjugationsversuchen zwischen fünf *Salmonella*-Spendern und einem *E. coli*-Empfänger bei 4 °C, 25 °C und 37 °C auf Hähnchenfleisch wurde sogar bei 4 °C bereits nach 24 Stunden Plasmid-Transfer der IncHI-, IncX- bzw. IncI2-Plasmide nachgewiesen (Li et al., 2022). Die Transferraten zwischen den Donor- und Empfängerkombinationen ähnelten sich, allerdings waren die Transferraten nicht angegeben (Li et al., 2022). Während bei 37 °C höhere Transferraten festgestellt wurden als bei 25 °C, wurden zu den Transferraten bei 4 °C keine Angaben gemacht (Li et al., 2022).

Der verzögerte Verderb durch eine Kühlung führt zum längeren Erhalt der Produkteigenschaften von pflanzlichen Frischeprodukten (Tournas, 2005). Außerdem minimiert bzw. verhindert die Kühlung das Wachstum pathogener Bakterien, wie *Salmonella*, STEC und *Listeria monocytogenes* (Carrasco et al., 2008; Posada-Izquierdo et al., 2013; Tarlak et al., 2020). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass die richtige Lagerung der pflanzlichen Produkte auch deshalb wichtig ist, um die Übertragung von Antibiotikaresistenzplasmiden auf dem Produkt zu minimieren. Dies unterstreicht, wie wichtig die Einhaltung der Kühlkette bei pflanzlichen Frischeprodukten ist, um neben dem Wachstum von pathogenen Bakterien auch die Übertragung von Resistenzplasmiden zu minimieren.

In der vorliegenden Studie wurde Salat- und LB-Agar für die Konjugationsversuche verwendet. Die Zusammensetzung an Mikro- und Makronährstoffen des Salat-Agars wurde nicht bestimmt. Der Pflanzensaft des Salat-Agars bestand aus den flüssigen und gelösten Bestandteilen von Karotten, Endivien, Frisée, Radicchio, grünem Blattsalat, rotem Mangold, rotem Blattsalat und Rucola. Dies sollte den Pflanzensaft repräsentieren, der bei dem industriellen Schneiden von verzehrfertigen Frischeprodukten austritt. Schließlich ist bekannt, dass dieser austretende Pflanzensaft das Bakterienwachstum fördert (Tournas, 2005; Koukkidis et al., 2017). Die Pflanzen enthalten neben einem hohen Wasseranteil auch Mineralstoffe wie Calcium, Eisen und Magnesium sowie Vitamine und geringe Mengen an Fetten, Kohlenhydraten und Proteinen (USDA, 2018; Das und Bhattacharjee, 2020; Nagraj et al., 2020). Somit sind Nährstoffe vorhanden, die für das Bakterienwachstum wichtig sind. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass die Nährstoffdichte in dem Salat-Agar gegenüber dem komplexen LB-Nährmedium geringer war. Transfer kann jedoch auch unter nährstoffarmen Bedingungen stattfinden. So nutzten Darphorn et al. (2022b) für Konjugationsversuche zwischen *E. coli*-Stämmen bei 37 °C ein Minimalmedium ohne Glucose. Dabei konnten nach einer Stunde für 14 der 17 Spenderstämme Transkonjuganten detektiert werden, die sich allerdings in ihren Transferraten sehr unterschieden (Darporn et al., 2022b).

Jung und Matthews (2016) untersuchten Transferraten zwischen *K. pneumoniae*-Stämmen auf unterschiedlichen Nährmedien bei 24 °C. Dabei zeigte sich, dass die Transferraten auf Alfalfa-Sprossen (Inokulum der Sprossensamen) und geschnittenem Römersalat höher waren als in Trypton-Soja-Bouillon (Jung und Matthews, 2016). Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass Transferversuche nicht nur bei Laborbedingungen, sondern auch unter realen Bedingungen durchgeführt werden sollten (Jung und Matthews, 2016). Ebenso war in der vorliegenden Studie die Transferrate auf Salat-Agar höher, verglichen mit LB-Medium (21 °C und 37 °C). Transfer findet somit statt und das pflanzliche Material reicht als Nährstoffgrundlage für Plasmid-Übertragung aus.

Bei Betrachtung der Ergebnisse auf LB- und Salat-Agar zeigte sich, dass die Transferraten bei 37 °C höher waren, verglichen mit 21 °C. Wobei der Einfluss der Temperatur auf LB-Agar nicht signifikant war. Auch Sheppard et al. (2020) fanden höhere Transferraten bei höheren Konjugationstemperaturen und vermuteten eine Steigerung der Transferrate bis zur optimalen Wachstumstemperatur der Stämme. Bei Transferversuchen zwischen einem *E. coli*-Spenderstamm und drei *E. coli*-Empfängerstämmen waren bei 37 °C die Transferraten am höchsten (Pallares-Vega et al., 2021). Bei niedrigerer Konjugationstemperatur waren die Transferraten geringer, allerdings war der Einfluss je nach Spender-Empfänger-Kombination unterschiedlich stark (Pallares-Vega et al., 2021). Um Szenarien in der Lebensmittelkette abzubilden, untersuchten Alvarez-Molina et al. (2023), welchen Einfluss unterschiedliche Faktoren (Temperatur, pH-Wert, Biozide) auf den Plasmid-Transfer zwischen zwei *E. coli*-Isolaten hatten. Dabei zeigte sich, dass Transfer nach 18 Stunden nur bei 37 °C nachweisbar war, nicht aber bei 30 °C oder 20 °C (Alvarez-Molina et al., 2023). In der vorliegenden Studie wurde bei 21 °C Transfer nachgewiesen, allerdings war hier auch die Konjugationszeit auf vier Tage erhöht worden, was darauf hindeutet, dass bei niedrigeren Temperaturen ein längerer Inkubationszeitraum notwendig ist, um Konjugation nachzuweisen.

Die Endkeimzahl des Empfängerstammes war auf Salat-Agar geringer als auf LB-Agar. Die Endkeimzahlen des Spenderstammes Kpneu28 wurden allerdings nicht ermittelt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass *E. coli* CV601 ein K12-Derivat ist, das als Labor-Sicherheitsstamm ein Aminosäure-Biosynthese-Defizit (Threonin, Leucin) und ein Thiamin-Biosynthese-Defizit aufweist (Smalla et al., 2000). Dies bedeutet, dass dieser *E. coli*-Stamm, im Gegensatz zu einem Wildtyp, die Aminosäuren und das Vitamin Thiamin in die Zelle aufnehmen muss und nicht selbst produzieren kann. Somit ist davon auszugehen, dass der *K. pneumoniae*-Spenderstamm einen Wachstumsvorteil auf dem Salat-Agar gegenüber dem Empfängerstamm hatte. Pearce et al. (2000) zeigten, dass eine höhere Anzahl an Spenderstämmen (höhere Populationsdichte des Spenders) zu einer höheren Anzahl an Transkonjuganten führte. Somit könnte zumindest ein Teil des Unterschieds, den es zwischen den Transferraten auf LB- und Salat-Agar gab, darauf zurückgeführt werden, dass sich während der Konjugation auf Salat-Agar das Verhältnis zugunsten des Spenderstammes veränderte und somit mehr Transfer stattgefunden haben könnte. Eine Bestimmung der Endkeimzahl des Spenderstammes hätte zeigen können, ob die unterschiedlichen Agar-Typen das Wachstum von *K. pneumoniae* beeinflussten. Dies wurde nicht durchgeführt, könnte allerdings bei künftigen Versuchen helfen herauszufinden, ob sich das Verhältnis von Spender zu Empfänger während des Versuchs ändert und ob die Unterschiede in den Transferraten zumindest teilweise darauf zurückzuführen sind.

Neben den Konjugationsversuchen auf LB- und Salat-Agar (Filtermating) wurde auch bei Konjugationsversuchen auf Sprossen und Mischsalat Transfer des Antibiotikaresistenzplasmids zwischen Kpneu28 und CV601 bei 37 °C nachgewiesen. Auch andere Studien haben Transfer auf Lebensmitteln untersucht. So wurde Übertragung beispielsweise in Milch (Walsh et al., 2008; Jung und Matthews, 2016; Alvarez-Molina et al., 2023), auf Fleisch (Walsh et al., 2008; Li et al., 2022; Ojha et al., 2022), auf Salat (Jung und Matthews, 2016) und während der Sprossenanzucht (Molbak et al., 2003; Toomey et al., 2009; Jung und Matthews, 2016; Ojha et al., 2022; Luo und Matthews, 2023) erfolgreich nachgewiesen. Auch wenn sich der Versuchsaufbau in der vorliegenden Studie von den Versuchen von Jung und Matthews (2016) und Luo und Matthews (2023) unterscheidet, zeigten alle drei Studien, dass der Transfer von Antibiotikaresistenzplasmiden zwischen Enterobakterien auf pflanzlichen Frischeprodukten möglich ist. Dabei wurde Transfer während der Sprossenanzucht und auf Römersalat nachgewiesen (Jung und Matthews, 2016; Luo und Matthews, 2023).

Während der Sprossenanzucht (Keimung, Sprossung) wurde Übertragung von Resistenzplasmiden nachgewiesen. Die Bedingungen scheinen somit während der Sprossenanzucht für den Transfer günstig zu sein – dabei muss beachtet werden, dass die Versuche, im Vergleich mit der vorliegenden Studie, über mehrere Tage hinweg und bei niedrigeren Temperaturen (< 37 °C) durchgeführt wurden (Molbak et al., 2003; Toomey et al., 2009; Jung und Matthews, 2016; Ojha et al., 2022; Luo und Matthews, 2023). In der vorliegenden Studie wurden Konjugationsversuche bei 37 °C auf Sprossen und Mischsalat durchgeführt, die zuvor im Supermarkt erworben wurden. Somit hatten die Produktveränderungen während der Keimung und Sprossung keinen Einfluss auf den Plasmid-Transfer.

Der Transfer war auf Sprossen höher als auf Mischsalat, was darauf hindeutet, dass die Sprossen eine für den Transfer vorteilhaftere Matrix bieten. Die Samen und kleinen Wurzeln waren bei dem Sprossenmix teilweise noch vorhanden. Dabei sind diese Bereiche der Sprossen der bevorzugte Teil für

Plasmid-Transfer (Molbak et al., 2003). Da bei dem Mischsalat keine Wurzeln vorhanden waren, könnte dies zu einem Unterschied in der Transferrate geführt haben. Im Rahmen dieser Studie wurden weder die Gesamtkeimzahlen noch die Mikrobiota der Produkte analysiert. In künftigen Studien könnten diese Parameter ermittelt werden, um den Einfluss der Begleitmikrobiota auf die Transferraten der Antibiotikaresistenzplasmide zu ermitteln.

Bei dem Empfängerstamm handelte es sich in der vorliegenden Studie um einen *E. coli*-Laborstamm, wobei eine Übertragung auf pathogene Enterobakterien auf dem Produkt vorstellbar wäre. Beispielsweise wurde die Übertragung eines Plasmids mit dem *mcr-1*-Resistenzgen auf pathogene *E. coli*-Empfänger während des Wachstums von Mungobohnen-Sprossen bei 25 °C nachgewiesen (Luo und Matthews, 2023). Eine Infektion mit einem antibiotikaresistenten Erreger kann zu verlängerter Krankheitsdauer bis zu Therapieversagen und erhöhter Mortalität führen (Friedman et al., 2016; Antimicrobial Resistance, 2022; Larsson et al., 2022). Das Vorkommen pathogener Bakterien auf pflanzlichen Frischeprodukten in Norddeutschland ist allerdings gering (Fiedler et al., 2017), weshalb auch das Risiko für Verbraucherinnen und Verbraucher als gering einzuschätzen ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Antibiotikaresistenzplasmide von Ec1115 und von Kpneu28 auf den Empfänger *E. coli* CV601 übertragen werden. Weiterhin fand Transfer auf LB- und Salat-Agar bei 21 °C und 37 °C sowie auf Salat und Sprossen bei 37 °C statt. Eine Übertragung von Antibiotikaresistenzplasmiden zwischen Bakterien auf pflanzlichen Lebensmitteln ist somit grundsätzlich möglich. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit eines Transfers bei kurzer Lagerzeit (4 Tage) und kühlen Temperaturen ( $\leq 10$  °C) als gering einzuschätzen, weshalb eine ununterbrochene Kühlkette notwendig ist.

### 4.3 Rekombinationen bei Antibiotikaresistenzplasmiden

Plasmide können mosaikartige (zusammengesetzte) Strukturen aufweisen, bei denen es Hinweise auf eine Kombination mehrerer Plasmide gibt (Liu et al., 2021; Luo et al., 2022). Dabei können Teile oder das komplette Plasmid in ein anderes Plasmid integrieren (He et al., 2015; Xie et al., 2018; Du et al., 2020; Luo et al., 2022). Auch das Vorkommen von multiplen Replikon-Typen auf einem Plasmid könnte ein Hinweis auf Rekombination in der Vergangenheit sein (Douarre et al., 2020). Beispielsweise weist eine auf dem Plasmid pEC1115\_1 detektierte Resistenzregion auf Rekombination in der Vergangenheit hin. Diese von zwei IS26-Kopien eingeschlossene Sequenz besitzt neben einer unvollständigen IncQ-Replikationsregion auch noch die Resistenzgene *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *sul2*, *aph(3'')*-Ib, *aph(6)*-Id. Diese Region wurde so – oder in abgewandelter Zusammensetzung (Tn6029, Tn6029B/C/E) – bereits in Chromosomen und Plasmiden detektiert (Cain et al., 2010; Bailey et al., 2011; Reid et al., 2015; McKinnon et al., 2018) und weist Teile des IncQ-Plasmids RSF1010 auf (Yau et al., 2010; Reid et al., 2015). Auch die mittels MobileElementFinder identifizierten Unit und Composite Transposons deuten darauf hin, dass die darauf befindlichen Resistenzgene innerhalb der Zelle transportiert werden können. Dabei wurde IS26 bei den meisten Composite Transposons als die für die Mobilisierung verantwortliche Insertionssequenz identifiziert (Tabelle 35). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Che et al. (2021) überein, die zeigten, dass IS26 auf Plasmiden angereichert und mit vielen

unterschiedlichen Antibiotikaresistenzgenen assoziiert sind. Weiterhin wurden IS26-Kopien in Gattungen von sieben Bakterienfamilien detektiert, was darauf hindeutet, dass diese bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen eine wichtige Rolle spielen (Che et al., 2021). Luo et al. (2022) zeigten, dass Rekombination zwischen den Plasmiden in einem *Klebsiella*-Stamm über fünf Jahre hinweg stattgefunden hat. Die durch IS26 vermittelte Rekombination spielte bei der Neuordnung der Plasmide eine wichtige Rolle und führte zu einem Hybridplasmid bestehend aus Teilen von drei Originalplasmiden – allerdings unter Verlust von Antibiotikaresistenzgenen (Luo et al., 2022). Auch in der vorliegenden Studie könnte die Insertionssequenz IS26 bei dem Erwerb von Antibiotikaresistenzgenen bei den Plasmiden eine wichtige Rolle gespielt haben.

Auch bei Chromosomen kann Rekombination stattfinden. So deuten auch die sehr ähnlichen Chromosomen der Stämme Ciw5.1 und Ciw5.2 darauf hin, dass diese einen gemeinsamen Vorfahren besitzen. Die beiden Isolate stammten dabei von dem selben Sprossenmix. In dem Zusammenhang deuten die Sequenziererergebnisse darauf hin, dass eine Deletion bzw. Integration innerhalb der Resistenzregion für den Unterschied in der genotypischen Resistenzgenausstattung und der phänotypischen Resistenz verantwortlich sein könnten.

Im Gegensatz zu den aufgeführten Beispielen, bei denen in der entfernten Vergangenheit möglicherweise Rekombination stattgefunden hat, zeigten die Plasmide der Transkonjuganten, dass zwischen den Plasmiden der Originalstämme Kpneu28 und Ec1115 auch rezente, versuchsassoziierte Rekombinationen stattgefunden hatten. Die Plasmide der Transkonjuganten, die nur teilweise vollständig dargestellt werden konnten, zeigten eine unterschiedliche Zusammensetzung verglichen mit den Plasmiden der Spenderstämme. Auch in anderen Studien wurden Plasmide nach der Konjugation in den Transkonjuganten detektiert, die durch Rekombination zwischen den Plasmiden im Spenderstamm entstanden waren (Xie et al., 2018; Barry et al., 2019; Du et al., 2020).

Die Plasmide der Transkonjuganten, die durch die Konjugation mit dem Spender Kpneu28 entstanden sind, zeigten teilweise Rekombinationen. Dabei war das ursprüngliche Plasmid pKPNEU28\_2 stets vollständig vorhanden. In manchen Plasmiden der Transkonjuganten war in das Plasmid pKPNEU28\_2 zusätzlich das komplette oder Teile des Plasmids pKPNEU28\_3 integriert worden. Dabei wurde gezeigt, dass wenn Integration stattgefunden hatte, diese in einer bestimmten Region im Plasmid pKPNEU28\_2 erfolgte (siehe Abbildung 10). Bei all diesen Transkonjuganten-Plasmiden, bei denen Rekombination stattfand, mit Ausnahme von A07/1\_2, wurden bei der Integration eine IS26-Genkopie und teilweise weitere Sequenzabschnitte eingefügt. Das Plasmid pKPNEU28\_3 wurde für die Integration nicht immer an derselben Stelle geöffnet. Wie auch zuvor bei Luo et al. (2022) beschrieben, könnte der zugrunde liegende Mechanismus eine Transposition sein, die durch IS26 vermittelt wurde. He et al. (2015) zeigten, dass bei Plasmiden von klinischen *Enterobacteriaceae*-Isolaten die Insertionssequenz IS26 eine wichtige Rolle bei DNA-Deletion, -Inversion und Plasmid-Kombination spielt. Weiterhin zeigten Du et al. (2020), dass ein nicht übertragbares Resistenzplasmid mittels Konjugation in einen Empfänger übertragen wurde, indem dieses durch eine IS26-vermittelte-Integration in ein konjugatives Plasmid integriert wurde. Durch die Kombination der Plasmide ergab sich somit ein großes Plasmid mit multiplen Resistenzgenen, wobei sich die Mobilität des nicht übertragbaren Plasmids und seiner Resistenzgene erhöht hat (Du et al., 2020). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen somit,

dass die Insertionssequenz IS26 eine wichtige Rolle bei der Rekombination von Antibiotikaresistenzplasmiden hat.

Für die Transkonjuganten des Spenderstammes Ec1115 wurde festgestellt, dass mit der Multiplex-PCR nicht bei jedem Transkonjuganten die targetierte Plasmid-Sequenz nachgewiesen wurde. Die PCR zum Nachweis des *tet(A)*-Resistenzgens war allerdings auch bei den Plasmiden erfolgreich, bei denen das Plasmid nicht nachweisbar war. Durch die Sequenzierung der Transkonjuganten wurde gezeigt, dass die von der PCR targetierte Plasmid-Region bei den Transkonjuganten-Plasmiden fehlte, bei denen die PCR keine Plasmid-Bande zeigte. Dies zeigte, dass die PCR gut funktionierte, um das targetierte Plasmid-Fragment nachzuweisen. Allerdings war dieses Fragment nicht in alle Transkonjuganten übergegangen, weshalb die PCR in diesen Fällen keine Bande zeigte. Durch die Sequenzdaten wurde deutlich, dass das *tet(A)*-Resistenzgen und weitere Regionen des Originalplasmids pEC1115\_1 durch Transposition sowohl auf das Plasmid pEC1115\_2 als auch auf das Plasmid pEC1115\_3 übergegangen waren. Somit wurde das *tet(A)*-Resistenzgen von allen drei in dem *E. coli*-Stamm vorhandenen konjugativen Plasmiden in einen Empfängerstamm transferiert. Dies zeigt, wie das Zusammenspiel von intra- und interzellulärer Mobilität zu einer erfolgreichen Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen durch unterschiedliche Plasmide führt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es sich hierbei nur um eine kleine Stichprobe an Transkonjuganten (n = 13) handelte. Bei einer größeren Stichprobe könnten eventuell noch weitere Rekombinationen zwischen den Plasmiden detektiert werden. Neben der Transposition wurde auch noch die Integration des Plasmids pEC1115\_3 in das Plasmid pEC1115\_1 nachgewiesen sowie unterschiedliche Duplikationen von DNA-Fragmenten. Barry et al. (2019) untersuchten den Plasmid-Transfer von Spenderstämmen mit multiplen Plasmiden und nutzten für deren Detektion in den Transkonjuganten ebenfalls Plasmid-spezifische Primer. Dabei wurde in acht von 59 Transkonjuganten zwar eine Übertragung des Resistenzgens *bla<sub>KPC</sub>* nachgewiesen, das Originalplasmid wurde allerdings nicht mit den spezifischen Primern detektiert (Barry et al., 2019). Barry et al. (2019) schlossen daraus, dass es zu einer Transposition des Resistenzgens auf ein anderes Plasmid innerhalb des Spenderstammes gekommen sein musste, ähnlich wie in der vorliegenden Studie.

Die Rekombinationen im Spenderstamm Ec1115 waren wesentlich komplexer und unregelmäßiger als bei Kpneu28. Weiterhin weisen die Daten darauf hin, dass IS26 bei der Transposition zwischen den Plasmiden keine Rolle spielte, sondern vielmehr die mit *tet(A)* assoziierte Transposase (Tn3-like element TnAs1 family transposase). Darphorn et al. (2022a) zeigten, dass das *tet(A)*-Resistenzgen und die umliegende Region, die sehr große Ähnlichkeit zu der *tet(A)*-Region in der vorliegenden Studie aufwies (Vergleich der Plasmidsequenzen pEC1115\_1 und pESBL3301-IncX1 (Accession-Number: NZ\_MW390542) mittels Mauve (Geneious Prime®): 99,9 % Übereinstimmung des 5.488 bp langen Sequenzabschnitts), innerhalb der Spenderzelle auf ein anderes Plasmid und anschließend mittels Konjugation in einen Empfänger übertragen wurde. Ähnlich wie bei Darphorn et al. (2022a) wurde *tet(A)* in der vorliegenden Studie auf andere in der Zelle vorhandene Plasmide übertragen. Allerdings zeigten die Unicycler-Ergebnisse in der vorliegenden Studie, dass diese *tet(A)*-Region, einfach oder mehrfach hintereinander (2-fach, 7-fach) und gemeinsam mit angrenzenden Sequenzen mobilisiert wurde bzw. als geschlossenes, zirkuläres Fragment in der Zelle vorlag. Um die für die Rekombination

verantwortlichen Mechanismen besser verstehen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich waren. Denn in der vorliegenden Studie sollten Spender-Empfänger-Systeme gefunden werden, mit denen im Anschluss der Einfluss von Nährstoffen und Temperatur auf die Transferraten bestimmt werden sollte. Da *tet(A)* durch unterschiedliche Plasmide mobilisiert wurde, wurde der Stamm von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

In der vorliegenden Studie wurde nachgewiesen, dass *tet(A)* von dem IncF-Plasmid auf das IncI-Plasmid mobilisiert und anschließend in den Empfängerstamm übertragen wurde. Somit zeigen die Ergebnisse nicht nur, wie mobil die Resistenzgene innerhalb einer Bakterienzelle sein können, sondern auch, dass dadurch das Wirtsspektrum der Resistenzgene erweitert werden könnte. Bei IncF- und IncI-Plasmiden handelt es sich um Plasmide mit engem Wirtsspektrum (Rozwandowicz et al., 2018). Allerdings ist es vorstellbar, dass *tet(A)* mittels Transposition auf ein coresidierendes Plasmid übertragen wird, welches ein breites Wirtsspektrum besitzt. IncP, IncU oder IncN sind beispielsweise Plasmide mit breitem Wirtsspektrum mit denen die Resistenzgene in Bakterien unterschiedlicher Familien übertragen werden können (Rozwandowicz et al., 2018). Somit ist für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen nicht nur die Mobilisierbarkeit der Plasmide entscheidend, sondern auch die Mobilisierbarkeit von Resistenzgenabschnitten innerhalb einer Bakterienzelle.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich alle Plasmide der Transkonjuganten des Spenderstammes Ec1115 vollständig darzustellen. Interessant war allerdings, dass bei den 239 kbp und den 171 kbp großen Plasmiden die Sequenz von dem Programm Unicycler an der Stelle nicht geschlossen wurde, an der im Originalplasmid die 5.488 bp große *tet(A)*-Region lokalisiert ist. Von Unicycler wurde die *tet(A)*-Region in diesen Transkonjuganten als eigenes Contig dargestellt. Bei den Transkonjuganten, bei denen die Plasmide vollständig geschlossen wurden, war die *tet(A)*-Region entweder einfach oder mehrfach hintereinander eingebaut. Um herauszufinden, wie die Plasmide in den jeweiligen Transkonjuganten vorliegen, ob die 5.488 bp große Region als eigenständige Sequenz in dem Stamm vorliegt und um die vollständige Struktur der Plasmide zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Auch wenn die Struktur der Plasmide der Transkonjuganten nicht immer vollständig geklärt wurde, können trotzdem interessante Schlüsse aus den Ergebnissen gezogen werden. Zunächst zeigen die Ergebnisse, wie wichtig Konjugationsversuche mit gut charakterisierten Spenderstämmen sind. Denn erst dadurch wurde die Rekombination zwischen den Plasmiden detektiert. Ein *de novo*-Assemblierungsansatz sollte selbst dann bevorzugt werden, wenn Transkonjuganten von gut charakterisierten Spenderstämmen sequenziert werden. Denn mit einer Referenz-basierten Methode würden die rekombinierten Plasmid-Sequenzen nicht immer richtig abgebildet werden (Sheppard et al., 2016). Weiterhin ist davon auszugehen, dass Rekombinationen, die im Zusammenhang mit Konjugationsversuchen auftreten meist übersehen werden. Denn in den meisten Konjugationsversuchen ist die phänotypische Resistenzübertragung in einen Empfängerstamm als Nachweis für eine gelungene Konjugation ausreichend (z. B. Iseppi et al. (2018)). In der vorliegenden Studie wurde mit zwei von drei Spenderstämmen erfolgreich Plasmid-Transfer nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine Rekombination der Plasmide in beiden Spenderstämmen. Rekombination im Zusammenhang mit Konjugation könnte somit bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen eine



größere Rolle spielen als bisher vermutet. Besonders die interne Transposition des *tet(A)*-Resistenzgens auf andere konjugative Plasmide und die anschließende Übertragung zeigen, dass sich dadurch dessen Wirtsspektrum verändern kann. Für Untersuchungen von kurzfristigen evolutionären Prozessen, auch im Hinblick auf Antibiotikaresistenz, wäre eine genauere Betrachtung der hinter dem intrazellulären Austausch liegenden Mechanismen sinnvoll.

Zusammenfassend wurde nachgewiesen, dass Rekombination zwischen Plasmiden stattfindet. Dabei können Teile oder ein komplettes Plasmid in ein anderes integrieren. Durch die Assoziation von Antibiotikaresistenzgenen mit mobilen genetischen Elementen kann deren Mobilität innerhalb der Zelle erhöht werden. Zudem kann durch Transposition eines Antibiotikaresistenzgens auf ein coresidierendes Plasmid dessen Wirtsspektrum verändert werden. Somit sollte das Zusammenspiel zwischen Plasmiden und weiteren mobilen genetischen Elementen im Hinblick auf die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen weiter untersucht werden.

#### 4.4 Charakterisierung der von Bakterien der Sprossenmikrobiota eingefangenen Plasmide

In der vorliegenden Studie wurden Sprossen für die Konjugationsversuche herangezogen, da diese stark mit Bakterien besiedelt sind (Boehme et al., 2004; Abadias et al., 2008; Berthold-Pluta et al., 2017; Keshri et al., 2019). Sprossen können als Überträger von pathogenen Enterobakterien-Stämmen auf den Menschen dienen (Taormina et al., 1999; Buchholz et al., 2011). Das Vorkommen von antibiotikaresistenten Enterobakterien auf Sprossen wurde ebenfalls nachgewiesen (Boehme et al., 2004; Freitag et al., 2018; Huizinga et al., 2018), womit Sprossen als Vehikel auch für die Übertragung von antibiotikaresistenten Bakterien auf den Menschen dienen könnten. Mittels exogener Plasmid-Isolierung wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass bei Optimaltemperaturen Übertragung von Antibiotikaresistenzplasmiden zwischen Enterobakterien auf Sprossenprodukten stattfindet. Auch während der Sprossung der Samen und dem anschließenden Wachstum wurde die Übertragung von Antibiotikaresistenzplasmiden nachgewiesen (Molbak et al., 2003; Luo und Matthews, 2023). Dabei wurde einerseits eine Plasmid-Übertragung nach Zugabe eines Spender-Empfänger-Systems nachgewiesen (Luo und Matthews, 2023) und andererseits eine Übertragung von Resistenzplasmiden von zugegebenen Spenderstämmen auf Bakterien der Sprossenmikrobiota (Molbak et al., 2003). Für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen entlang der Farm-to-Fork-Route ist die Ermittlung von konjugativen Resistenzplasmiden, die sich auf pflanzlichen Frischeprodukten befinden, wie dies bei Blau et al. (2018) mit Salat, Rucola und Koriander durchgeführt wurde, besonders wichtig. Dabei wurden die von den Produkten angereicherten Bakterien als Spenderstämmen für die exogene Plasmid-Isolierung mittels Filtermating verwendet (Blau et al., 2018). Mit dieser Methode wurden Tetracyclin-resistente Transkonjuganten mit einer Transferrate zwischen  $10^{-4}$  (gemischter Salat) und  $10^{-9}$  (Rucola) erreicht (Blau et al., 2018). In der vorliegenden Studie wurde die exogene Plasmid-Isolierung ähnlich durchgeführt, wie bei Blau et al. (2018) beschrieben, brachte allerdings keine Transkonjuganten. Im Vergleich zur Studie von Blau et al. (2018) wurde in der vorliegenden Studie ein Verhältnis von Empfängerstamm zu angereicherter Probe von 1:10 statt 1:40, und eine Konjugationstemperatur von 37 °C anstatt 28 °C verwendet. Die 16S rRNA-Gen Metagenom-Daten der Sprossenproben zeigten, dass

in den angereicherten Sprossenproben die Gattungen *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Escherichia* einen relativen Anteil zwischen 43 % und 49 % ausmachten. Der Anteil aller *Enterobacteriaceae* lag bei über 50 %. Somit wären theoretisch viele potenzielle *Enterobacteriaceae*-Spenderstämme vorhanden. Da keine Isolierung einzelner Tetracyclin-resistenter Enterobakterien von Sprossen stattfand, kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Stämme Antibiotikaresistenzplasmide enthielten. Die Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass der Anteil an mittels Empfängerstamm einfangbaren Antibiotikaresistenzplasmiden gering gewesen sein könnte. Zusätzlich zu dem Filtermating, wurde der Empfängerstamm gemeinsam mit den Sprossen inkubiert. Mit den Ergebnissen wurde nachgewiesen, dass konjugative Antibiotikaresistenzplasmide direkt von auf Sprossen vorhandenen Bakterien ohne Anreicherungsschritt in einen *E. coli*-Empfängerstamm eingefangen werden können. Die exogene Plasmid-Isolierung wurde gewählt, um Plasmide, die einen bestimmten Resistenzphänotyp vermitteln, in einen Empfängerstamm einzufangen. Der eingesetzte *E. coli* CV601-Empfängerstamm wurde bereits in anderen Studien erfolgreich für Konjugationsversuche und für die exogene Plasmid-Isolierung aus Umwelt- und Lebensmittelproben verwendet (Heuer et al., 2012; Wolters et al., 2014; Blau et al., 2018; Marathe et al., 2021). Mit dem *E. coli*-Empfängerstamm konnten Plasmide von unbekanntem Spenderstamm exogen eingefangen und transferierbare Resistenzplasmide betrachtet werden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der Empfängerstamm ebenfalls einen Einfluss auf die Übertragbarkeit der Plasmide hat (Sheppard et al., 2020; Benz et al., 2021) und wahrscheinlich nicht die gesamten mobilen Resistenzplasmide der auf den Sprossen befindlichen Bakterien abgebildet werden konnten. Die detektierten Plasmide weisen darauf hin, dass die Spender wahrscheinlich zu der Familie der *Enterobacteriaceae* gehörten. Denn bei IncF-Plasmiden handelt es sich um Plasmide mit engem Wirtsspektrum (Villa et al., 2010; Rozwandowicz et al., 2018). Dies zeigten weiterhin auch die von MOB-suite prognostizierten Wirtsreichweiten. Die Arbeit beschränkte sich somit auf transferierbare Antibiotikaresistenzplasmide von Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae*. Die 16S rRNA-Gen Metagenom-Daten der nicht angereicherten Sprossenproben zeigten, dass *Pseudomonas* die dominierende Gattung war. Um deren Plasmide einfangen zu können, hätte zusätzlich ein *Pseudomonas*-Empfängerstamm, wie z. B. *Pseudomonas putida* UWC1 eingesetzt werden können (Smalla et al., 2000).

Interessant war, dass von den Sprossen nur Transkonjuganten mit einem Tetracyclin-resistenten, allerdings nicht mit Cefotaxim-resistenten Phänotypen selektiert wurden. Mit Cefotaxim sollten dabei Plasmide mit ESBL-Genen selektiert werden.  $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Spektrum sind ein wichtiger Antibiotikaresistenz-Mechanismus bei Enterobakterien und werden oft von Genen auf Plasmiden kodiert (z. B. *bla<sub>CTX</sub>*), die dann potenziell via HGT weiter verbreitet werden (Wang et al., 2013; Branger et al., 2018; Li et al., 2019; Hawkey et al., 2022b; Wang et al., 2022). Dabei sind ESBL-produzierende Enterobakterien – besonders die dritt-Generations-Cephalosporin-resistenten *E. coli* und *K. pneumoniae* – weltweit ein Problem (Antimicrobial Resistance, 2022). Auch auf pflanzlichen Frischeprodukten wurden ESBL-produzierende Bakterien bereits nachgewiesen (Nuesch-Inderbinen et al., 2015; Zurfluh et al., 2015; Blau et al., 2018; Freitag et al., 2018). Im Speziellen können auch Sprossen mit Enterobakterien kontaminiert sein, die klinisch relevante ESBL-Gene wie *bla<sub>CTX-M</sub>* und *bla<sub>SHV</sub>* tragen (Reuland et al., 2014; Margot et al., 2016; Huizinga et al., 2018). Die ESBL-produzierenden Stämme

Kpneu28 und Kpneu34, deren Plasmide in dieser Studie näher charakterisiert wurden, stammten – gemeinsam mit weiteren ESBL-produzierenden *K. pneumoniae*-Stämmen – ebenfalls von Sprossen (Loop, 2019). Deshalb wurde Cefotaxim als Selektivantibiotikum verwendet, um mögliche ESBL-kodierende Plasmide von Bakterien auf Sprossen einzufangen. Überraschend war, dass in den durchgeführten Konjugationsexperimenten keine Transkonjuganten mit ESBL-kodierenden Plasmiden detektiert wurden. Auf Sprossen wurden zuvor ESBL-produzierende Bakterien nachgewiesen, allerdings war die Prävalenz sehr unterschiedlich. Bei einer Studie in der Schweiz wurden nur in 2,9 % (insg. 102 Proben) der Sprossen ESBL-produzierende Bakterien detektiert (Margot et al., 2016). In einer weiteren Schweizer Studie wurden auf keiner der 23 getesteten Sprossenproben ESBL-produzierende Bakterien nachgewiesen (Nuesch-Inderbinen et al., 2015). Eine Studie aus den Niederlanden fand hingegen in 19 % der 131 Proben (Zeitraum: 2013 bis 2016) ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* (Huizinga et al., 2018). Bei einer Studie aus Deutschland war keines der 109 *Enterobacteriaceae*-Isolate von Sprossen, Misch- und Fertigsalaten phänotypisch ESBL-positiv (Stoll et al., 2018). In einer Studie mit 2.256 Lebensmittelproben aus Deutschland, wurden in 17,7 % der Proben Cefotaxim-resistente *E. coli*-Isolate gefunden, wobei der Anteil an ESBL-positiven Isolaten zwischen den Produktgruppen stark schwankte (Gemüse: 0,3 % bis Hähnchen: 74,9 %) (Kaesbohrer et al., 2019). Somit kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund des kurzen Beprobungszeitraums und der meist geringen Prävalenz von ESBL-produzierenden Enterobakterien auf pflanzlichen Produkten, keine Cefotaxim-resistenten Transkonjuganten detektiert wurden. In künftigen Versuchen könnten Konjugationsversuche, die über einen längeren Zeitraum hinweg durchgeführt werden, zu ESBL-produzierenden Transkonjuganten führen.

In ihrer Studie erhielten Blau et al. (2018) mittels exogener Plasmid-Isolierung insgesamt 91 Transkonjuganten mit Tetracyclin-resistentem Phänotyp nach der Inkubation des Empfängerstammes mit den angereicherten Proben von Koriander, Rucola und gemischtem Salat. Insgesamt wurden 15 repräsentative Transkonjuganten für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Die Plasmide besaßen die Replikon-Typen IncFIB, IncFII, IncP und IncI, wobei IncFIB und IncFII am häufigsten vertreten waren (Blau et al., 2018). Bei der exogenen Plasmid-Isolierung in der vorliegenden Studie wurden die Antibiotikaresistenzplasmide als IncFIB- und IncFII-Replikon-Typen identifiziert. IncI-Plasmide mit engem und IncP-Plasmide mit breitem Wirtsspektrum wurden hingegen nicht detektiert. Weiterhin wurden mobilisierbare Col-Plasmide gemeinsam mit IncFIB(K)-Plasmiden bzw. dem Multireplikon IncFIB/IncFII(K)-Plasmid gefunden. Col-Plasmide wurden bei Blau et al. (2018) nicht als cotransferierte Plasmide nachgewiesen. Dies könnte daran liegen, dass bei der PCR-basierten Methode zum Nachweis der Plasmid-Replikons keine Primer für Col-Replikon-Typen vorhanden sind (Carattoli et al., 2005; Blau et al., 2018). Die Col-Plasmide besaßen jedoch keine Antibiotikaresistenzgene, wie auch schon die Col-Plasmide aus den zuvor charakterisierten Enterobakterien (Kapitel 3.1.1). Eine Studie von Barry et al. (2019) zeigte, dass kryptische, mobilisierbare Plasmide (Col440I) mit hohen Raten von großen Antibiotikaresistenzplasmiden cotransferiert werden können. Dies bestätigt auch die vorliegende Studie. Denn der Co-Transfer der kleinen, teilweise identischen Plasmide war bei den Versuchen mit den Produkten SP8, SP9 und SP10 zu finden. Hierbei handelte es sich jeweils um einen Co-Transfer von

kleinen, kryptischen Plasmiden gemeinsam mit dem Antibiotikaresistenzplasmid. In den meisten Fällen wurden die 4.624 bp und 3.574 bp großen Plasmide gleichzeitig gefunden.

Die Col-Plasmide Col440I und Col(pHAD28) wurden von MOB-suite als nicht mobilisierbar eingestuft. Da die Kombination dieser beiden kleinen Plasmide in Kombination mit dem IncFIB(K) häufig in den Transkonjuganten der Sprossenproben SP8, SP9 und SP10 detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass diese durch den Konjugationsapparat des IncFIB(K)-Plasmids mobilisiert werden können.

In einer Studie aus den Niederlanden zu ESBL-produzierenden *Enterobacteriaceae* auf Bohnensprossen wurden ESBL-produzierende *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola* und *En. cloacae* detektiert (Huizinga et al., 2018). Dabei wurden sowohl nah verwandte *Klebsiella*-Isolate als auch weit entfernt verwandte Isolate mit ESBL-Phänotyp nachgewiesen (Huizinga et al., 2018). In einem Zeitraum von zwei Wochen wurde eine Chargenkontamination über fünf Proben hinweg festgestellt, wofür eine klonale Kontamination mit einem *K. pneumoniae*-Stamm verantwortlich zu sein schien (Huizinga et al., 2018). Huizinga et al. (2018) schlussfolgerten daraus, dass neue ESBL-produzierende Stämme in den Betrieb eingetragen wurden, was zu der Chargenkontamination führte und die ESBL-produzierenden *Klebsiella*-Stämme nicht im herstellenden Betrieb persistierten. Jedoch wurden die Plasmide der ESBL-produzierenden Isolate nicht vollständig dargestellt und miteinander verglichen (Huizinga et al., 2018). Dabei ist dies wichtig, um herauszufinden, ob es neben der klonalen *K. pneumoniae*-Kontamination auch mittels HGT übertragene ESBL-kodierende Plasmide auf Sprossen gab. In der vorliegenden Studie wurden über einen kurzen Zeitraum hinweg identische, bzw. sehr ähnliche Antibiotikaresistenzplasmide mittels exogener Plasmid-Isolierung eingefangen. Während in der Sprossenprobe SP7 nur kleinere (ca. 71 kbp) und in SP10 nur große Antibiotikaresistenzplasmide (ca. 180 kbp) gefunden wurden, waren auf SP8 und SP9 beide Antibiotikaresistenzplasmide (ca. 71 kbp und ca. 180 kbp) vorhanden. Allerdings war das kleinere Antibiotikaresistenzplasmid dominierend. Dieses kleinere Plasmid (ca. 71 kbp) zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung über die Sprossenproben hinweg, während die großen Resistenzplasmide (ca. 180 kbp) kleinere und größere (z. B. X/SP8-Cal/13) Abweichungen voneinander zeigten. Dabei könnte es sich ebenfalls, wie bei Huizinga et al. (2018) geschlussfolgert, um eine Chargenkontamination eines klonalen Stammes handeln. Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass während des Vorgangs des Sprossens auch Übertragung von Antibiotikaresistenzplasmiden stattfinden kann (Luo und Matthews, 2023), womit die Persistenz gut angepasster Plasmide innerhalb des Herstellerbetriebs nicht ausgeschlossen werden kann. Allerdings wären hierfür weitere Konjugationversuche mit dem gleichen Produkt über einen längeren Beprobungszeitraum notwendig.

Da es sich bei IncF-Plasmiden um Replikon-Typen mit dem Wirtsbereich der *Enterobacteriaceae* handelt (Villa et al., 2010; Rozwandowicz et al., 2018), ist davon auszugehen, dass es sich bei den Spenderstämmen um Enterobakterien handelte. Bei der in dieser Studie verwendeten Methode der exogenen Plasmid-Isolierung wurden nur Transkonjuganten mit bestimmtem Resistenzphänotyp betrachtet, wobei die Spenderstämme unbekannt sind. Die 16S rRNA-Gen Mikrobiom-Analyse der angereicherten Sprossenproben zeigte, dass *Enterobacter*, *Citrobacter* und *Klebsiella* zu den prävalentesten Gattungen zählten. Bakterien dieser Gattungen könnten Spenderstämme der exogen eingefangenen Plasmide darstellen. Allerdings konnte im Rahmen der Studie nicht geklärt werden, ob

die ca. 71 kbp bzw. ca. 180 kbp großen Plasmide jeweils aus einem klonalen Spenderstamm übertragen wurden, oder ob diese in unterschiedlichen Enterobakterien-Stämmen vorlagen und von diesen übertragen wurden. Hierfür wäre eine parallele Selektion von Tetracyclin-resistenten Enterobakterien von den jeweiligen Sprossenproben mit anschließender Charakterisierung der Plasmide nötig, wie bei Blau et al. (2018) beschrieben.

Mit der vorliegenden Studie stellte sich heraus, dass Konjugation auf dem Lebensmittel ohne Nährstoffzugabe stattfinden kann. Dabei wurden erstmals mittels exogener Plasmid-Isolierung Tetracyclin-resistente Plasmide direkt von auf den Sprossenproben befindlichen Bakterien in einen *E. coli*-Empfängerstamm eingefangen. Die beschriebene Methode eignet sich somit gut, transferierbare Resistenzplasmide von Enterobakterien direkt auf dem pflanzlichen Produkt in einen Empfängerstamm einzufangen, um diese näher zu untersuchen.

Die nicht angereicherten Sprossenproben repräsentieren die von den Sprossen abgelöste mikrobielle Fraktion direkt nach dem Kauf, bzw. nach einer kurzen Kühlung bei 4 °C. Dabei wurde eine große Diversität in der Sprossenmikrobiota festgestellt, wie auch in der Studie von Keshri et al. (2019). Die untersuchten Alfalfa- und Mungobohnen-Sprossen von zwei unterschiedlichen Herstellern zeigten nach dem Kauf in den nicht angereicherten Proben zwischen 53 und 107 Gattungen (Alfalfa-Sprossen) bzw. zwischen 36 und 61 Gattungen (Mungobohnen-Sprossen) (16S rRNA-Gen Metagenom, Illumina) (Keshri et al., 2019). *Pseudomonas* war dabei die prävalenteste Gattung und auch Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* waren in hoher Abundanz vertreten (Keshri et al., 2019). Auch auf Radieschen-Sprossen waren *Pseudomonas* die dominierende Gattung (Asakura et al., 2016). Die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein. Dabei werden Pseudomonaden nicht nur auf Sprossen detektiert, sondern auch auf Salaten (ready-to-eat) und Gemüse (Matos et al., 2002; Caldera et al., 2016; Soderqvist et al., 2017; Ruiz-Roldan et al., 2021). *Pseudomonas* sind Gram-negative, obligat aerobe Bakterien und sind mesophil sowie psychrotroph (Caldera et al., 2016). Zudem können Pseudomonaden pflanzliche Lebensmittel zersetzen und sind daher als psychrotrophe Verderbniserreger bekannt (Caldera et al., 2016; Raposo et al., 2016). Die Kältetoleranz der Pseudomonaden könnte deren hohe Abundanz in diesen nicht angereicherten Sprossenproben im Vergleich zu weniger kältetoleranten Bakterien erklären. In der vorliegenden Studie wurde ein Sprossenmix aus Alfalfa- und Radieschen-Sprossen untersucht. Die große Anteil an *Pseudomonas* im untersuchten Sprossenmix könnte teilweise dadurch erklärt werden, dass Radieschen-Sprossen generell einen hohen Anteil an *Pseudomonas* besitzen (Asakura et al., 2016; Young Kim et al., 2022). Hingegen dominieren auf Alfalfa-Sprossen Vertreter der *Enterobacteriaceae* (Jang et al., 2021; Young Kim et al., 2022). Eine Verzerrung der Gattungshäufigkeiten durch die Probenentnahme kann dabei nicht ausgeschlossen werden. *Escherichia* wurde in der vorliegenden Studie nur in einer Probe nach Anreicherung in geringer Menge detektiert. Die geringe Prävalenz an *Escherichia* spp. stimmte mit Ergebnissen von Keshri et al. (2019) überein, die in keiner von 30 Mungobohnen- und nur in einer von 30 Alfalfa-Sprossenproben *E. coli* nachweisen konnte.

In der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 ist festgelegt, dass Lebensmittel grundsätzlich für den Menschen unbedenklich sein müssen und unsichere Lebensmittel nicht verkauft werden dürfen. Demnach dürften, wie in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 vorgeschrieben, in keiner Probe von fünf

Probeeinheiten einer Stichprobe (á 25 g) *Salmonella* vorhanden sein. Ein qualitativer Nachweis zur Bestimmung von *Salmonella*, nach ISO 6579 wurde im Rahmen der Arbeit nicht durchgeführt. Mittels 16S rRNA-Gen Metagenom-Analyse wurden in allen nicht angereicherten Sprossenproben *Salmonella*-DNA in relativer Häufigkeit zwischen 0,1 % und 0,5 % detektiert. Bei einer vergleichbaren Studie wurde *Salmonella*-DNA ebenfalls in Sprossen gefunden, allerdings erst nach einer Lagerzeit von drei Wochen bei 4 °C und mit niedriger Abundanz von 0,004 % (Keshri et al., 2019). Da kein qualitativer Nachweis der Salmonellen nach ISO 6579 stattfand kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese lebendig und somit virulent waren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine diverse Sprossenmikrobiota mit Pseudomonaden und Vertretern der *Enterobacteriaceae*-Familie. Von diesen auf Sprossen befindlichen Bakterien können Antibiotikaresistenzplasmide direkt in einen Empfängerstamm eingefangen werden, wobei das enge Wirtsspektrum der eingefangenen Plasmide auf Enterobakterien-Spenderstämme hinweist.

#### 4.5 Antibiotikaresistente Bakterien auf pflanzlichen Lebensmitteln – Bedeutung für den Menschen

Als Teil der vollwertigen Humanernährung empfiehlt die DGE täglich den Verzehr von mindestens drei Portionen Gemüse und Salat (Oberritter et al., 2013; DGE, 2017). Pflanzliche Lebensmittel sind dabei verglichen mit dem niedrigen Energiegehalt reich an Nährstoffen (Darmon et al., 2005). Zudem kann eine pflanzenreiche Ernährung die humane Darmmikrobiota – und damit auch die Gesundheit – positiv beeinflussen (David et al., 2014). Der Gesundheitsaspekt ist für Verbraucherinnen und Verbraucher ein wichtiger Grund, Obst und Gemüse zu verzehren (BMEL, 2022). Allerdings kann der Verzehr von nicht erhitzten pflanzlichen Lebensmitteln auch negative Auswirkungen auf die Gesundheit haben, wenn diese mit pathogenen Erregern besiedelt sind. So sind pflanzliche Lebensmittel nicht steril, sondern vielmehr mit den verschiedensten Mikroorganismen besiedelt (Abadias et al., 2008; Campos et al., 2013; Leff und Fierer, 2013; Fiedler et al., 2017). Der Verzehr von pflanzlichen Frischeprodukten mit pathogenen Bakterien kann somit zu lebensmittelbedingten Infektionsausbrüchen führen (Buchholz et al., 2011; Callejon et al., 2015; Sharapov et al., 2016; Vestrheim et al., 2016). Auch wenn die Prävalenz von Humanpathogenen auf pflanzlichen Lebensmitteln in Deutschland gering ist (Fiedler et al., 2017), wird vulnerablen Personen (Kindern bis zu fünf Jahren, Schwangeren, immunsupprimierten Menschen und Senioren) der Verzehr von rohen Sprossen und ready-to-eat-Salaten nicht empfohlen (BfR, 2020, 2021).

Neben pathogenen werden auch antibiotikaresistente Bakterien auf pflanzlichen Frischeprodukten gefunden (Boehme et al., 2004; Schwaiger et al., 2011; Reuland et al., 2014; Kim et al., 2015; Jongman und Korsten, 2016; Blau et al., 2018; Iseppi et al., 2018; Al-Kharousi et al., 2019; Richter et al., 2019; Cho et al., 2021). Damit rücken diese als Überträger von Antibiotikaresistenzgenen weiter in den Fokus. Die vorliegende Studie sowie die Studie von Blau et al. (2018) zeigen, dass auf den pflanzlichen Frischeprodukten Bakterien mit konjugativen Antibiotikaresistenzplasmiden vorhanden sind, die Resistenzgene zwischen Bakterien transferieren können. Wenn lebende Bakterien im Darmtrakt ankommen, kann dort ein Austausch von Antibiotikaresistenzplasmiden auf Bakterien der

Darmmikrobiota stattfinden (Duval-Iflah et al., 1980; Lester et al., 2006; Leon-Sampedro et al., 2021; Li et al., 2022). da Silva et al. (2021) zeigten, dass Gene, die auch auf den Plasmiden in der vorliegenden Studie detektiert wurden (*sul1*, *sul2*, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *tet(A)*, *tet(B)*, *qnrB*) im Darm der Ernährungsgruppen Omnivor, Ovolactovegetarier und Veganer vorhanden waren. Somit ist ein Antibiotikaresistenzgen-Austausch zwischen mit der Nahrung aufgenommenen Bakterien und Darmbakterien vorstellbar. Dabei gilt die Besiedelung mit antibiotikaresistenten Bakterien als Risikofaktor für eine Folgeinfektion (BfR, 2019; Prado et al., 2022).

Im humanen Darmmikrobiom sind Antibiotikaresistenzgene vorhanden und aufgrund der Dichte sogar angereichert verglichen mit Umweltproben (Hu et al., 2013). Dabei stellen Lebensmittel eine der Routen dar, mit der antibiotikaresistente Bakterien auf den Menschen übertragen werden können. Bei den Lebensmitteln ist zwischen pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln zu unterscheiden. Während bei pflanzlichen Lebensmitteln die Prävalenz von antibiotikaresistenten Bakterien gering ist (van Hoek et al., 2015; Stoll et al., 2018; Kaesbohrer et al., 2019), ist Fleisch stärker mit antibiotikaresistenten Bakterien belastet (BVL, 2017; Kaesbohrer et al., 2019). Das Zoonosemonitoring zeigte, dass die Prävalenz von ESBL/AmpC-bildenden *E. coli* auf Fleisch – besonders bei Hähnchen und Pute – höher war als bei pflanzlichen Frischeprodukten (BVL, 2022). Jedoch wird Fleisch meist vor dem Verzehr durch Erhitzen dekontaminiert, wodurch es zu einer drastischen Reduktion der antibiotikaresistenten Bakterien kommt. Andererseits muss wiederum beachtet werden, dass es bei der Zubereitung zu einer Kreuzkontamination zwischen den unterschiedlichen Lebensmittelgruppen kommen kann (Ravishankar et al., 2010). Auch eine Kontamination bei der Speisenzubereitung durch verunreinigtes Küchengerät ist möglich (Pletz et al., 2018). Neben Lebensmitteln als möglicher Eintragsquelle gibt es weitere Routen, über die Antibiotikaresistenzgene auf den Menschen übertragen werden können. So kann eine Übertragung auch zwischen Menschen (Valenza et al., 2017; Leon-Sampedro et al., 2021; Martak et al., 2022) oder zwischen Tieren und Menschen (Spoor et al., 2013; Naziri et al., 2022) stattfinden. Somit gibt es mehrere Eintragswege für Antibiotikaresistenzgene auf den Menschen, wobei pflanzliche Frischeprodukte einer dieser möglichen Wege sind. Noch nicht geklärt ist, welchen Anteil die unterschiedlichen Eintragswege an der Prävalenz antibiotikaresistenter Bakterien (inkl. Plasmiden) im Darmtrakt des Menschen haben.

Ein erhöhtes Gefahrenpotenzial für gesunde Menschen durch Konsum von pflanzlichen Frischeprodukten mit übertragbaren Antibiotikaresistenzplasmiden sieht das Bundesinstitut für Risikobewertung nicht (BfR, 2019). Den Vorschlag für vulnerable Personengruppen, auf den Verzehr von geschnittenen und verarbeiteten pflanzlichen Lebensmitteln zu verzichten, erweitert das BfR allerdings um Menschen die Antibiotika konsumieren (BfR, 2019).

Für die Plasmid-Übertragung ist ein Zell-Zell-Kontakt notwendig. Für die in der vorliegenden Studie detektierten IncF-Plasmide beschränkt sich der Wirtsbereich auf *Enterobacteriaceae*, die dem Phylum *Proteobacteria* angehören. Die Mikrobiota des Darms ist komplex, denn dort befinden sich Hefen, Viren und Bakterien (Rinninella et al., 2019). Die Bakteriendichte im menschlichen Verdauungstrakt ist im Dickdarm am höchsten (O'Hara und Shanahan, 2006; Sekirov et al., 2010). Dabei befinden sich neben den dominierenden Phyla *Firmicutes* und *Bacteroidetes* auch weniger prävalente Phyla wie *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* und *Verrucomicrobia* (Eckburg et al., 2005; Arumugam et

al., 2011). Allerdings gibt es eine große Variabilität in der Zusammensetzung der bakteriellen Darmmikrobiota. Bei einer Studie zur Bestimmung der intestinalen Darmmikrobiota von älteren Menschen lag der durchschnittliche Anteil an *Proteobacteria* bei 2 %, jedoch gab es auch Individuen mit 11 % bis 23 % *Proteobacteria* (Claesson et al., 2011). Auch Erkrankungen, wie das Reizdarmsyndrom mit überwiegendem Durchfall, können mit einer erhöhten *Proteobacteria*- und *Firmicutes*-Häufigkeit im Vergleich mit gesunden Personen verbunden sein (Krogus-Kurikka et al., 2009). Mit einer erhöhten Anzahl an *Proteobacteria* als potenziellen Empfängerstämmen, könnte Konjugation mit den konjugativen IncF-Plasmiden, die in dieser Studie gefunden wurden, innerhalb des Dickdarms potenziell vermehrt stattfinden. Auch für diese Personen sollte Rohverzehr von pflanzlichen Frischeprodukten, die mit pathogenen oder antibiotikaresistenten Bakterien belastet sein können, abgeraten werden.

Somit kann geschlussfolgert werden, dass pflanzliche Frischeprodukte wie Mischsalate und Sprossen für gesunde Menschen keinen gesundheitlichen Nachteil bringen. Allerdings sollten vulnerable Personen, Personen die Antibiotika einnehmen und Personen, die aufgrund einer Erkrankung eine erhöhte Abundanz von Enterobakterien in ihrem Darmtrakt aufweisen, diese Produkte nicht konsumieren.

#### 4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit der gewählten *de novo*-Assemblierungsmethode ist es gelungen, die Chromosomen und Plasmide der 22 Enterobakterien vollständig darzustellen. Dabei wurden in 17 Stämmen insgesamt 40 Plasmide detektiert, die sich sehr unterschieden. Neben kleinen, kryptischen gab es auch große Plasmide. Auf den großen Plasmiden wurden teilweise Gene für Transfersysteme, Metall- und Antibiotikaresistenz gefunden. Etwa 28 % der Plasmide besaßen Antibiotikaresistenzgene und insgesamt sechs Plasmide (15 %) besaßen zusätzlich ein Transfersystem für Konjugation. Drei Stämme wurden daraufhin für Übertragungsversuche ausgewählt. In künftigen Studien sollten mehr pflanzliche Frischeprodukte und besonders verzehrfertige Mischsalate und Sprossen untersucht werden, um ein vollständigeres Bild über die übertragbaren Antibiotikaresistenzplasmide zu erhalten. Dabei wäre eine quantitative und qualitative Untersuchung der Produkte hinsichtlich des Vorkommens von Antibiotikaresistenzplasmiden wichtig.

Bei zwei der drei getesteten Spenderstämmen konnte der Transfer des Resistenzplasmids nachgewiesen werden. Mit den Ergebnissen wurde gezeigt, wie wichtig Konjugationsversuche mit natürlichen und gut charakterisierten Spenderstämmen sind, um die Mechanismen der Antibiotikaresistenzverbreitung besser verstehen zu können. So zeigte sich durch die Sequenzierung der Transkonjuganten, dass zwischen den Plasmiden der Spenderstämmen Rekombinationen stattgefunden hatten. Das *tet(A)*-Resistenzgen des Spenderstammes Ec1115 wurde sogar durch alle drei konjugativen Plasmide in den Empfängerstamm übertragen. Das Zusammenspiel zwischen den Plasmiden durch mobile genetische Elemente könnte somit größer sein, als bisher vermutet. Deshalb ist es wichtig, in künftigen Untersuchungen die intrazelluläre Mobilität bei Konjugationsversuchen zu berücksichtigen.



Plasmid-Transfer kann nicht nur auf komplexen Nährmedien stattfinden, sondern auch auf dem aus geschnittenem Salat austretenden Pflanzensaft, der in der vorliegenden Studie durch Salat-Agar repräsentiert wurde. Auch in der komplexen Mikrobiota von Sprossen und Mischsalaten war die Übertragung zwischen Spender- und Empfängerstamm möglich. Allerdings ist der Transfer temperaturabhängig. Bei 10 °C war kaum bzw. kein Transfer nachzuweisen. Bei Temperaturen von 4 °C oder 6 °C ist eine Übertragung als noch geringer einzuschätzen. Dagegen waren die Transferraten bei höheren Temperaturen erhöht. Insofern zeigen die Ergebnisse, dass die Einhaltung der Kühlkette vom herstellenden Betrieb bis zum Verbraucher nicht nur wichtig ist, um den Produktverderb und das Wachstum pathogener Bakterien zu minimieren, sondern auch, um die Übertragung von Antibiotikaresistenzplasmiden zu vermeiden. Da ein Empfängerstamm mit Aminosäure- und Thiamin-Synthesedefizit verwendet wurde ist nicht klar, ob die Unterschiede in der Transferrate zwischen LB- und Salat-Agar (21 °C und 37 °C) auch auf ein verändertes Verhältnis zwischen Spender und Empfänger zurückzuführen sind. Deshalb sollten in künftigen Versuchen die Keimzahlen der Spender- und Empfängerstämmen ermittelt werden, um Einflüsse unterschiedlicher Wachstumsraten in die Auswertung einschließen zu können.

Durch exogene Plasmid-Isolierung wurden Antibiotikaresistenzplasmide direkt von Sprossen in einen *E. coli*-Empfängerstamm eingefangen. Dabei wurden Tetracyclin-resistente Transkonjuganten detektiert, wohingegen in dem Beprobungszeitraum keine Cefotaxim-Resistenz vermittelnden Plasmide gefunden wurden. Durch die Sequenzierergebnisse wurden in einem kurzen Beprobungszeitraum ähnliche bzw. identische Transkonjuganten identifiziert. Dies wirft die Frage auf, ob es in dem herstellenden Betrieb persistierende, konjugative Antibiotikaresistenzplasmide gibt, oder ob die detektierten Plasmide in den Betrieb von außen eingetragen werden. Huizinga et al. (2018) fanden in ihren Untersuchungen von Sprossenprodukten eine Chargenkontamination mit einem *Klebsiella*-Stamm. Deshalb sollte in künftigen Studien untersucht werden, ob es neben klonaler Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien auch eine Kontamination mit Plasmiden gibt, die mittels HGT in unterschiedliche Enterobakterien-Stämme transferieren und somit im Betrieb persistieren. Dies könnte – wie in der vorliegenden Studie – durch exogene Plasmid-Isolierung erforscht werden, allerdings müsste ein längerer Beprobungszeitraum gewählt werden. Ebenfalls wäre eine Beprobung des Sprossen-herstellenden Betriebs denkbar, um Nischen (Biofilme) zu identifizieren, in denen Bakterien persistieren können und günstige Bedingungen für HGT vorherrschen. Die feuchtwarmen Bedingungen fördern das Bakterienwachstum von Enterobakterien und ermöglichen außerdem Konjugation.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die pflanzlichen Frischeprodukte Bakterien mit übertragbaren Antibiotikaresistenzplasmiden besitzen. Somit weisen die Ergebnisse darauf hin, dass diese Produkte im Sinne des One-Health-Ansatzes als Vehikel für die Verbreitung antibiotikaresistenter Bakterien vom Erzeuger bis zum Menschen berücksichtigt und weiter untersucht werden sollten. Der Nachweis konjugativer Antibiotikaresistenzplasmide auf pflanzlichen Frischeprodukten alleine lässt keine vollständige Abschätzung für die Übertragung und damit keine Risikobewertung für den Menschen zu (BfR, 2019). Weiterhin ist nicht klar, welchen Anteil pflanzliche Frischeprodukte bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen auf den Menschen spielen (BfR, 2019). Deshalb sind

weitere Untersuchungen notwendig, um herauszufinden, welchen Anteil die Aufnahme von Bakterien mit Antibiotikaresistenzplasmiden durch den täglichen Verzehr von pflanzlichen Frischeprodukten an der Übertragung dieser auf Bakterien der menschlichen Darmmikrobiota haben. Dazu könnten beispielsweise *in vitro*-Darmmodelle, Faeces- oder Mausmodelle eingesetzt werden.

Anhand der 16S rRNA-Gen Metagenom-Analyse der Sprossenproben konnte insgesamt eine große Gattungsvielfalt und eine hohe Abundanz an Vertretern der Familien *Pseudomonadaceae* und *Enterobacteriaceae* gezeigt werden. Um herauszufinden, wie stabil die Mikrobiota der Produkte über einen längeren Zeitraum ist und ob es sich dabei um eine spezifische Betriebs-Mikrobiota handelt, könnten weitere Beprobungen und 16S rRNA-Gen Metagenom-Analysen durchgeführt werden.

## Literaturverzeichnis

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Vinas, I. (2008): Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. In: *Int J Food Microbiol* 123 (1-2), S. 121-129. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013.
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & R, S. G. (2016): Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. In: *Int J Syst Evol Microbiol* 66 (12), S. 5575-5599. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485.
- Akiba, T., Koyama, K., Ishiki, Y., Kimura, S., & Fukushima, T. (1960): On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. In: *Jpn J Microbiol* 4, S. 219-227. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1960.tb00170.x.
- Al-Kharousi, Z. S., Guizani, N., Al-Sadi, A. M., & Al-Bulushi, I. M. (2019): Antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* isolated from fresh fruits and vegetables and haracterization of their AmpC beta-lactamases. In: *J Food Prot* 82 (11), S. 1857-1863. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-19-089.
- Alvarado, A., Garcillan-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2012): A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. In: *PLoS One* 7 (7), S. e40438. DOI: 10.1371/journal.pone.0040438.
- Alvarez-Molina, A., Trigal, E., Prieto, M., Lopez, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2023): Assessment of a plasmid conjugation procedure to monitor horizontal transfer of an extended-spectrum beta-lactamase resistance gene under food chain scenarios. In: *Curr Res Food Sci* 6, S. 100405. DOI: 10.1016/j.crfs.2022.11.024.
- Amadesi, S., Ambretti, S., Lazzarotto, T., & Gaibani, P. (2023): Complete genome sequence and antimicrobial resistance analysis of ESBL-producing *Shigella sonnei* carrying small cryptic plasmids isolated in northern Italy. In: *J Glob Antimicrob Resist* 33, S. 152-154. DOI: 10.1016/j.jgar.2023.02.015.
- Aminov, R. I. (2010): A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. In: *Front Microbiol* 1, S. 134. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00134.
- Aminov, R. I. (2011): Horizontal gene exchange in environmental microbiota. In: *Front Microbiol* 2, S. 158. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00158.
- Andrews, J. M. (2001): Determination of minimum inhibitory concentrations. In: *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1, S. 5-16. DOI: 10.1093/jac/48.suppl\_1.5.
- Antimicrobial Resistance, C. (2022): Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. In: *Lancet* 399 (10325), S. 629-655. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- Armstrong, G. L., Conn, L. A., & Pinner, R. W. (1999): Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. In: *JAMA* 281 (1), S. 61-66. DOI: 10.1001/jama.281.1.61.
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016): PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. In: *Nucleic Acids Res* 44 (W1), S. W16-21. DOI: 10.1093/nar/gkw387.
- Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J., van Schaik, W., & Schurch, A. C. (2017): On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. In: *Microb Genom* 3 (10), S. e000128. DOI: 10.1099/mgen.0.000128.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Dore, J., Meta, H. I. T. C., Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H. M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K. U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Merieux, A., Melo Minardi, R., M'Rini, C.,

- Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Bork, P. (2011): Enterotypes of the human gut microbiome. In: *Nature* 473 (7346), S. 174-180. DOI: 10.1038/nature09944.
- Asakura, H., Tachibana, M., Taguchi, M., Hiroi, T., Kurazono, H., Makino, S. I., Kasuga, F., & Igimi, S. (2016): Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. In: *Journal of Food Safety* 36 (3), S. 392-401. DOI: 10.1111/jfs.12256.
- Auta, A., Hadi, M. A., Oga, E., Adewuyi, E. O., Abdu-Aguye, S. N., Adeloye, D., Strickland-Hodge, B., & Morgan, D. J. (2019): Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis. In: *J Infect* 78 (1), S. 8-18. DOI: 10.1016/j.jinf.2018.07.001.
- Bailey, J. K., Pinyon, J. L., Anantham, S., & Hall, R. M. (2011): Distribution of the *bla*TEM gene and *bla*TEM-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. In: *J Antimicrob Chemother* 66 (4), S. 745-751. DOI: 10.1093/jac/dkq529.
- Baker, S., Hardy, J., Sanderson, K. E., Quail, M., Goodhead, I., Kingsley, R. A., Parkhill, J., Stocker, B., & Dougan, G. (2007): A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella* Typhi. In: *PLoS Pathog* 3 (5), S. e59. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030059.
- Balbuena-Alonso, M. G., Cortes-Cortes, G., Kim, J. W., Lozano-Zarain, P., Camps, M., & Del Carmen Rocha-Gracia, R. (2022): Genomic analysis of plasmid content in food isolates of *E. coli* strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes. In: *Plasmid* 123-124, S. 102650. DOI: 10.1016/j.plasmid.2022.102650.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Pribelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012): SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. In: *J Comput Biol* 19 (5), S. 455-477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Barlow, M., & Hall, B. G. (2002): Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. In: *J Mol Evol* 55 (3), S. 314-321. DOI: 10.1007/s00239-002-2328-y.
- Barry, K. E., Wailan, A. M., Sheppard, A. E., Crook, D., Vegesana, K., Stoesser, N., Parikh, H. I., Sebra, R., & Mathers, A. J. (2019): Don't overlook the little guy: An evaluation of the frequency of small plasmids co-conjugating with larger carbapenemase gene containing plasmids. In: *Plasmid* 103, S. 1-8. DOI: 10.1016/j.plasmid.2019.03.005.
- Baxter, J. C., & Funnell, B. E. (2014): Plasmid Partition Mechanisms. In: *Microbiol Spectr* 2 (6), S. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0023-2014.
- Belongia, E. A., MacDonald, K. L., Parham, G. L., White, K. E., Korlath, J. A., Lobato, M. N., Strand, S. M., Casale, K. A., & Osterholm, M. T. (1991): An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. In: *J Infect Dis* 164 (2), S. 338-343. DOI: 10.1093/infdis/164.2.338.
- Bennett, P. M. (2008): Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. In: *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1 (Suppl 1), S. S347-S357. DOI: 10.1038/sj.bjpp.0707607.
- Benz, F., Huisman, J. S., Bakkeren, E., Herter, J. A., Stadler, T., Ackermann, M., Diard, M., Egli, A., Hall, A. R., Hardt, W. D., & Bonhoeffer, S. (2021): Plasmid- and strain-specific factors drive variation in ESBL-plasmid spread *in vitro* and *in vivo*. In: *ISME J* 15 (3), S. 862-878. DOI: 10.1038/s41396-020-00819-4.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010): Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. In: *Environ Microbiol* 12 (9), S. 2385-2397. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x.
- Berthold-Pluta, A., Garbowska, M., Stefanska, I., & Pluta, A. (2017): Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. In: *Food Microbiol* 65, S. 221-230. DOI: 10.1016/j.fm.2017.03.005.
- BfR (2019). Resistente Keime: Rohkost und Salat gut waschen und frisch selbst zubereiten (Stellungnahme Nr. 013/2019). Hrsg. Bundesinstitut für Risikobewertung. Online verfügbar unter

- <https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/resistente-keime-rohkost-und-salat-gut-waschen-und-frisch-selbst-zubereiten.pdf>, zuletzt geprüft am 20.06.2023.
- BfR (2020). Reclaimed waste water: preventing bacterial pathogens on fresh fruit and vegetables (Stellungnahme Nr. 021/2020). Hrsg. Bundesinstitut für Risikobewertung. Online verfügbar unter <https://www.bfr.bund.de/cm/349/reclaimed-waste-water-preventing-bacterial-pathogens-on-fresh-fruit-and-vegetables.pdf>, zuletzt geprüft am 20.06.2023.
- BfR (2021). Sicher gepflegt - Besonders empfindliche Personengruppen in Gemeinschaftseinrichtungen. Hrsg. Bundesinstitut für Risikobewertung. Online verfügbar unter <https://www.bfr.bund.de/cm/350/sicher-verpflegt-besonders-empfindliche-personengruppen-in-gemeinschaftseinrichtungen.pdf>, zuletzt geprüft am 20.06.2023.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Kock, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., & Karch, H. (2011): Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. In: *Lancet Infect Dis* 11 (9), S. 671-676. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7.
- Blau, K., Bettermann, A., Jechalke, S., Fornefeld, E., Vanrobaeys, Y., Stalder, T., Top, E. M., & Smalla, K. (2018): The transferable resistome of produce. In: *MBio* 9 (6). DOI: 10.1128/mBio.01300-18.
- Blau, K., Jechalke, S., & Smalla, K. (2020): Detection, isolation, and characterization of plasmids in the environment. In: *Methods Mol Biol* 2075, S. 39-60. DOI: 10.1007/978-1-4939-9877-7\_3.
- BMEL (2022). Deutschland, wie es isst - Der BMEL -Ernährungsreport 2022. Hrsg. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. Online verfügbar unter [https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/ernaehrungsreport-2022.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=9](https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/ernaehrungsreport-2022.pdf?__blob=publicationFile&v=9), zuletzt geprüft am 20.06.2023.
- BMG (2022). Abschluss des G7-Gesundheitsministertreffens: Weitreichende Beschlüsse gefasst. Hrsg. Bundesministerium für Gesundheit. Online verfügbar unter <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/ministerium/meldungen/treffen-der-g7-gesundheitsministerinnen-und-minister.html>, zuletzt geprüft am 16.04.2023.
- Boehme, S., Werner, G., Klare, I., Reissbrodt, R., & Witte, W. (2004): Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. In: *Mol Nutr Food Res* 48 (7), S. 522-531. DOI: 10.1002/mnfr.200400030.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. In: *Bioinformatics* 30 (15), S. 2114-2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Borges, A. S. G., Basu, M., Brinks, E., Bang, C., Cho, G. S., Baines, J. F., Franke, A., & Franz, C. M. A. P. (2023): Fast identification method for screening bacteria from faecal samples using Oxford Nanopore Technologies MinION sequencing. In: *Curr Microbiol* 80 (3), S. 101. DOI: 10.1007/s00284-023-03201-7.
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppins, J., Xavier, B. B., Malhotra-Kumar, S., Westh, H., Pinholt, M., Anjum, M. F., Duggett, N. A., Kempf, I., Nykasenoja, S., Olkkola, S., Wieczorek, K., Amaro, A., Clemente, L., Mossong, J., Losch, S., Ragimbeau, C., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2020): ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. In: *J Antimicrob Chemother* 75 (12), S. 3491-3500. DOI: 10.1093/jac/dkaa345.
- Bosi, E., Fani, R., & Fondi, M. (2011): The mosaicism of plasmids revealed by atypical genes detection and analysis. In: *BMC Genomics* 12, S. 403. DOI: 10.1186/1471-2164-12-403.
- Both, A., Huang, J. B., Kaase, M., Hezel, J., Wertheimer, D., Fenner, I., Gunther, T., Grundhoff, A., Buttner, H., Aepfelbacher, M., Rohde, H., & Hentschke, M. (2016): First report of *Escherichia coli* co-producing NDM-1 and OXA-232. In: *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 86 (4), S. 437-438. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.09.005.
- Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J. E., & Stokes, H. W. (2007): Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. In: *Trends Microbiol* 15 (7), S. 301-309. DOI: 10.1016/j.tim.2007.05.004.

- Branger, C., Ledda, A., Billard-Pomares, T., Doublet, B., Barbe, V., Roche, D., Medigue, C., Arlet, G., & Denamur, E. (2019): Specialization of small non-conjugative plasmids in *Escherichia coli* according to their family types. In: *Microb Genom* 5 (9). DOI: 10.1099/mgen.0.000281.
- Branger, C., Ledda, A., Billard-Pomares, T., Doublet, B., Fouteau, S., Barbe, V., Roche, D., Cruveiller, S., Medigue, C., Castellanos, M., Decre, D., Drieux-Rouze, L., Clermont, O., Glodt, J., Tenailon, O., Cloeckart, A., Arlet, G., & Denamur, E. (2018): Extended-spectrum beta-lactamase-encoding genes are spreading on a wide range of *Escherichia coli* plasmids existing prior to the use of third-generation cephalosporins. In: *Microb Genom* 4 (9). DOI: 10.1099/mgen.0.000203.
- Brenner, D. J., & Farmer, J. J. (2015): *Enterobacteriaceae*. In: M. E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, & W. B. Whitman (Hrsg.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (S. 1-24). DOI: 10.1002/9781118960608.fbm00222.
- Brolund, A., Rajer, F., Giske, C. G., Melefors, O., Titelman, E., & Sandegren, L. (2019): Dynamics of resistance plasmids in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during postinfection colonization. In: *Antimicrob Agents Chemother* 63 (4). DOI: 10.1128/AAC.02201-18.
- Brzuszkiewicz, E., Thurmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F. D., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G., & Daniel, R. (2011): Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enter-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). In: *Arch Microbiol* 193 (12), S. 883-891. DOI: 10.1007/s00203-011-0725-6.
- Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Bohmer, M. M., Remschmidt, C., Wilking, H., Delere, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C., Dreesman, J., Ehlers, J., Ethelberg, S., Faber, M., Frank, C., Fricke, G., Greiner, M., Hohle, M., Ivarsson, S., Jark, U., Kirchner, M., Koch, J., Krause, G., Lubert, P., Rosner, B., Stark, K., & Kuhne, M. (2011): German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. In: *N Engl J Med* 365 (19), S. 1763-1770. DOI: 10.1056/NEJMoa1106482.
- BVL (2017). Berichte zur Lebensmittelsicherheit – Zoonosen-Monitoring 2016. Hrsg. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Online verfügbar unter [https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01\\_Lebensmittel/04\\_Zoonosen\\_Monitoring/Zoonosen\\_Monitoring\\_Bericht\\_2016.html](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Monitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2016.html), zuletzt geprüft am 23.06.2023.
- BVL (2022). Zusammenfassender Bericht über die Ergebnisse der Prävalenzuntersuchungen im Zoonosen-Monitoring der Jahre 2010–2019. Hrsg. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Online verfügbar unter [https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01\\_Lebensmittel/04\\_Zoonosen\\_Monitoring/Zoonosen\\_Monitoring\\_Bericht\\_2010-2019.html;jsessionid=E671916153E55A7FD38021977AB9331F.2\\_cid363?nn=11033830](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Monitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2010-2019.html;jsessionid=E671916153E55A7FD38021977AB9331F.2_cid363?nn=11033830), zuletzt geprüft am 23.06.2023.
- Cain, A. K., Liu, X., Djordjevic, S. P., & Hall, R. M. (2010): Transposons related to Tn1696 in IncH12 plasmids in multiply antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Australian animals. In: *Microb Drug Resist* 16 (3), S. 197-202. DOI: 10.1089/mdr.2010.0042.
- Calcuttawala, F., Hariharan, C., Pazhani, G. P., Saha, D. R., & Ramamurthy, T. (2017): Characterization of E-type colicinogenic plasmids from *Shigella sonnei*. In: *FEMS Microbiol Lett* 364 (7). DOI: 10.1093/femsle/fnx060.
- Caldera, L., Franzetti, L. v., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2016): Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. In: *Food Microbiology* 54, S. 142-153.
- Callejon, R. M., Rodriguez-Naranjo, M. I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2015): Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. In: *Foodborne Pathog Dis* 12 (1), S. 32-38. DOI: 10.1089/fpd.2014.1821.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009): BLAST+: architecture and applications. In: *BMC Bioinformatics* 10, S. 421. DOI: 10.1186/1471-2105-10-421.
- Cambray, G., Guerout, A. M., & Mazel, D. (2010): Integrons. In: *Annu Rev Genet* 44, S. 141-166. DOI: 10.1146/annurev-genet-102209-163504.

- Campos, J., Mourao, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C., & Antunes, P. (2013): Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. In: *Int J Food Microbiol* 166 (3), S. 464-470. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.005.
- Canning, M., Birhane, M. G., Dewey-Mattia, D., Lawinger, H., Cote, A., Gieraltowski, L., Schwensohn, C., Tagg, K. A., Francois Watkins, L. K., Park Robyn, M., & Marshall, K. E. (2023): *Salmonella* Outbreaks linked to beef, United States, 2012-2019. In: *J Food Prot* 86 (5), S. 100071. DOI: 10.1016/j.jfp.2023.100071.
- Canton, R., & Coque, T. M. (2006): The CTX-M beta-lactamase pandemic. In: *Current Opinion in Microbiology* 9 (5), S. 466-475. DOI: 10.1016/j.mib.2006.08.011.
- Carattoli, A. (2009): Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 53 (6), S. 2227-2238. DOI: 10.1128/AAC.01707-08.
- Carattoli, A. (2011): Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. In: *Int J Med Microbiol* 301 (8), S. 654-658. DOI: 10.1016/j.ijmm.2011.09.003.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005): Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. In: *J Microbiol Methods* 63 (3), S. 219-228. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.03.018.
- Carattoli, A., Zankari, E., Garcia-Fernandez, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Moller Aarestrup, F., & Hasman, H. (2014): *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. In: *Antimicrob Agents Chemother* 58 (7), S. 3895-3903. DOI: 10.1128/AAC.02412-14.
- Carlioni, E., Andreoni, F., Omiccioli, E., Villa, L., Magnani, M., & Carattoli, A. (2017): Comparative analysis of the standard PCR-Based Replicon Typing (PBRT) with the commercial PBRT-KIT. In: *Plasmid* 90, S. 10-14. DOI: 10.1016/j.plasmid.2017.01.005.
- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Garcá, R., & Zurera, G. (2008): Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. In: *Food control* 19 (5), S. 487-494.
- Carstens, C. K., Salazar, J. K., & Darkoh, C. (2019): Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017. In: *Front Microbiol* 10, S. 2667. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02667.
- Cassini, A., Hogberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., & Burden of, A. M. R. C. G. (2019): Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. In: *Lancet Infect Dis* 19 (1), S. 56-66. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
- CDC (2022). About antimicrobial resistance. Hrsg. Center for Disease Control and Prevention. Online verfügbar unter <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html#print>, zuletzt geprüft am 13.02.2023.
- Cha, M. H., Ryu, J. G., Chi, Y. M., & Woo, G. J. (2020): Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from fresh produce and agricultural environments in Korea. In: *J Food Prot* 83 (7), S. 1115-1124. DOI: 10.4315/JFP-19-483.
- Chait, R., Vetsigian, K., & Kishony, R. (2011): What counters antibiotic resistance in nature? In: *Nat Chem Biol* 8 (1), S. 2-5. DOI: 10.1038/nchembio.745.
- Che, Y., Xia, Y., Liu, L., Li, A. D., Yang, Y., & Zhang, T. (2019): Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. In: *Microbiome* 7 (1), S. 44. DOI: 10.1186/s40168-019-0663-0.
- Che, Y., Yang, Y., Xu, X., Brinda, K., Polz, M. F., Hanage, W. P., & Zhang, T. (2021): Conjugative plasmids interact with insertion sequences to shape the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 118 (6). DOI: 10.1073/pnas.2008731118.
- Cho, G. S., Stein, M., Fiedler, G., Igbinsosa, E. O., Koll, L. P., Brinks, E., Rathje, J., Neve, H., & Franz, C. (2021): Polyphasic study of antibiotic-resistant enterobacteria isolated from fresh produce in Germany and description of *Enterobacter vonholyi* sp. nov. isolated from marjoram and

- Enterobacter dykesii* sp. nov. isolated from mung bean sprout. In: *Syst Appl Microbiol* 44 (1), S. 126174. DOI: 10.1016/j.syapm.2020.126174.
- Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J. R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., van Sinderen, D., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., Henry, C., O'Mahony, D., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., Twomey, C., Hill, C., Ross, R. P., & O'Toole, P. W. (2011): Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1 (Suppl 1), S. 4586-4591. DOI: 10.1073/pnas.1000097107.
- Clardy, J., Fischbach, M. A., & Currie, C. R. (2009): The natural history of antibiotics. In: *Current Biology* 19 (11), S. R437-R441. DOI: 10.1016/j.cub.2009.04.001.
- Clarke, J., Wu, H. C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S., & Bayley, H. (2009): Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. In: *Nat Nanotechnol* 4 (4), S. 265-270. DOI: 10.1038/nnano.2009.12.
- Clarridge, J. E., 3rd (2004): Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. In: *Clin Microbiol Rev* 17 (4), S. 840-862, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
- CLSI (2022): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (32nd Edition). Hrsg. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2023): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (33rd Edition). Hrsg. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Collignon, P. J., Conly, J. M., Andremont, A., McEwen, S. A., Aidara-Kane, A., World Health Organization Advisory Group, B. M. o. I. S. o. A. R., Agerso, Y., Andremont, A., Collignon, P., Conly, J., Dang Ninh, T., Donado-Godoy, P., Fedorka-Cray, P., Fernandez, H., Galas, M., Irwin, R., Karp, B., Matar, G., McDermott, P., McEwen, S., Mitema, E., Reid-Smith, R., Scott, H. M., Singh, R., DeWaal, C. S., Stelling, J., Toleman, M., Watanabe, H., & Woo, G. J. (2016): World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. In: *Clin Infect Dis* 63 (8), S. 1087-1093. DOI: 10.1093/cid/ciw475.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011): Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. In: *PLoS One* 6 (3), S. e17549. DOI: 10.1371/journal.pone.0017549.
- Colosi, I. A., Baciu, A. M., Opris, R. V., Peca, L., Gudat, T., Simon, L. M., Colosi, H. A., & Costache, C. (2020): Prevalence of ESBL, AmpC and carbapenemase-producing *Enterobacterales* isolated from raw vegetables retailed in Romania. In: *Foods* 9 (12). DOI: 10.3390/foods9121726.
- Cook, M. A., & Wright, G. D. (2022): The past, present, and future of antibiotics. In: *Science Translational Medicine* 14 (657), S. eabo7793. DOI: 10.1126/scitranslmed.abo7793.
- Cooper, R. M., Tsimring, L., & Hasty, J. (2017): Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. In: *Elife* 6. DOI: 10.7554/eLife.25950.
- Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E., & Stemmer, W. P. (1996): Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. In: *Nat Biotechnol* 14 (3), S. 315-319. DOI: 10.1038/nbt0396-315.
- Cury, J., Jove, T., Touchon, M., Neron, B., & Rocha, E. P. (2016): Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. In: *Nucleic Acids Res* 44 (10), S. 4539-4550. DOI: 10.1093/nar/gkw319.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011): Antibiotic resistance is ancient. In: *Nature* 477 (7365), S. 457-461. DOI: 10.1038/nature10388.
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2006): Sampling the antibiotic resistome. In: *Science* 311 (5759), S. 374-377. DOI: 10.1126/science.1120800.
- da Silva, S. F., Reis, I. B., Monteiro, M. G., Dias, V. C., Machado, A. B. F., da Silva, V. L., & Diniz, C. G. (2021): Influence of human eating habits on antimicrobial resistance phenomenon: aspects of clinical resistome of gut microbiota in omnivores, ovolactovegetarians, and strict vegetarians. In: *Antibiotics (Basel)* 10 (3). DOI: 10.3390/antibiotics10030276.



- Dahlberg, C., Bergstrom, M., & Hermansson, M. (1998): *In situ* detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. In: *Appl Environ Microbiol* 64 (7), S. 2670-2675. DOI: 10.1128/AEM.64.7.2670-2675.1998.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., & Li, H. (2021): Twelve years of SAMtools and BCFtools. In: *Gigascience* 10 (2). DOI: 10.1093/gigascience/giab008.
- Darmon, N., Darmon, M., Maillot, M., & Drewnowski, A. (2005): A nutrient density standard for vegetables and fruits: nutrients per calorie and nutrients per unit cost. In: *J Am Diet Assoc* 105 (12), S. 1881-1887. DOI: 10.1016/j.jada.2005.09.005.
- Darphorn, T. S., Bel, K., Koenders-van Sint Anneland, B. B., Brul, S., & Ter Kuile, B. H. (2021): Antibiotic resistance plasmid composition and architecture in *Escherichia coli* isolates from meat. In: *Sci Rep* 11 (1), S. 2136. DOI: 10.1038/s41598-021-81683-w.
- Darphorn, T. S., Brul, S., & Ter Kuile, B. H. (2022a): Genetic editing of multi-resistance plasmids in *Escherichia coli* isolated from meat during transfer. In: *Plasmid* 122, S. 102640. DOI: 10.1016/j.plasmid.2022.102640.
- Darphorn, T. S., Koenders-van Sintanneland, B. B., Grootemaat, A. E., van der Wel, N. N., Brul, S., & Ter Kuile, B. H. (2022b): Transfer dynamics of multi-resistance plasmids in *Escherichia coli* isolated from meat. In: *PLoS One* 17 (7), S. e0270205. DOI: 10.1371/journal.pone.0270205.
- Das, R., & Bhattacharjee, C. (2020): Lettuce. In: A. K. Jaiswal (Hrsg.), *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* (S. 143-157). Academic Press. 10.1016/B978-0-12-812780-3.00009-X.
- Datta, N., & Hedges, R. W. (1971): Compatibility groups among fi R factors. In: *Nature* 234 (5326), S. 222-223. DOI: 10.1038/234222a0.
- Datta, N., & Hughes, V. M. (1983): Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. In: *Nature* 306 (5943), S. 616-617. DOI: 10.1038/306616a0.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014): Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. In: *Nature* 505 (7484), S. 559-563. DOI: 10.1038/nature12820.
- Davies, J., & Davies, D. (2010): Origins and evolution of antibiotic resistance. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (3), S. 417-433. DOI: 10.1128/Mmbr.00016-10.
- Davis, J. J., Wattam, A. R., Aziz, R. K., Brettin, T., Butler, R., Butler, R. M., Chlenski, P., Conrad, N., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Gabbard, J. L., Gerdes, S., Guard, A., Kenyon, R. W., Machi, D., Mao, C., Murphy-Olson, D., Nguyen, M., Nordberg, E. K., Olsen, G. J., Olson, R. D., Overbeek, J. C., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomas, C., VanOeffelen, M., Vonstein, V., Warren, A. S., Xia, F., Xie, D., Yoo, H., & Stevens, R. (2020): The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. In: *Nucleic Acids Res* 48 (D1), S. D606-D612. DOI: 10.1093/nar/gkz943.
- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludova, L., & Borriello, S. P. (2014): Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. In: *Veterinary Record* 175 (13), S. 325. DOI: 10.1136/vr.102462.
- De Coster, W., D'Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2018): NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. In: *Bioinformatics* 34 (15), S. 2666-2669. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty149.
- de Toro, M., Garcillaon-Barcia, M. P., & De La Cruz, F. (2014): Plasmid diversity and adaptation analyzed by massive sequencing of *Escherichia coli* plasmids. In: *Microbiol Spectr* 2 (6). DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0031-2014.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1998): Replication and control of circular bacterial plasmids. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (2), S. 434-464. DOI: 10.1128/mmbr.62.2.434-464.1998.
- Delahaye, C., & Nicolas, J. (2021): Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. In: *PLoS One* 16 (10), S. e0257521. DOI: 10.1371/journal.pone.0257521.

- Deng, Y., Bao, X. R., Ji, L. L., Chen, L., Liu, J. Y., Miao, J., Chen, D. Q., Bian, H. W., Li, Y. M., & Yu, G. C. (2015): Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. In: *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 14. DOI: 10.1186/s12941-015-0100-6.
- DGE (2017). 10 Regeln der DGE. Hrsg. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. Online verfügbar unter <https://www.dge.de/ernaehrungspraxis/vollwertige-ernaehrung/10-regeln-der-dge/>, zuletzt geprüft am 14.04.2023.
- DGE (2020). The 14th DGE-Nutrition Report – Summary. Hrsg. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. Online verfügbar unter <https://www.dge.de/fileadmin/dok/english/nutrition-reports/14th/DGE-Nutrition-Report-summary-2020.pdf>, zuletzt geprüft am 02.08.2023.
- Di Tommaso, P., Chatzou, M., Floden, E. W., Barja, P. P., Palumbo, E., & Notredame, C. (2017): Nextflow enables reproducible computational workflows. In: *Nat Biotechnol* 35 (4), S. 316-319. DOI: 10.1038/nbt.3820.
- Douarre, P. E., Mallet, L., Radomski, N., Felten, A., & Mistou, M. Y. (2020): Analysis of COMPASS, a new comprehensive plasmid database revealed prevalence of multireplicon and extensive diversity of IncF plasmids. In: *Front Microbiol* 11, S. 483. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00483.
- Du, P., Liu, D., Song, H., Zhang, P., Li, R., Fu, Y., Liu, X., Jia, J., Li, X., Fanning, S., Wang, Y., Bai, L., & Zeng, H. (2020): Novel IS26-mediated hybrid plasmid harbouring *tet(X4)* in *Escherichia coli*. In: *J Glob Antimicrob Resist* 21, S. 162-168. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.03.018.
- Duval-Iflah, Y., Raibaud, P., Tancrede, C., & Rousseau, M. (1980): R-plasmic transfer from *Serratia liquefaciens* to *Escherichia coli* in vitro and in vivo in the digestive tract of gnotobiotic mice associated with human fecal flora. In: *Infect Immun* 28 (3), S. 981-990. DOI: 10.1128/iai.28.3.981-990.1980.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005): Diversity of the human intestinal microbial flora. In: *Science* 308 (5728), S. 1635-1638. DOI: 10.1126/science.1110591.
- EFSA (2022). Special Eurobarometer Wave EB97.2. Food safety in the EU: report. Hrsg. Publications Office of the European Union. Online verfügbar unter <https://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/eurobarometer22>, zuletzt geprüft am 20.08.2023.
- Escudero, J. A., Loot, C., Nivina, A., & Mazel, D. (2015): The Integron: Adaptation on demand. In: *Microbiol Spectr* 3 (2), S. MDNA3-0019-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014.
- Espinoza-Medina, I. E., Rodriguez-Leyva, F. J., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M. A., Acedo-Felix, E., & Martinez-Tellez, M. A. (2006): PCR identification of *Salmonella*: potential contamination sources from production and postharvest handling of cantaloupes. In: *J Food Prot* 69 (6), S. 1422-1425. DOI: 10.4315/0362-028x-69.6.1422.
- Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., Heeg, P., Ilschner, C., Kramer, A., Larson, E., Merckens, W., Mielke, M., Oltmanns, P., Ross, B., Rotter, M., Schmithausen, R. M., Sonntag, H. G., & Trautmann, M. (2017): Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? In: *GMS Hyg Infect Control* 12, S. Doc05. DOI: 10.3205/dgkh000290.
- Fang, L., Li, X., Li, L., Li, S., Liao, X., Sun, J., & Liu, Y. (2016): Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. In: *Sci Rep* 6, S. 25312. DOI: 10.1038/srep25312.
- Farmer, J. J., Brenner, D. J., & Ewing, W. H. (1980): Opposition to recent proposals which would reject the family name *Enterobacteriaceae* and *Escherichia* as its type genus. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 30 (4), S. 660-673. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-30-4-660>.
- Fernandez-Lopez, R., de Toro, M., Moncalian, G., Garcillan-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2016): Comparative genomics of the conjugation region of F-like plasmids: Five shades of F. In: *Front Mol Biosci* 3. DOI: 10.3389/fmolb.2016.00071.
- Fevre, C., Jbel, M., Passet, V., Weill, F. X., Grimont, P. A., & Brisse, S. (2005): Six groups of the OXY beta-lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 49 (8), S. 3453-3462. DOI: 10.1128/AAC.49.8.3453-3462.2005.

- Fiedler, G. (2021): Mikrobiologische Sicherheit von Gemüse und Salat: Pathogene und antibiotikaresistente Bakterien und Veränderungen der Mikrobiota während der Verarbeitung zu Fresh-Cut Salaten [Dissertation]. [https://macau.uni-kiel.de/receive/macau\\_mods\\_00002370](https://macau.uni-kiel.de/receive/macau_mods_00002370).
- Fiedler, G., Kabisch, J., Bohnlein, C., Huch, M., Becker, B., Cho, G. S., & Franz, C. (2017): Presence of human pathogens in produce from retail markets in northern Germany. In: *Foodborne Pathog Dis* 14 (9), S. 502-509. DOI: 10.1089/fpd.2016.2258.
- Fiedler, G., Schneider, C., Igbinsosa, E. O., Kabisch, J., Brinks, E., Becker, B., Stoll, D. A., Cho, G. S., Huch, M., & Franz, C. (2019): Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. In: *Bmc Microbiology* 19 (1), S. 250. DOI: 10.1186/s12866-019-1632-2.
- Filutowicz, M. (2009): Plasmids, Bacterial. In: M. Schaechter (Hrsg.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (S. 644-665). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00014-6.
- Fleming, A. (1929): On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. In: *British journal of experimental pathology* 10 (3), S. 226-236.
- Foster, T. J. (1983): Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. In: *Microbiol Rev* 47 (3), S. 361-409. DOI: 10.1128/mr.47.3.361-409.1983.
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, M. J., Follin, P., Muller, L., King, L. A., Rosner, B., Buchholz, U., Stark, K., Krause, G., & Team, H. U. S. I. (2011): Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. In: *N Engl J Med* 365 (19), S. 1771-1780. DOI: 10.1056/NEJMoa1106483.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008): Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. In: *Appl Environ Microbiol* 74 (8), S. 2461-2470. DOI: 10.1128/AEM.02272-07.
- Freitag, C., Michael, G. B., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y., Hassel, M., & Schwarz, S. (2018): Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables. In: *Vet Microbiol* 219, S. 63-69. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.03.028.
- Friedman, N. D., Temkin, E., & Carmeli, Y. (2016): The negative impact of antibiotic resistance. In: *Clin Microbiol Infect* 22 (5), S. 416-422. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.12.002.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005): Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. In: *Nat Rev Microbiol* 3 (9), S. 722-732. DOI: 10.1038/nrmicro1235.
- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2015): Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. In: *Nucleic Acids Res* 43 (Database issue), S. D261-D269. DOI: 10.1093/nar/gku1223.
- Garcillan-Barcia, M. P., Alvarado, A., & de la Cruz, F. (2011): Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. In: *FEMS Microbiol Rev* 35 (5), S. 936-956. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00291.x.
- Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., & de la Cruz, F. (2009): The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. In: *FEMS Microbiol Rev* 33 (3), S. 657-687. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x.
- Gekenidis, M. T., Qi, W., Hummerjohann, J., Zbinden, R., Walsh, F., & Drissner, D. (2018): Antibiotic-resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. In: *PLoS One* 13 (11), S. e0207857. DOI: 10.1371/journal.pone.0207857.
- George, S., Pankhurst, L., Hubbard, A., Votintseva, A., Stoesser, N., Sheppard, A. E., Mathers, A., Norris, R., Navickaite, I., Eaton, C., Iqbal, Z., Crook, D. W., & Phan, H. T. T. (2017): Resolving plasmid structures in *Enterobacteriaceae* using the MinION nanopore sequencer: assessment of MinION and MinION/Illumina hybrid data assembly approaches. In: *Microb Genom* 3 (8), S. e000118. DOI: 10.1099/mgen.0.000118.
- Gillings, M. R. (2014): Integrons: past, present, and future. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 78 (2), S. 257-277. DOI: 10.1128/MMBR.00056-13.

- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016): Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. In: *Nat Rev Genet* 17 (6), S. 333-351. DOI: 10.1038/nrg.2016.49.
- Gose, M., Krems, C., Heuer, T., & Hoffmann, I. (2016): Trends in food consumption and nutrient intake in Germany between 2006 and 2012: results of the German National Nutrition Monitoring (NEMONIT). In: *Br J Nutr* 115 (8), S. 1498-1507. DOI: 10.1017/S0007114516000544.
- Griffith, F. (1928): The significance of Pneumococcal types. In: *J Hyg (Lond)* 27 (2), S. 113-159. DOI: 10.1017/s0022172400031879.
- Guentzel, M. N. (1996): *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. In: S. Baron (Hrsg.), *Medical Microbiology* (4th Aufl.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413290>
- Guron, G. K. P., Chen, C., Du, P., Pruden, A., & Ponder, M. A. (2021): Manure-based amendments influence surface-associated bacteria and markers of antibiotic resistance on radishes grown in soils with different textures. In: *Appl Environ Microbiol* 87 (10). DOI: 10.1128/AEM.02753-20.
- Guzman-Otazo, J., Joffre, E., Agramont, J., Mamani, N., Jutkina, J., Boulund, F., Hu, Y. O. O., Jumilla-Lorenz, D., Farewell, A., Larsson, D. G. J., Flach, C. F., Iniguez, V., & Sjoling, A. (2022): Conjugative transfer of multi-drug resistance IncN plasmids from environmental waterborne bacteria to *Escherichia coli*. In: *Front Microbiol* 13, S. 997849. DOI: 10.3389/fmicb.2022.997849.
- Hall, R. M., & Collis, C. M. (1998): Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. In: *Drug Resist Updat* 1 (2), S. 109-119. DOI: 10.1016/s1368-7646(98)80026-5.
- Handford, C. L., Stang, C. T., Raivio, T. L., & Dennis, J. J. (2009): The contribution of small cryptic plasmids to the antibiotic resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. In: *Can J Microbiol* 55 (11), S. 1229-1239. DOI: 10.1139/w09-079.
- Harmer, C. J., Moran, R. A., & Hall, R. M. (2014): Movement of IS26-associated antibiotic resistance genes occurs via a translocatable unit that includes a single IS26 and preferentially inserts adjacent to another IS26. In: *MBio* 5 (5), S. e01801-01814. DOI: 10.1128/mBio.01801-14.
- Hawkey, J., Cottingham, H., Tokolyi, A., Wick, R. R., Judd, L. M., Cerdeira, L., de Oliveira Garcia, D., Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2022a): Linear plasmids in *Klebsiella* and other *Enterobacteriaceae*. In: *Microb Genom* 8 (4). DOI: 10.1099/mgen.0.000807.
- Hawkey, J., Wyres, K. L., Judd, L. M., Harshegyi, T., Blakeway, L., Wick, R. R., Jenney, A. W. J., & Holt, K. E. (2022b): ESBL plasmids in *Klebsiella pneumoniae*: diversity, transmission and contribution to infection burden in the hospital setting. In: *Genome Med* 14 (1), S. 97. DOI: 10.1186/s13073-022-01103-0.
- Hawkey, P. M. (2015): Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. In: *Journal of Hospital Infection* 89 (4), S. 241-247. DOI: 10.1016/j.jhin.2015.01.008.
- Hayes, F. (2003): Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. In: *Science* 301 (5639), S. 1496-1499. DOI: 10.1126/science.1088157.
- Hayes, F., & Barilla, D. (2006): The bacterial segrosome: a dynamic nucleoprotein machine for DNA trafficking and segregation. In: *Nat Rev Microbiol* 4 (2), S. 133-143. DOI: 10.1038/nrmicro1342.
- He, S., Hickman, A. B., Varani, A. M., Siguier, P., Chandler, M., Dekker, J. P., & Dyda, F. (2015): Insertion sequence IS26 reorganizes plasmids in clinically isolated multidrug-resistant bacteria by replicative transposition. In: *MBio* 6 (3), S. e00762. DOI: 10.1128/mBio.00762-15.
- Hehemann, J. H., Correc, G., Barbeyron, T., Helbert, W., Czjzek, M., & Michel, G. (2010): Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. In: *Nature* 464 (7290), S. 908-912. DOI: 10.1038/nature08937.
- Helinski, D. R. (2022): A brief history of plasmids. In: *EcoSal Plus* 10 (1). eESP00282021. DOI: 10.1128/ecosalplus.esp-0028-2021.
- Hembach, N., Bierbaum, G., Schreiber, C., & Schwartz, T. (2022): Facultative pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes in swine livestock manure and clinical wastewater: A molecular biology comparison. In: *Environ Pollut* 313, S. 120128. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.120128.
- Herman, K. M., Hall, A. J., & Gould, L. H. (2015): Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012. In: *Epidemiol Infect* 143 (14), S. 3011-3021. DOI: 10.1017/S0950268815000047.

- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2019): Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. In: *Nat Microbiol* 4 (9), S. 1432-1442. DOI: 10.1038/s41564-019-0503-9.
- Heuer, H., Binh, C. T., Jechalke, S., Kopmann, C., Zimmerling, U., Krogerrecklenfort, E., Ledger, T., Gonzalez, B., Top, E., & Smalla, K. (2012): IncP-1 $\epsilon$  plasmids are important vectors of antibiotic resistance genes in agricultural systems: Diversification driven by class 1 integron gene cassettes. In: *Front Microbiol* 3, S. 2. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00002.
- Heuer, H., Krogerrecklenfort, E., Wellington, E. M., Egan, S., van Elsas, J. D., van Overbeek, L., Collard, J. M., Guillaume, G., Karagouni, A. D., Nikolakopoulou, T. L., & Smalla, K. (2002): Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. In: *FEMS Microbiol Ecol* 42 (2), S. 289-302. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb01019.x.
- Heuer, H., Schmitt, H., & Smalla, K. (2011): Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. In: *Current Opinion in Microbiology* 14 (3), S. 236-243. DOI: 10.1016/j.mib.2011.04.009.
- Heuer, H., & Smalla, K. (2007): Horizontal gene transfer between bacteria. In: *Environ Biosafety Res* 6 (1-2), S. 3-13. DOI: 10.1051/ebr:2007034.
- Heuer, H., & Smalla, K. (2012): Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. In: *FEMS Microbiol Rev* 36 (6), S. 1083-1104. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00337.x.
- Heuer, T., Krems, C., Moon, K., Brombach, C., & Hoffmann, I. (2015): Food consumption of adults in Germany: results of the German National Nutrition Survey II based on diet history interviews. In: *Br J Nutr* 113 (10), S. 1603-1614. DOI: 10.1017/S0007114515000744.
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J., & Piddock, L. J. (2016): Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. In: *Lancet* 387 (10014), S. 176-187. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0.
- Holvoet, K., Sampers, I., Callens, B., Dewulf, J., & Uyttendaele, M. (2013): Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. In: *Appl Environ Microbiol* 79 (21), S. 6677-6683. DOI: 10.1128/AEM.01995-13.
- Hölzel, C. S., Tetens, J. L., & Schwaiger, K. (2018): Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: A need for quantitative risk assessment. In: *Foodborne Pathog Dis* 15 (11), S. 671-688. DOI: 10.1089/fpd.2018.2501.
- Hu, Y., Yang, X., Qin, J., Lu, N., Cheng, G., Wu, N., Pan, Y., Li, J., Zhu, L., Wang, X., Meng, Z., Zhao, F., Liu, D., Ma, J., Qin, N., Xiang, C., Xiao, Y., Li, L., Yang, H., Wang, J., Yang, R., Gao, G. F., Wang, J., & Zhu, B. (2013): Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. In: *Nat Commun* 4, S. 2151. DOI: 10.1038/ncomms3151.
- Huddleston, J. R. (2014): Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. In: *Infect Drug Resist* 7, S. 167-176. DOI: 10.2147/IDR.S48820.
- Hughes, V. M., & Datta, N. (1983): Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. In: *Nature* 302 (5910), S. 725-726. DOI: 10.1038/302725a0.
- Huisman, J. S., Benz, F., Duxbury, S. J. N., de Visser, J., Hall, A. R., Fischer, E. A. J., & Bonhoeffer, S. (2022): Estimating plasmid conjugation rates: A new computational tool and a critical comparison of methods. In: *Plasmid* 121, S. 102627. DOI: 10.1016/j.plasmid.2022.102627.
- Huizinga, P., Schrauwen, E., Garcia-Cobos, S., Willemsen, I., Verhulst, C., Friedrich, A. W., Savelkoul, P. H. M., Rossen, J. W., & Kluytmans, J. (2018): Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) isolated from bean sprouts in the Netherlands. In: *PLoS One* 13 (8), S. e0203338. DOI: 10.1371/journal.pone.0203338.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019): Antibiotics: past, present and future. In: *Current Opinion in Microbiology* 51, S. 72-80. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- Iseppi, R., de Niederhausern, S., Bondi, M., Messi, P., & Sabia, C. (2018): Extended-spectrum beta-lactamase, AmpC, and MBL-producing Gram-negative bacteria on fresh vegetables and ready-to-eat salads sold in local markets. In: *Microb Drug Resist* 24 (8), S. 1156-1164. DOI: 10.1089/mdr.2017.0198.

- Jang, M. J., Kim, S. Y., Ricke, S. C., Rhee, M. S., & Kim, S. A. (2021): Microbial ecology of alfalfa, radish, and rapeseed sprouts based on culture methods and 16S rRNA microbiome sequencing. In: *Food Res Int* 144, S. 110316. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110316.
- Jayachandran, S., Lleras-Muney, A., & Smith, K. V. (2010): Modern medicine and the twentieth century decline in mortality: Evidence on the impact of sulfa drugs. In: *American Economic Journal: Applied Economics* 2 (2), S. 118-146.
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., & Smalla, K. (2014): Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. In: *Trends Microbiol* 22 (9), S. 536-545. DOI: 10.1016/j.tim.2014.05.005.
- Jenkins, C., Rentenaar, R. J., Landraud, L., & Brisse, S. (2017): *Enterobacteriaceae*. In: *Infectious Diseases* (Bd. 2-Volume Set, S. 1565-1578.e1562). DOI: 10.1016/b978-0-7020-6285-8.00180-5.
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021): Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. In: *J Antimicrob Chemother* 76 (1), S. 101-109. DOI: 10.1093/jac/dkaa390.
- Johnsborg, O., Eldholm, V., & Havarstein, L. S. (2007): Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. In: *Research in Microbiology* 158 (10), S. 767-778. DOI: 10.1016/j.resmic.2007.09.004.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019): Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. In: *Nat Commun* 10 (1), S. 5029. DOI: 10.1038/s41467-019-13036-1.
- Johnson, T. J., & Nolan, L. K. (2009): Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 73 (4), S. 750-774. DOI: 10.1128/MMBR.00015-09.
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., Johnson, S. J., Logue, C. M., White, D. G., Doetkott, C., & Nolan, L. K. (2007): Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. In: *Appl Environ Microbiol* 73 (6), S. 1976-1983. DOI: 10.1128/AEM.02171-06.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J. P. (2014): Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. In: *Nat Rev Microbiol* 12 (3), S. 181-196. DOI: 10.1038/nrmicro3199.
- Jones-Dias, D., Manageiro, V., Ferreira, E., Barreiro, P., Vieira, L., Moura, I. B., & Canica, M. (2016): Architecture of Class 1, 2, and 3 integrons from Gram negative bacteria recovered among fruits and vegetables. In: *Front Microbiol* 7, S. 1400. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01400.
- Jongman, M., & Korsten, L. (2016): Genetic diversity and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates from different leafy green production systems. In: *J Food Prot* 79 (11), S. 1846-1853. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-16-117.
- Jung, Y., Jang, H., & Matthews, K. R. (2014): Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. In: *Microb Biotechnol* 7 (6), S. 517-527. DOI: 10.1111/1751-7915.12178.
- Jung, Y., & Matthews, K. R. (2016): Potential transfer of extended spectrum beta-lactamase encoding gene, bla<sub>shv18</sub> gene, between *Klebsiella pneumoniae* in raw foods. In: *Food Microbiol* 60, S. 39-48. DOI: 10.1016/j.fm.2016.06.002.
- Kaesbohrer, A., Bakran-Lebl, K., Irrgang, A., Fischer, J., Kampf, P., Schiffmann, A., Werckenthin, C., Busch, M., Kreienbrock, L., & Hille, K. (2019): Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing *E. coli* in food in Germany. In: *Vet Microbiol* 233, S. 52-60. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.03.025.
- Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R. K., Viridi, J. S., & Gulati, P. (2018): Integrons in *Enterobacteriaceae*: diversity, distribution and epidemiology. In: *Int J Antimicrob Agents* 51 (2), S. 167-176. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004.
- Kawasaki, H., Takao, M., Koiso, A., & Tonomura, K. (1985): Genetic rearrangement of plasmids: *In vivo* recombination between a dehalogenation plasmid and multiple-resistance plasmid RP4 in *Pseudomonas* sp. In: *Appl Environ Microbiol* 49 (6), S. 1544-1546. DOI: 10.1128/aem.49.6.1544-1546.1985.

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. In: *Bioinformatics* 28 (12), S. 1647-1649. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199.
- Kelly, B. G., Vespermann, A., & Bolton, D. J. (2009): The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. In: *Food Chem Toxicol* 47 (5), S. 951-968. DOI: 10.1016/j.fct.2008.02.006.
- Keshri, J., Krouptiski, Y., Abu-Fani, L., Achmon, Y., Bauer, T. S., Zarka, O., Maler, I., Pinto, R., & Sela Saldinger, S. (2019): Dynamics of bacterial communities in alfalfa and mung bean sprouts during refrigerated conditions. In: *Food Microbiol* 84, S. 103261. DOI: 10.1016/j.fm.2019.103261.
- Khojah, H. M. J. (2022): Over-the-counter sale of antibiotics during COVID-19 outbreak by community pharmacies in Saudi Arabia: a simulated client study. In: *Bmc Health Services Research* 22 (1), S. 123. DOI: 10.1186/s12913-022-07553-x.
- Kim, H. S., Chon, J. W., Kim, Y. J., Kim, D. H., Kim, M. S., & Seo, K. H. (2015): Prevalence and characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. In: *Int J Food Microbiol* 207, S. 83-86. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.049.
- Kim, S. A., Kim, O. M., & Rhee, M. S. (2013): Changes in microbial contamination levels and prevalence of foodborne pathogens in alfalfa (*Medicago sativa*) and rapeseed (*Brassica napus*) during sprout production in manufacturing plants. In: *Letters in Applied Microbiology* 56 (1), S. 30-36. DOI: 10.1111/lam.12009.
- Knapp, C. W., Dolfing, J., Ehlert, P. A., & Graham, D. W. (2010): Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. In: *Environ Sci Technol* 44 (2), S. 580-587. DOI: 10.1021/es901221x.
- Kono, N., & Arakawa, K. (2019): Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics. In: *Dev Growth Differ* 61 (5), S. 316-326. DOI: 10.1111/dgd.12608.
- Koukkidis, G., Haigh, R., Allcock, N., Jordan, S., & Freestone, P. (2017): Salad leaf juices enhance *Salmonella* growth, colonization of fresh produce, and virulence. In: *Appl Environ Microbiol* 83 (1). DOI: 10.1128/AEM.02416-16.
- Krogus-Kurikka, L., Lyra, A., Malinen, E., Aarnikunnas, J., Tuimala, J., Paulin, L., Makivuokko, H., Kajander, K., & Palva, A. (2009): Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers. In: *BMC Gastroenterol* 9, S. 95. DOI: 10.1186/1471-230X-9-95.
- Krych, L., Castro-Mejia, J. L., Forero-Junco, L. M., Moesby, D. N., Mikkelsen, M. B., Rasmussen, M. A., Sykulski, M., & Nielsen, D. S. (2019): DNA enrichment and tagmentation method for species-level identification and strain-level differentiation using ON-rep-seq. In: *Commun Biol* 2, S. 369. DOI: 10.1038/s42003-019-0617-x.
- Kuske, C. R., Barns, S. M., Grow, C. C., Merrill, L., & Dunbar, J. (2006): Environmental survey for four pathogenic bacteria and closely related species using phylogenetic and functional genes. In: *J Forensic Sci* 51 (3), S. 548-558. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2006.00131.x.
- Lamberte, L. E., & van Schaik, W. (2022): Antibiotic resistance in the commensal human gut microbiota. In: *Current Opinion in Microbiology* 68, S. 102150. DOI: 10.1016/j.mib.2022.102150.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012): Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. In: *Nat Methods* 9 (4), S. 357-359. DOI: 10.1038/nmeth.1923.
- Larranaga, O., Brown-Jaque, M., Quiros, P., Gomez-Gomez, C., Blanch, A. R., Rodriguez-Rubio, L., & Muniesa, M. (2018): Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. In: *Environ Int* 115, S. 133-141. DOI: 10.1016/j.envint.2018.03.019.
- Larsson, S., Svensson, M., & Ternhag, A. (2022): Production loss and sick leave caused by antibiotic resistance: a register-based cohort study. In: *BMC Public Health* 22 (1), S. 527. DOI: 10.1186/s12889-022-12947-x.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., & Rosler, U. (2014): Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. In: *Vet Microbiol* 172 (3-4), S. 519-527. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.06.008.

- Lawley, T., Wilkins, B. M., & Frost, L. S. (2004): Bacterial conjugation in gram-negative bacteria. In: *Plasmid biology*, S. 203-226.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G. L., Gould, I. M., Goossens, H., Greko, C., So, A. D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A. Q., Qamar, F. N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z. A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G. D., Brown, E. D., & Cars, O. (2013): Antibiotic resistance-the need for global solutions. In: *Lancet Infect Dis* 13 (12), S. 1057-1098. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
- Le-Minh, N., Khan, S. J., Drewes, J. E., & Stuetz, R. M. (2010): Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. In: *Water Res* 44 (15), S. 4295-4323. DOI: 10.1016/j.watres.2010.06.020.
- Lederberg, J. (1952): Cell genetics and hereditary symbiosis. In: *Physiol Rev* 32 (4), S. 403-430. DOI: 10.1152/physrev.1952.32.4.403.
- Lederberg, J., & Tatum, E. L. (1946): Gene recombination in *Escherichia coli*. In: *Nature* 158 (4016), S. 558. DOI: 10.1038/158558a0.
- Leff, J. W., & Fierer, N. (2013): Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. In: *PLoS One* 8 (3), S. e59310. DOI: 10.1371/journal.pone.0059310.
- Leon-Sampedro, R., DelaFuente, J., Diaz-Agero, C., Crellen, T., Musicha, P., Rodriguez-Beltran, J., de la Vega, C., Hernandez-Garcia, M., Group, R. G. W. S., Lopez-Fresnena, N., Ruiz-Garbajosa, P., Canton, R., Cooper, B. S., & San Millan, A. (2021): Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. In: *Nat Microbiol* 6 (5), S. 606-616. DOI: 10.1038/s41564-021-00879-y.
- Lerner, A., Matthias, T., & Aminov, R. (2017): Potential effects of horizontal gene exchange in the human gut. In: *Front Immunol* 8, S. 1630. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01630.
- Lester, C. H., Frimodt-Moller, N., Sorensen, T. L., Monnet, D. L., & Hammerum, A. M. (2006): *In vivo* transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. In: *Antimicrob Agents Chemother* 50 (2), S. 596-599. DOI: 10.1128/AAC.50.2.596-599.2006.
- Levy, S. B. (1982): Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem. In: *Lancet* 2 (8289), S. 83-88. DOI: 10.1016/s0140-6736(82)91701-9.
- Levy, S. B. (1998): The challenge of antibiotic resistance. In: *Scientific American* 278 (3), S. 46-53. <http://www.jstor.org/stable/26057703>.
- Li, Q., Chang, W., Zhang, H., Hu, D., & Wang, X. (2019): The role of plasmids in the multiple antibiotic resistance transfer in ESBLs-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater treatment plants. In: *Front Microbiol* 10, S. 633. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00633.
- Li, W., Bai, X., Sheng, H., Chen, J., Wang, Z., Wang, T., Sun, R., Feng, Z., Wang, Y., Peng, K., Chen, S., Li, R., & Yang, B. (2022): Conjugative transfer of *mcr-1*-bearing plasmid from *Salmonella* to *Escherichia coli* *in vitro* on chicken meat and in mouse gut. In: *Food Res Int* 157, S. 111263. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111263.
- Li, W., O'Neill, K. R., Haft, D. H., DiCuccio, M., Chetvernin, V., Badretdin, A., Coulouris, G., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Durkin, A. S., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Lanczycki, C. J., Song, J. S., Thanki, N., Wang, J., Yamashita, R. A., Yang, M., Zheng, C., Marchler-Bauer, A., & Thibaud-Nissen, F. (2021): RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation. In: *Nucleic Acids Res* 49 (D1), S. D1020-D1028. DOI: 10.1093/nar/gkaa1105.
- Little, S. F., & Ivins, B. E. (1999): Molecular pathogenesis of *Bacillus anthracis* infection. In: *Microbes Infect* 1 (2), S. 131-139. DOI: 10.1016/s1286-4579(99)80004-5.
- Liu, R. H. (2013): Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. In: *Adv Nutr* 4 (3), S. 384S-392S. DOI: 10.3945/an.112.003517.
- Liu, S., & Kilonzo-Nthenge, A. (2017): Prevalence of multidrug-resistant bacteria from U.S.-grown and imported fresh produce retailed in chain supermarkets and ethnic stores of Davidson County, Tennessee. In: *J Food Prot* 80 (3), S. 506-514. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-16-178.
- Liu, Y. Y., He, D. D., Zhang, M. K., Pan, Y. S., Wu, H., Yuan, L., Liu, J. H., & Hu, G. Z. (2021): The formation of two hybrid plasmids mediated by IS26 and Tn6952 in *Salmonella enterica* Serotype *Enteritidis*. In: *Front Microbiol* 12, S. 676574. DOI: 10.3389/fmicb.2021.676574.



- Loman, N. J., & Pallen, M. J. (2015): Twenty years of bacterial genome sequencing. In: *Nat Rev Microbiol* 13 (12), S. 787-794. DOI: 10.1038/nrmicro3565.
- Loop, J. (2019): Charakterisierung von ESBL-produzierenden *Klebsiella* spp. aus Sprossen [Masterarbeit, unveröffentlicht].
- Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1994): Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. In: *Microbiol Rev* 58 (3), S. 563-602. DOI: 10.1128/mr.58.3.563-602.1994.
- Luo, T. L., Corey, B. W., Snesrud, E., Iovleva, A., McElheny, C. L., Preston, L. N., Kwak, Y. I., Bennett, J. W., Doi, Y., McGann, P. T., & Lebreton, F. (2022): IS26-mediated plasmid reshuffling results in convergence of toxin-antitoxin systems but loss of resistance genes in XDR *Klebsiella pneumoniae* from a chronic infection. In: *Microb Genom* 8 (9). DOI: 10.1099/mgen.0.000892.
- Luo, X., & Matthews, K. R. (2023): The conjugative transfer of plasmid-mediated mobile colistin resistance gene, *mcr-1*, to *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* O104:H4 in nutrient broth and in mung bean sprouts. In: *Food Microbiol* 111, S. 104188. DOI: 10.1016/j.fm.2022.104188.
- Lyimo, B., Buza, J., Subbiah, M., Temba, S., Kipasika, H., Smith, W., & Call, D. R. (2016): IncF plasmids are commonly carried by antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water sources in northern Tanzania. In: *Int J Microbiol* 2016, S. 3103672. DOI: 10.1155/2016/3103672.
- Lynch, M. F., Tauxe, R. V., & Hedberg, C. W. (2009): The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. In: *Epidemiol Infect* 137 (3), S. 307-315. DOI: 10.1017/S0950268808001969.
- Madsen, J. S., Burmølle, M., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2012): The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. In: *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 65 (2), S. 183-195. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x.
- Mahon, B. E., Ponka, A., Hall, W. N., Komatsu, K., Dietrich, S. E., Siitonen, A., Cage, G., Hayes, P. S., Lambert-Fair, M. A., Bean, N. H., Griffin, P. M., & Slutsker, L. (1997): An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. In: *J Infect Dis* 175 (4), S. 876-882. DOI: 10.1086/513985.
- Manageiro, V., Jones-Dias, D., Ferreira, E., & Canica, M. (2020): Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1*) in *Escherichia coli* from non-imported fresh vegetables for human consumption in Portugal. In: *Microorganisms* 8 (3). DOI: 10.3390/microorganisms8030429.
- Marathe, N. P., Svanevik, C. S., Ghavidel, F. Z., & Grevskott, D. H. (2021): First report of mobile tigecycline resistance gene *tet(X4)*-harbouring multidrug-resistant *Escherichia coli* from wastewater in Norway. In: *J Glob Antimicrob Resist* 27, S. 37-40. DOI: 10.1016/j.jgar.2021.07.019.
- Margot, H., Ebner, R., Peterhans, S., & Stephan, R. (2016): Occurrence of *Salmonella*, *L. monocytogenes*, Shigatoxin-producing *E. coli* and ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in sprout samples collected from the Swiss market. In: *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 11 (2), S. 155-157. DOI: 10.1007/s00003-015-1003-3.
- Martak, D., Guther, J., Verschuuren, T. D., Valot, B., Conzelmann, N., Bunk, S., Riccio, M. E., Salamanca, E., Meunier, A., Henriot, C. P., Brossier, C. P., Bertrand, X., Cooper, B. S., Harbarth, S., Tacconelli, E., Fluit, A. C., Rodriguez-Bano, J., Kluytmans, J., Peter, S., Hocquet, D., & group, M. W. s. (2022): Populations of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are different in human-polluted environment and food items: a multicentre European study. In: *Clin Microbiol Infect* 28 (3), S. 447.e7-447.e14. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.07.022.
- Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martinez-Solano, L., & Sanchez, M. B. (2009): A global view of antibiotic resistance. In: *FEMS Microbiol Rev* 33 (1), S. 44-65. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x.
- Martins, W., Nicolas, M. F., Yu, Y., Li, M., Dantas, P., Sands, K., Portal, E., Almeida, L. G. P., Vasconcelos, A. T. R., Medeiros, E. A., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Gales, A. C., & Andrey, D. O. (2020): Clinical and molecular description of a high-copy IncQ1 KPC-2 plasmid harbored by the international ST15 *Klebsiella pneumoniae* clone. In: *mSphere* 5 (5). DOI: 10.1128/mSphere.00756-20.
- Matos, A., Garland, J. L., & Fett, W. F. (2002): Composition and physiological profiling of sprout-associated microbial communities. In: *J Food Prot* 65 (12), S. 1903-1908. DOI: 10.4315/0362-028x-65.12.1903.

- Matson, S. W., & Ragonese, H. (2005): The F-plasmid Tral protein contains three functional domains required for conjugative DNA strand transfer. In: *J Bacteriol* 187 (2), S. 697-706. DOI: 10.1128/JB.187.2.697-706.2005.
- Matsuo, Y., Komiya, S., Yasumizu, Y., Yasuoka, Y., Mizushima, K., Takagi, T., Kryukov, K., Fukuda, A., Morimoto, Y., Naito, Y., Okada, H., Bono, H., Nakagawa, S., & Hirota, K. (2021): Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION nanopore sequencing confers species-level resolution. In: *Bmc Microbiology* 21 (1), S. 35. DOI: 10.1186/s12866-021-02094-5.
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018): Antimicrobial resistance: a One Health perspective. In: *Microbiol Spectr* 6 (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.
- McKinnon, J., Roy Chowdhury, P., & Djordjevic, S. P. (2018): Genomic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST58 causing urosepsis. In: *Int J Antimicrob Agents* 52 (3), S. 430-435. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.06.017.
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Goker, M. (2013): Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. In: *BMC Bioinformatics* 14, S. 60. DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.
- Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., & Goker, M. (2022): TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. In: *Nucleic Acids Res* 50 (D1), S. D801-D807. DOI: 10.1093/nar/gkab902.
- Molbak, L., Licht, T. R., Kvist, T., Kroer, N., & Andersen, S. R. (2003): Plasmid transfer from *Pseudomonas putida* to the indigenous bacteria on alfalfa sprouts: characterization, direct quantification, and *in situ* location of transconjugant cells. In: *Appl Environ Microbiol* 69 (9), S. 5536-5542. DOI: 10.1128/AEM.69.9.5536-5542.2003.
- Morikawa, K., Takemura, A. J., Inose, Y., Tsai, M., Nguyen Thi le, T., Ohta, T., & Msadek, T. (2012): Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. In: *PLoS Pathog* 8 (11), S. e1003003. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003003.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016): Mechanisms of antibiotic resistance. In: *Microbiol Spectr* 4 (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Muurinen, J., Richert, J., Wickware, C. L., Richert, B., & Johnson, T. A. (2021): Swine growth promotion with antibiotics or alternatives can increase antibiotic resistance gene mobility potential. In: *Sci Rep* 11 (1), S. 5485. DOI: 10.1038/s41598-021-84759-9.
- NACMCF (1999): Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. In: *Int J Food Microbiol* 52 (3), S. 123-153. DOI: 10.1016/s0168-1605(99)00135-x.
- Nagraj, G. S., Jaiswal, S., Harper, N., & Jaiswal, A. K. (2020): Carrot. In: *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables*, S. 323-337.
- NARMS (2019). Antibiotics tested by NARMS Hrsg. Centers for Disease Control and Prevention. Online verfügbar unter <https://www.cdc.gov/narms/antibiotics-tested.html#print>, zuletzt geprüft am 13.06.2023.
- Naziri, Z., Poormaleknia, M., & Ghaedi Oliyaei, A. (2022): Risk of sharing resistant bacteria and/or resistance elements between dogs and their owners. In: *BMC Vet Res* 18 (1), S. 203. DOI: 10.1186/s12917-022-03298-1.
- Neron, B., Littner, E., Haudiquet, M., Perrin, A., Cury, J., & Rocha, E. P. C. (2022): IntegronFinder 2.0: Identification and analysis of integrons across bacteria, with a focus on antibiotic resistance in *Klebsiella*. In: *Microorganisms* 10 (4). DOI: 10.3390/microorganisms10040700.
- Netherwood, T., Bowden, R., Harrison, P., O'Donnell, A. G., Parker, D. S., & Gilbert, H. J. (1999): Gene transfer in the gastrointestinal tract. In: *Appl Environ Microbiol* 65 (11), S. 5139-5141. DOI: 10.1128/AEM.65.11.5139-5141.1999.
- Neuwirth, E., & Neuwirth, M. E. (2014): Package 'RColorBrewer'. In: *ColorBrewer Palettes*, S.
- Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001): Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. In: *Mol Cell Probes* 15 (4), S. 209-215. DOI: 10.1006/mcpr.2001.0363.

- Nicolas, E., Lambin, M., Dandoy, D., Galloy, C., Nguyen, N., Oger, C. A., & Hallet, B. (2015): The Tn3-family of replicative transposons. In: *Microbiol Spectr* 3 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0060-2014.
- Njage, P. M., & Buys, E. M. (2015): Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC beta-lactamases determinants to isolates from lettuce. In: *Microb Biotechnol* 8 (3), S. 462-473. DOI: 10.1111/1751-7915.12234.
- Nordstrom, K. (2006): Plasmid R1—replication and its control. In: *Plasmid* 55 (1), S. 1-26. DOI: 10.1016/j.plasmid.2005.07.002.
- Norman, A., Hansen, L. H., & Sorensen, S. J. (2009): Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364 (1527), S. 2275-2289. DOI: 10.1098/rstb.2009.0037.
- Novais, A., Canton, R., Moreira, R., Peixe, L., Baquero, F., & Coque, T. M. (2007): Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. In: *Antimicrob Agents Chemother* 51 (2), S. 796-799. DOI: 10.1128/AAC.01070-06.
- Novick, R. P. (1987): Plasmid incompatibility. In: *Microbiol Rev* 51 (4), S. 381-395. DOI: 10.1128/mr.51.4.381-395.1987.
- Novick, R. P., Clowes, R. C., Cohen, S. N., Curtiss, R., 3rd, Datta, N., & Falkow, S. (1976): Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. In: *Bacteriological Reviews* 40 (1), S. 168-189. DOI: 10.1128/br.40.1.168-189.1976.
- Nuesch-Inderbilen, M., Zurfluh, K., Peterhans, S., Hachler, H., & Stephan, R. (2015): Assessment of the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in ready-to-eat salads, fresh-cut fruit, and sprouts from the Swiss Market. In: *J Food Prot* 78 (6), S. 1178-1181. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-018.
- O'Brien, T. F. (2002): Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: How use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. In: *Clinical Infectious Diseases* 34 (Supplement\_3), S. S78-S84. DOI: 10.1086/340244.
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006): The gut flora as a forgotten organ. In: *EMBO Rep* 7 (7), S. 688-693. DOI: 10.1038/sj.embor.7400731.
- O'Neill, J. (2016): Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. In: S. Oberitter, H., Schäbenthal, K., von Ruesten, A., & Boeing, H. (2013): The DGE Nutrition Circle – presentation and basis of the food-related recommendations from the German Nutrition Society (DGE). In: *Ernaehrungs Umschau international* 60 (2), S. 24-29.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000): Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. In: *Nature* 405 (6784), S. 299-304. DOI: 10.1038/35012500.
- Ojha, A. K., Shah, N. P., & Mishra, V. (2022): Characterization and transferability of *erm* and *tet* antibiotic resistance genes in *Lactobacillus* spp. isolated from traditional fermented milk. In: *Curr Microbiol* 79 (11), S. 339. DOI: 10.1007/s00284-022-02980-9.
- Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2012): Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. In: *Food Microbiol* 32 (1), S. 1-19. DOI: 10.1016/j.fm.2012.04.016.
- Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., Overbeek, J. C., Parrello, B., Parrello, V., Porter, J. S., Pusch, G. D., Shukla, M., Singh, I., Stewart, L., Tan, G., Thomas, C., VanOeffelen, M., Vonstein, V., Wallace, Z. S., Warren, A. S., Wattam, A. R., Xia, F., Yoo, H., Zhang, Y., Zmasek, C. M., Scheuermann, R. H., & Stevens, R. L. (2023): Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. In: *Nucleic Acids Res* 51 (D1), S. D678-D689. DOI: 10.1093/nar/gkac1003.
- Omer, M. K., Alvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Skjerve, E., Asehun, T., & Alvseike, O. A. (2018): A systematic review of bacterial foodborne outbreaks related to red meat and meat products. In: *Foodborne Pathog Dis* 15 (10), S. 598-611. DOI: 10.1089/fpd.2017.2393.
- Orlek, A., Phan, H., Sheppard, A. E., Doumith, M., Ellington, M., Peto, T., Crook, D., Walker, A. S., Woodford, N., Anjum, M. F., & Stoesser, N. (2017a): Ordering the mob: Insights into replicon and

- MOB typing schemes from analysis of a curated dataset of publicly available plasmids. In: *Plasmid* 91, S. 42-52. DOI: 10.1016/j.plasmid.2017.03.002.
- Orlek, A., Stoesser, N., Anjum, M. F., Doumith, M., Ellington, M. J., Peto, T., Crook, D., Woodford, N., Walker, A. S., Phan, H., & Sheppard, A. E. (2017b): Plasmid classification in an era of Whole-Genome sequencing: Application in studies of antibiotic resistance epidemiology. In: *Front Microbiol* 8, S. 182. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00182.
- Pallares-Vega, R., Macedo, G., Brouwer, M. S. M., Hernandez Leal, L., van der Maas, P., van Loosdrecht, M. C. M., Weissbrodt, D. G., Heederik, D., Mevius, D., & Schmitt, H. (2021): Temperature and nutrient limitations decrease transfer of conjugative IncP-1 plasmid pKJK5 to wild *Escherichia coli* strains. In: *Front Microbiol* 12, S. 656250. DOI: 10.3389/fmicb.2021.656250.
- Pallen, M. J., & Wren, B. W. (2007): Bacterial pathogenomics. In: *Nature* 449 (7164), S. 835-842. DOI: 10.1038/nature06248.
- Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004): Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. In: *Clin Infect Dis* 38 (6), S. 864-870. DOI: 10.1086/381972.
- Partridge, S. R. (2011): Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. In: *FEMS Microbiol Rev* 35 (5), S. 820-855. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x.
- Partridge, S. R. (2015): Resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. In: *Pathology* 47 (3), S. 276-284. DOI: 10.1097/PAT.0000000000000237.
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018): Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. In: *Clin Microbiol Rev* 31 (4). DOI: 10.1128/CMR.00088-17.
- Paterson, D. L., & Harris, P. N. (2016): Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. In: *Lancet Infect Dis* 16 (2), S. 132-133. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00463-6.
- Pavlovic, M., Huber, I., Skala, H., Konrad, R., Schmidt, H., Sing, A., & Busch, U. (2010): Development of a multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* strains. In: *Foodborne Pathog Dis* 7 (7), S. 801-808. DOI: 10.1089/fpd.2009.0457.
- Pearce, D. A., Bazin, M. J., & Lynch, J. M. (2000): Substrate concentration and plasmid transfer frequency between bacteria in a model rhizosphere. In: *Microb Ecol* 40 (1), S. 57-63. DOI: 10.1007/s00248000043.
- Peirano, G., Laupland, K. B., Gregson, D. B., & Pitout, J. D. (2011): Colonization of returning travelers with CTX-M-producing *Escherichia coli*. In: *J Travel Med* 18 (5), S. 299-303. DOI: 10.1111/j.1708-8305.2011.00548.x.
- Perron, G. G., Whyte, L., Turnbaugh, P. J., Goordial, J., Hanage, W. P., Dantas, G., & Desai, M. M. (2015): Functional characterization of bacteria isolated from ancient arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics. In: *PLoS One* 10 (3), S. e0069533. DOI: 10.1371/journal.pone.0069533.
- Peseky, M. W., Tilley, R., & Beck, D. A. C. (2019): Mosaic plasmids are abundant and unevenly distributed across prokaryotic taxa. In: *Plasmid* 102, S. 10-18. DOI: 10.1016/j.plasmid.2019.02.003.
- Pilla, G., & Tang, C. M. (2018): Going around in circles: virulence plasmids in enteric pathogens. In: *Nat Rev Microbiol* 16 (8), S. 484-495. DOI: 10.1038/s41579-018-0031-2.
- Pinilla-Redondo, R., Cyriaque, V., Jacquioid, S., Sorensen, S. J., & Riber, L. (2018): Monitoring plasmid-mediated horizontal gene transfer in microbiomes: recent advances and future perspectives. In: *Plasmid* 99, S. 56-67. DOI: 10.1016/j.plasmid.2018.08.002.
- Plaza-Rodriguez, C., Alt, K., Grobbel, M., Hammerl, J. A., Irrgang, A., Szabo, I., Stingl, K., Schuh, E., Wiehle, L., Pfefferkorn, B., Naumann, S., Kaesbohrer, A., & Tenhagen, B. A. (2020): Wildlife as sentinels of antimicrobial resistance in Germany? In: *Front Vet Sci* 7, S. 627821. DOI: 10.3389/fvets.2020.627821.
- Pletz, M. W., Wollny, A., Dobermann, U. H., Rodel, J., Neubauer, S., Stein, C., Brandt, C., Hartung, A., Mellmann, A., Trommer, S., Edel, B., Patchev, V., Makarewicz, O., & Maschmann, J. (2018): A nosocomial foodborne outbreak of a VIM carbapenemase-expressing *Citrobacter freundii*. In: *Clin Infect Dis* 67 (1), S. 58-64. DOI: 10.1093/cid/ciy034.

- Polianciuc, S. I., Gurzau, A. E., Kiss, B., Stefan, M. G., & Loghin, F. (2020): Antibiotics in the environment: causes and consequences. In: *Med Pharm Rep* 93 (3), S. 231-240. DOI: 10.15386/mpr-1742.
- Popa, O., Landan, G., & Dagan, T. (2017): Phylogenomic networks reveal limited phylogenetic range of lateral gene transfer by transduction. In: *ISME J* 11 (2), S. 543-554. DOI: 10.1038/ismej.2016.116.
- Porse, A., Schonning, K., Munck, C., & Sommer, M. O. (2016): Survival and evolution of a large multidrug resistance plasmid in new clinical bacterial hosts. In: *Mol Biol Evol* 33 (11), S. 2860-2873. DOI: 10.1093/molbev/msw163.
- Posada-Izquierdo, G. D., Perez-Rodriguez, F., Lopez-Galvez, F., Allende, A., Selma, M. V., Gil, M. I., & Zurera, G. (2013): Modelling growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions: chlorine washing and modified atmosphere packaging. In: *Food Microbiol* 33 (2), S. 131-138. DOI: 10.1016/j.fm.2012.08.010.
- Prado, V., Hernandez-Tejero, M., Mucke, M. M., Marco, F., Gu, W., Amoros, A., Toapanta, D., Reverter, E., Pena-Ramirez, C., Altenpeter, L., Bassegoda, O., Mezzano, G., Aziz, F., Juanola, A., Rodriguez-Tajes, S., Chamorro, V., Lopez, D., Reyes, M., Hogardt, M., Kempf, V. A. J., Ferstl, P. G., Zeuzem, S., Martinez, J. A., Vila, J., Arroyo, V., Trebicka, J., & Fernandez, J. (2022): Rectal colonization by resistant bacteria increases the risk of infection by the colonizing strain in critically ill patients with cirrhosis. In: *J Hepatol* 76 (5), S. 1079-1089. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.12.042.
- Procopio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L., & Araujo, J. M. (2012): Antibiotics produced by *Streptomyces*. In: *Braz J Infect Dis* 16 (5), S. 466-471. DOI: 10.1016/j.bjid.2012.08.014.
- Rafai, C., Frank, T., Manirakiza, A., Gaudeuille, A., Mbecko, J. R., Nghario, L., Serdouma, E., Tekpa, B., Garin, B., & Breurec, S. (2015): Dissemination of IncF-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates from surgical-site infections in Bangui, Central African Republic. In: *Bmc Microbiology* 15 (1), S. 15. DOI: 10.1186/s12866-015-0348-1.
- Ragaert, P., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2007): Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. In: *Postharvest biology and technology* 44 (3), S. 185-194.
- Ragaert, P., Verbeke, W., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2004): Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. In: *Food quality and preference* 15 (3), S. 259-270.
- Rahman, M., Alam, M. U., Luies, S. K., Kamal, A., Ferdous, S., Lin, A., Sharior, F., Khan, R., Rahman, Z., Parvez, S. M., Amin, N., Hasan, R., Tadesse, B. T., Taneja, N., Islam, M. A., & Ercumen, A. (2021): Contamination of fresh produce with antibiotic-resistant bacteria and associated risks to human health: A scoping review. In: *Int J Environ Res Public Health* 19 (1). DOI: 10.3390/ijerph19010360.
- Ramirez, M. S., Traglia, G. M., Lin, D. L., Tran, T., & Tolmasky, M. E. (2014): Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in Gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* paradigm. In: *Microbiol Spectr* 2 (5). DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0016-2013.
- Randall, L. P., Lodge, M. P., Elviss, N. C., Lemma, F. L., Hopkins, K. L., Teale, C. J., & Woodford, N. (2017): Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. In: *Int J Food Microbiol* 241, S. 283-290. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.036.
- Raposo, A., Pérez, E., de Faria, C. T., Ferrús, M. A., & Carrascosa, C. (2016): Food spoilage by *Pseudomonas* spp.—An overview. In: *Foodborne pathogens and antibiotic resistance*, S. 41-71.
- Ravin, N. V. (2011): N15: the linear phage-plasmid. In: *Plasmid* 65 (2), S. 102-109. DOI: 10.1016/j.plasmid.2010.12.004.
- Ravishankar, S., Zhu, L., & Jaroni, D. (2010): Assessing the cross contamination and transfer rates of *Salmonella enterica* from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. In: *Food Microbiol* 27 (6), S. 791-794. DOI: 10.1016/j.fm.2010.04.011.
- Reid, C. J., Blau, K., Jechalke, S., Smalla, K., & Djordjevic, S. P. (2019): Whole genome sequencing of *Escherichia coli* from store-bought produce. In: *Front Microbiol* 10, S. 3050. DOI: 10.3389/fmicb.2019.03050.
- Reid, C. J., Roy Chowdhury, P., & Djordjevic, S. P. (2015): Tn6026 and Tn6029 are found in complex resistance regions mobilised by diverse plasmids and chromosomal islands in multiple antibiotic resistant *Enterobacteriaceae*. In: *Plasmid* 80, S. 127-137. DOI: 10.1016/j.plasmid.2015.04.005.

- Reuland, E. A., Al Naiemi, N., Raadsen, S. A., Savelkoul, P. H., Kluytmans, J. A., & Vandenbroucke-Grauls, C. M. (2014): Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in raw vegetables. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33 (10), S. 1843-1846. DOI: 10.1007/s10096-014-2142-7.
- Richter, L., Du Plessis, E. M., Duvenage, S., & Korsten, L. (2019): Occurrence, identification, and antimicrobial resistance profiles of extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from fresh vegetables retailed in Gauteng Province, South Africa. In: *Foodborne Pathog Dis* 16 (6), S. 421-427. DOI: 10.1089/fpd.2018.2558.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019): What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. In: *Microorganisms* 7 (1). DOI: 10.3390/microorganisms7010014.
- Robertson, J., Bessonov, K., Schonfeld, J., & Nash, J. H. E. (2020): Universal whole-sequence-based plasmid typing and its utility to prediction of host range and epidemiological surveillance. In: *Microb Genom* 6 (10). DOI: 10.1099/mgen.0.000435.
- Robertson, J., & Nash, J. H. E. (2018): MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. In: *Microb Genom* 4 (8), S. DOI: 10.1099/mgen.0.000206.
- Rodriguez-Perez, H., Ciuffreda, L., & Flores, C. (2021): NanoCLUST: a species-level analysis of 16S rRNA nanopore sequencing data. In: *Bioinformatics* 37 (11), S. 1600-1601. DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa900.
- Ronquillo, M. G., & Hernandez, J. C. A. (2017): Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. In: *Food control* 72, S. 255-267. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.03.001.
- Rosberg, A. K., Darlison, J., Mogren, L., & Alsanius, B. W. (2021): Commercial wash of leafy vegetables do not significantly decrease bacterial load but leads to shifts in bacterial species composition. In: *Food Microbiol* 94, S. 103667. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103667.
- Rossi, F., Rizzotti, L., Felis, G. E., & Torriani, S. (2014): Horizontal gene transfer among microorganisms in food: current knowledge and future perspectives. In: *Food Microbiol* 42, S. 232-243. DOI: 10.1016/j.fm.2014.04.004.
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018): Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. In: *J Antimicrob Chemother* 73 (5), S. 1121-1137. DOI: 10.1093/jac/dkx488.
- Ruiz-Roldan, L., Rojo-Bezares, B., Lozano, C., Lopez, M., Chichon, G., Torres, C., & Saenz, Y. (2021): Occurrence of *Pseudomonas* spp. in raw vegetables: molecular and phenotypical analysis of their antimicrobial resistance and virulence-related traits. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (23). DOI: 10.3390/ijms222312626.
- Ruppé, E., Armand-Lefèvre, L., Estellat, C., El-Mniai, A., Boussadia, Y., Consigny, P., Girard, P., Vittecoq, D., Bouchaud, O., & Pialoux, G. (2014): Acquisition of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013. In: *Eurosurveillance* 19 (14), S. 20768. DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.14.20768.
- Rybachin, V. N., & Svarchevsky, A. N. (1999): The plasmid prophage N15: a linear DNA with covalently closed ends. In: *Mol Microbiol* 33 (5), S. 895-903. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01533.x.
- Sahin, S., Mogulkoc, M. N., & Kurekci, C. (2022): Disinfectant and heavy metal resistance profiles in extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolates from chicken meat samples. In: *Int J Food Microbiol* 377, S. 109831. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109831.
- Salmond, G. P., & Welch, M. (2008): Antibiotic resistance: adaptive evolution. In: *The Lancet* 372, S. S97-S103.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006): A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. In: *Chemosphere* 65 (5), S. 725-759. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
- Schadt, E. E., Turner, S., & Kasarskis, A. (2010): A window into third-generation sequencing. In: *Hum Mol Genet* 19 (R2), S. R227-R240. DOI: 10.1093/hmg/ddq416.
- Schröder, G., & Lanka, E. (2005): The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. In: *Plasmid* 54 (1), S. 1-25. DOI: 10.1016/j.plasmid.2005.02.001.

- Schwaiger, K., Helmke, K., Holzel, C. S., & Bauer, J. (2011): Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). In: *Int J Food Microbiol* 148 (3), S. 191-196. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.001.
- Scotland, S. M., Smith, H. R., Willshaw, G. A., & Rowe, B. (1983): Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. In: *Lancet* 2 (8343), S. 216. DOI: 10.1016/s0140-6736(83)90192-7.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., & Finlay, B. B. (2010): Gut microbiota in health and disease. In: *Physiol Rev* 90 (3), S. 859-904. DOI: 10.1152/physrev.00045.2009.
- Self, J. L., Conrad, A., Stroika, S., Jackson, A., Whitlock, L., Jackson, K. A., Beal, J., Wellman, A., Fatica, M. K., Bidol, S., Huth, P. P., Hamel, M., Franklin, K., Tschetter, L., Kopko, C., Kirsch, P., Wise, M. E., & Basler, C. (2019): Multistate outbreak of listeriosis associated with packaged leafy green salads, United States and Canada, 2015-2016. In: *Emerg Infect Dis* 25 (8), S. 1461-1468. DOI: 10.3201/eid2508.180761.
- Shan, X., Yang, M., Wang, N., Schwarz, S., Li, D., & Du, X.-D. (2022): Plasmid fusion and recombination events that occurred during conjugation of *poxtA*-carrying plasmids in Enterococci. In: *Microbiology Spectrum* 10 (1), S. e01505-01521. DOI: doi:10.1128/spectrum.01505-21.
- Sharapov, U. M., Wendel, A. M., Davis, J. P., Keene, W. E., Farrar, J., Sodha, S., Hyytia-Trees, E., Leeper, M., Gerner-Smidt, P., Griffin, P. M., Braden, C., & Outbreak Investigation, T. (2016): Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach: United States, 2006. In: *J Food Prot* 79 (12), S. 2024-2030. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-556.
- Sharma, V. K., Dean-Nystrom, E. A., & Casey, T. A. (1999): Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli*. In: *Mol Cell Probes* 13 (4), S. 291-302. DOI: 10.1006/mcpr.1999.0251.
- Sheinman, M., Arkhipova, K., Arndt, P. F., Dutilh, B. E., Hermsen, R., & Massip, F. (2021): Identical sequences found in distant genomes reveal frequent horizontal transfer across the bacterial domain. In: *Elife* 10. DOI: 10.7554/eLife.62719.
- Sheppard, A. E., Stoesser, N., Wilson, D. J., Sebra, R., Kasarskis, A., Anson, L. W., Giess, A., Pankhurst, L. J., Vaughan, A., Grim, C. J., Cox, H. L., Yeh, A. J., Modernising Medical Microbiology Informatics, G., Sifri, C. D., Walker, A. S., Peto, T. E., Crook, D. W., & Mathers, A. J. (2016): Nested Russian Doll-like genetic mobility drives rapid dissemination of the carbapenem resistance gene *blaKPC*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 60 (6), S. 3767-3778. DOI: 10.1128/AAC.00464-16.
- Sheppard, R. J., Beddis, A. E., & Barraclough, T. G. (2020): The role of hosts, plasmids and environment in determining plasmid transfer rates: A meta-analysis. In: *Plasmid* 108, S. 102489. DOI: 10.1016/j.plasmid.2020.102489.
- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015): Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. In: *Front Microbiol* 6, S. 242. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00242.
- Siddiqui, M. W., Chakraborty, I., Ayala-Zavala, J. F., & Dhua, R. S. (2011): Advances in minimal processing of fruits and vegetables: a review. In: *Journal of Scientific & Industrial Research* 70 (10), S. 823-834.
- Siguier, P., Gournayre, E., & Chandler, M. (2014): Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. In: *FEMS Microbiol Rev* 38 (5), S. 865-891. DOI: 10.1111/1574-6976.12067.
- Silver, S., & Misra, T. K. (1988): Plasmid-mediated heavy metal resistances. In: *Annu Rev Microbiol* 42, S. 717-743. DOI: 10.1146/annurev.mi.42.100188.003441.
- Singh, S., Verma, N., & Taneja, N. (2019): The human gut resistome: Current concepts & future prospects. In: *Indian J Med Res* 150 (4), S. 345-358. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_1979\_17.
- Skockova, A., Karpiskova, R., Kolackova, I., & Cupakova, S. (2013): Characteristics of *Escherichia coli* from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. In: *Int J Food Microbiol* 167 (2), S. 196-201. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.011.
- Smalla, K., Heuer, H., Gotz, A., Niemeyer, D., Krogerrecklenfort, E., & Tietze, E. (2000): Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. In: *Appl Environ Microbiol* 66 (11), S. 4854-4862. DOI: 10.1128/AEM.66.11.4854-4862.2000.

- Smalla, K., Jechalke, S., & Top, E. M. (2015): Plasmid detection, characterization, and ecology. In: *Microbiol Spectr* 3 (1). PLAS-0038-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014.
- Smalla, K., Kabisch, J., Fiedler, G., Hammerl, J. A., & Tenhagen, B. A. (2023): [Health risks from crop irrigation with treated wastewater containing antibiotic residues, resistance genes, and resistant microorganisms]. In: *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, S. DOI: 10.1007/s00103-023-03710-7 (Gesundheitsrisiken durch die Bewässerung von Nutzpflanzen mit aufbereitetem Abwasser, das Antibiotikarückstände, Resistenzgene und resistente Mikroorganismen enthält.).
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010): Mobility of plasmids. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 74 (3), S. 434-452. DOI: 10.1128/MMBR.00020-10.
- Soderqvist, K., Ahmed Osman, O., Wolff, C., Bertilsson, S., Vagsholm, I., & Boqvist, S. (2017): Emerging microbiota during cold storage and temperature abuse of ready-to-eat salad. In: *Infect Ecol Epidemiol* 7 (1), S. 1328963. DOI: 10.1080/20008686.2017.1328963.
- Sorensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. (2005): Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. In: *Nat Rev Microbiol* 3 (9), S. 700-710. DOI: 10.1038/nrmicro1232.
- Spagnolo, F., Trujillo, M., & Dennehy, J. J. (2021): Why do antibiotics exist? In: *MBio* 12 (6), S. e0196621. DOI: 10.1128/mBio.01966-21.
- Spoor, L. E., McAdam, P. R., Weinert, L. A., Rambaut, A., Hasman, H., Aarestrup, F. M., Kearns, A. M., Larsen, A. R., Skov, R. L., & Fitzgerald, J. R. (2013): Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *MBio* 4 (4). DOI: 10.1128/mBio.00356-13.
- Stein, M., Brinks, E., Rathje, J., Cho, G. S., & Franz, C. M. A. P. (2020): Complete genome sequence of tetracycline-resistant *Serratia liquefaciens* S1, isolated from mixed greens, obtained using Illumina MiSeq and Oxford Nanopore MinION sequencing. In: *Microbiol Resour Announc* 9 (19). DOI: 10.1128/MRA.00156-20.
- Stokes, H. W., & Gillings, M. R. (2011): Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. In: *FEMS Microbiol Rev* 35 (5), S. 790-819. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x.
- Stoll, D. A., Stark, N. C., Becker, B., Kulling, S. E., & Huch, M. (2018): Antibiotic susceptibility of *Enterobacteriaceae*, isolated from sprouts, mixed salads and ready-to-eat salads in Germany. In: *Arch. Lebensm. Hyg.* 69 (2), S. 49-56.
- Stothard, P., & Wishart, D. S. (2005): Circular genome visualization and exploration using CGView. In: *Bioinformatics* 21 (4), S. 537-539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti054.
- Suarez, A., Guttler, A., Stratz, M., Staendner, L. H., Timmis, K. N., & Guzman, C. A. (1997): Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. In: *Gene* 196 (1-2), S. 69-74. DOI: 10.1016/s0378-1119(97)00197-2.
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011): Easyfig: a genome comparison visualizer. In: *Bioinformatics* 27 (7), S. 1009-1010. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr039.
- Sun, L., Xu, J., & He, F. (2019): Genomic characterisation of a *Proteus mirabilis* clinical isolate from China carrying *bla*<sub>NDM-5</sub> on an IncX3 plasmid. In: *J Glob Antimicrob Resist* 19, S. 317-319. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.10.025.
- Suzuki, H., Yano, H., Brown, C. J., & Top, E. M. (2010): Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. In: *J Bacteriol* 192 (22), S. 6045-6055. DOI: 10.1128/JB.00277-10.
- Taormina, P. J., Beuchat, L. R., Erickson, M. C., Ma, L., Zhang, G., & Doyle, M. P. (2009): Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 to iceberg lettuce via simulated field coring. In: *J Food Prot* 72 (3), S. 465-472. DOI: 10.4315/0362-028x-72.3.465.
- Taormina, P. J., Beuchat, L. R., & Slutsker, L. (1999): Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. In: *Emerg Infect Dis* 5 (5), S. 626-634. DOI: 10.3201/eid0505.990503.
- Tarlak, F., Johannessen, G., Bascón Villegas, I., Bolívar, A., Posada-Izquierdo, G. D., & Pérez-Rodríguez, F. (2020): Modelling of the behaviour of *Salmonella enterica* serovar reading on commercial fresh-cut iceberg lettuce stored at different temperatures. In: *Foods* 9 (7), S. 946.
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005): Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. In: *Nat Rev Microbiol* 3 (9), S. 711-721. DOI: 10.1038/nrmicro1234.



- Thomas, C. M., & Summers, D. (2008): Bacterial Plasmids. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000468.pub2.
- Toomey, N., Monaghan, A., Fanning, S., & Bolton, D. (2009): Transfer of antibiotic resistance marker genes between lactic acid bacteria in model rumen and plant environments. In: *Appl Environ Microbiol* 75 (10), S. 3146-3152. DOI: 10.1128/AEM.02471-08.
- Tournas, V. H. (2005): Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. In: *Crit Rev Microbiol* 31 (1), S. 33-44. DOI: 10.1080/10408410590886024.
- Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., & Rozhon, W. (2013): Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. In: *Mob Genet Elements* 3 (5), S. e26219. DOI: 10.4161/mge.26219.
- USDA (2018). Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Legacy. Hrsg. US Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. Online verfügbar unter [https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/,](https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/) zuletzt geprüft am 19.06.2023.
- Valenza, G., Nickel, S., Pfeifer, Y., Pietsch, M., Voigtlander, E., Lehner-Reindl, V., & Holler, C. (2017): Prevalence and genetic diversity of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in nursing homes in Bavaria, Germany. In: *Vet Microbiol* 200, S. 138-141. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.10.008.
- van Hoek, A. H., Veenman, C., van Overbeek, W. M., Lynch, G., de Roda Husman, A. M., & Blaak, H. (2015): Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. In: *Int J Food Microbiol* 204, S. 1-8. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014.
- Vaser, R., Sovic, I., Nagarajan, N., & Sikic, M. (2017): Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. In: *Genome Res* 27 (5), S. 737-746. DOI: 10.1101/gr.214270.116.
- Velazquez-Meza, M. E., Galarde-Lopez, M., Carrillo-Quiroz, B., & Alpuche-Aranda, C. M. (2022): Antimicrobial resistance: One Health approach. In: *Vet World* 15 (3), S. 743-749. DOI: 10.14202/vetworld.2022.743-749.
- Ventola, C. L. (2015): The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. In: *P T* 40 (4), S. 277-283. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>.
- Vestrheim, D. F., Lange, H., Nygard, K., Borgen, K., Wester, A. L., Kvarme, M. L., & Vold, L. (2016): Are ready-to-eat salads ready to eat? An outbreak of *Salmonella* Coeln linked to imported, mixed, pre-washed and bagged salad, Norway, November 2013. In: *Epidemiol Infect* 144 (8), S. 1756-1760. DOI: 10.1017/S0950268815002769.
- Vetting, M. W., Park, C. H., Hegde, S. S., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., & Blanchard, J. S. (2008): Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. In: *Biochemistry* 47 (37), S. 9825-9835. DOI: 10.1021/bi800664x.
- Villa, L., Garcia-Fernandez, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010): Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. In: *J Antimicrob Chemother* 65 (12), S. 2518-2529. DOI: 10.1093/jac/dkq347.
- Violle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020): Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: From the cellular to the community level. In: *Genes (Basel)* 11 (11). DOI: 10.3390/genes11111239.
- von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H., & Wolffs, P. F. (2016): Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. In: *Front Microbiol* 7, S. 173. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00173.
- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K., & Earl, A. M. (2014): Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. In: *PLoS One* 9 (11), S. e112963. DOI: 10.1371/journal.pone.0112963.
- Walsh, C., Duffy, G., Nally, P., O'Mahony, R., McDowell, D. A., & Fanning, S. (2008): Transfer of ampicillin resistance from *Salmonella* Typhimurium DT104 to *Escherichia coli* K12 in food. In: *Letters in Applied Microbiology* 46 (2), S. 210-215. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02288.x.

- Wand, M. E., Baker, K. S., Benthall, G., McGregor, H., McCowen, J. W., Deheer-Graham, A., & Sutton, J. M. (2015): Characterization of pre-antibiotic era *Klebsiella pneumoniae* isolates with respect to antibiotic/disinfectant susceptibility and virulence in *Galleria mellonella*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 59 (7), S. 3966-3972. DOI: 10.1128/AAC.05009-14.
- Wang, J., Stephan, R., Karczmarczyk, M., Yan, Q., Hachler, H., & Fanning, S. (2013): Molecular characterization of *bla*<sub>ESBL</sub>-harboring conjugative plasmids identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans. In: *Front Microbiol* 4, S. 188. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00188.
- Wang, Y., Batra, A., Schulenburg, H., & Dagan, T. (2022): Gene sharing among plasmids and chromosomes reveals barriers for antibiotic resistance gene transfer. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 377 (1842), S. 20200467. DOI: 10.1098/rstb.2020.0467.
- Wein, T., Hulter, N. F., Mizrahi, I., & Dagan, T. (2019): Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance. In: *Nat Commun* 10 (1), S. 2595. DOI: 10.1038/s41467-019-10600-7.
- Wein, T., Wang, Y., Barz, M., Stucker, F. T., Hammerschmidt, K., & Dagan, T. (2021): Essential gene acquisition destabilizes plasmid inheritance. In: *PLoS Genet* 17 (7), S. e1009656. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009656.
- Wein, T., Wang, Y., Hulter, N. F., Hammerschmidt, K., & Dagan, T. (2020): Antibiotics interfere with the evolution of plasmid stability. In: *Current Biology* 30 (19), S. 3841-3847.e4. DOI: 10.1016/j.cub.2020.07.019.
- Weiner-Lastinger, L. M., Abner, S., Edwards, J. R., Kallen, A. J., Karlsson, M., Magill, S. S., Pollock, D., See, I., Soe, M. M., Walters, M. S., & Dudeck, M. A. (2020): Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. In: *Infect Control Hosp Epidemiol* 41 (1), S. 1-18. DOI: 10.1017/ice.2019.296.
- WHO (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Hrsg. World Health Organization. Online verfügbar unter <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>, zuletzt geprüft am 22.08.2023.
- WHO (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. Hrsg. World Health Organization. Online verfügbar unter <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>, zuletzt geprüft am 20.08.2023.
- Wibberg, D., Szczepanowski, R., Eikmeyer, F., Puhler, A., & Schluter, A. (2013): The IncF plasmid pRSB225 isolated from a municipal wastewater treatment plant's on-site preflooder combining antibiotic resistance and putative virulence functions is highly related to virulence plasmids identified in pathogenic *E. coli* isolates. In: *Plasmid* 69 (2), S. 127-137. DOI: 10.1016/j.plasmid.2012.11.001.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017a): Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. In: *Microb Genom* 3 (10), S. e000132. DOI: 10.1099/mgen.0.000132.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017b): Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. In: *PLoS Comput Biol* 13 (6), S. e1005595. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- Wickham, H. (2016): ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Hrsg. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4. <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wiedenbeck, J., & Cohan, F. M. (2011): Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. In: *FEMS Microbiol Rev* 35 (5), S. 957-976. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x.
- Wolters, B., Kyselkova, M., Krogerrecklenfort, E., Kreuzig, R., & Smalla, K. (2014): Transferable antibiotic resistance plasmids from biogas plant digestates often belong to the IncP-1 $\epsilon$  subgroup. In: *Front Microbiol* 5, S. 765. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00765.
- Wong, J. J., Lu, J., & Glover, J. N. (2012): Relaxosome function and conjugation regulation in F-like plasmids - a structural biology perspective. In: *Mol Microbiol* 85 (4), S. 602-617. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08131.x.

- Woodford, N., & Ellington, M. J. (2007): The emergence of antibiotic resistance by mutation. In: *Clin Microbiol Infect* 13 (1), S. 5-18. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x.
- Wright, G. D. (2010): Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? In: *BMC Biol* 8, S. 123. DOI: 10.1186/1741-7007-8-123.
- Wyres, K. L., Hawkey, J., Hetland, M. A. K., Fostervold, A., Wick, R. R., Judd, L. M., Hamidian, M., Howden, B. P., Lohr, I. H., & Holt, K. E. (2019): Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. In: *J Antimicrob Chemother* 74 (3), S. 577-581. DOI: 10.1093/jac/dky492.
- Xie, M., Li, R., Liu, Z., Chan, E. W. C., & Chen, S. (2018): Recombination of plasmids in a carbapenem-resistant NDM-5-producing clinical *Escherichia coli* isolate. In: *J Antimicrob Chemother* 73 (5), S. 1230-1234. DOI: 10.1093/jac/dkx540.
- Yao, Y., Maddamsetti, R., Weiss, A., Ha, Y., Wang, T., Wang, S., & You, L. (2022): Intra- and interpopulation transposition of mobile genetic elements driven by antibiotic selection. In: *Nat Ecol Evol* 6 (5), S. 555-564. DOI: 10.1038/s41559-022-01705-2.
- Yau, S., Liu, X., Djordjevic, S. P., & Hall, R. M. (2010): RSF1010-like plasmids in Australian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and origin of their *sul2-strA-strB* antibiotic resistance gene cluster. In: *Microb Drug Resist* 16 (4), S. 249-252. DOI: 10.1089/mdr.2010.0033.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012): Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. In: *BMC Bioinformatics* 13, S. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.
- Young Kim, S., Ban, G. H., Won Hong, Y., Ji Jang, M., & Ae Kim, S. (2022): Microbiome shifts in sprouts (alfalfa, radish, and rapeseed) during production from seed to sprout using 16S rRNA microbiome sequencing. In: *Food Res Int* 152, S. 110896. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110896.
- Zankari, E., Allesoe, R., Joensen, K. G., Cavaco, L. M., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2017): PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. In: *J Antimicrob Chemother* 72 (10), S. 2764-2768. DOI: 10.1093/jac/dkx217.
- Zhao, W., Li, W., Du, X. D., & Yao, H. (2022): Hybrid IncFIA/FIB/FIC(FII) plasmid co-carrying *bla*<sub>NDM-5</sub> and *fosA3* from an *Escherichia coli* ST117 strain of retail chicken. In: *Int J Food Microbiol* 382, S. 109914. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109914.
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., & Wishart, D. S. (2011): PHAST: a fast phage search tool. In: *Nucleic Acids Res* 39 (Web Server issue), S. W347-W352. DOI: 10.1093/nar/gkr485.
- Zinder, N. D., & Lederberg, J. (1952): Genetic exchange in *Salmonella*. In: *J Bacteriol* 64 (5), S. 679-699. DOI: 10.1128/jb.64.5.679-699.1952.
- Zurfluh, K., Nuesch-Inderbinen, M., Morach, M., Zihler Berner, A., Hachler, H., & Stephan, R. (2015): Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. In: *Appl Environ Microbiol* 81 (9), S. 3115-3120. DOI: 10.1128/AEM.00258-15.

## Anhang

Tabelle 45: Modelle und Hersteller der verwendeten Geräte.

Gerät	Modell / Typ	Hersteller
Agarose Gelelektrophorese Power Supply	EV231	Cleaver Scientific Ltd., Warwickshire, UK
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer + Zubehör	Mini-Sub <sup>®</sup> Cell GT; Sub Cell <sup>®</sup> GT; Wide Mini-Sub <sup>®</sup>	BioRad, Hercules, USA
Autoclav und Petrischalenabfüller	Mediaclave und Tecnomat	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Brutschrank	B12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Dispenser für Antibiotika-Testblättchen	ST6090 / ST8090	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
Erlenmeyerkolben	100 ml, 500 ml	DKW Like Sciences GmbH und Duran Produktions GmbH & Co. KG, Mainz
Experion™	Electrophoresis station	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Fluorometer	Qubit 3.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fokussiertes Ultraschallgerät	M220	Covaris, Woburn, USA
Fotodokumentation	BioDoc Analyze	Biometra GmbH, Göttingen
Glasflasche	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott AG, Mainz
Heizschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Kolbenheizschüttler	3032	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Magnetständer	96	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetständer	PCR Strip MagStand	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg
Messzylinder	20 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Mikroplattenlesegerät	Spark	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Mikrowelle	Privileg 8019	Quelle GmbH, Salzburg, Österreich
Minizentrifuge	Sprout mit Strip Rotor	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Multimode-Mikroplattenlesegerät	Synergy LX	BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
Netzteil	Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
PCR-Cycler	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
PCR-Power Supply	Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Pinzetten	Verschiedene Größen	Unterschiedliche Hersteller
Pipettensatz	0,1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-Jet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Proben-Homogenisator	Stomacher	Interscience, Saint Nom la Bretèche, Frankreich
Proben-Homogenisator	Stomacher	Seward, West Sussex, UK

Gerät	Modell / Typ	Hersteller
Reagenzgläser	15 ml	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Reagenzgläser	15 ml	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Reinstwasseranlage	PURELAB flex	ELGA LabWater, High Wycombe, UK
Rotor	JA10-Rotor	Beckman Coulter, Maryfort, O'Callaghansmills, Irland
Scheren	Verschiedene Größen	Unterschiedliche Hersteller
Schüttelinkubator	Thermomixer C	Eppendorf AG, Hamburg
Sequenziergerät	MiSeq NextSeq 550	Illumina Inc., San Diego, USA
Sequenziergerät	MinION MK1B	Oxford Nanopore Technologies Ltd., Oxford, UK
Sicherheitswerkbank	Claire pro B-2-160; Claire pro B-2- 190; B-[MaxPro] <sup>2</sup> -130	BERNER International GmbH, Elmshorn
Spektrometer	NanoDrop 2000c	Peqlab GmbH, VWR, Darmstadt
TapeStation	4150	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Thermal Cycler	CFR96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Thermomixer	Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tiefkühlschrank	Premium NoFrost (-20 °C)	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Überkopfmischer	Intelli-Mixer RM-2M	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Vortex	Vortex 2 genie	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Vortex	MS3 B (Agilent)	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau
Waage	Entris 2202-1S; BCE 224I-1S	Sartorius AG, Göttingen
Waage	OL 3100-P	Omnilab, Bremen
Zell-Disruptor	Disruptor Genie	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Zentrifuge	5424; 5430R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Multifuge 1 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge	Avanti J-26 XPI	Beckman Coulter, Krefeld

Tabelle 46: Verbrauchsmaterialien.

Material	Modell / Typ	Hersteller
Abdeckfolie	96 well Microseal® 'C' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Antibiotika-Testblättchen	Kartuschen à 50 Stück für Stempelanwendung (Entsprechend den CLSI-, DIN-, BSAC-, EUCAST- und SFM- Richtlinien)	Oxoid Ltd., Hampshire, UK
Covaris-Probenröhrchen	microTUBE AFA Fiber Screw Cap	Covaris, Woburn, USA
Drigalski-Spatel	Plattierungsspatel	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim
Einmalspritze	20 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tullingen
Filter-Pipettenspitzen	0,1 - 10 µl, 1 - 20 µl, 200 µl, 100 - 1250 µl	Nerbe plus GmbH
Flowcell (Durchflusszelle)	R9.4.1; R10.4; R10.4.1	Oxford Nanopore Technologies Ltd., Oxford, UK

<b>Material</b>	<b>Modell / Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Handschuhe	Labsolute	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Impfeschlinge	1 µl, 10 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Cryokonservierung	ROTI®Store-Cryoröhrchen, 2 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Loading Tips	10x112	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Magnetperlen	AMPure XP Beads	New England Biolabs, Massachusetts, USA
Magnetperlen	Mag-Bind® TotalPure NGS	Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, USA
Membranfilter	MF-Millipore Membrane Filter, 0.45 µm pore size	Merck KGaA, Darmstadt
Mikroplatten	96 well, PS, F-Boden, schwarz, non-binding	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Mikrotiterplatten	Nunc 96-Well microplates, flacher Boden	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NextSeq 500/550 Mid Output Kit	v2.5; Flowcell und Kartusche	Illumina Inc., San Diego, USA
Optical Tube und Optical Cap	8x Strips	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
PCR-Platte	96 well	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml)	PCR SoftTubes; PCR SingleCap 8er-SoftStrips; 96 Well 8-TubeStrip Platte	Biozym scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Petrischalen	94 x 16 mm, 145 x 20 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	0,1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Qubit-Assay-Röhrchen		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Reagent Kit V2	Flowcell und Kartusche	Illumina Inc., San Diego, USA
Reaktionsgefäß	Safe-Lock Centrifuge Tubes: 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Schraubröhre	15 ml, 50 ml	VWR International, Radnor, USA
ScreenTape und Reagenz	D1000, D5000, Genomic DNA	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Spritzenfilter	Rotilabo-Spitzenfilter, PVDF, 0,22 µm; CA, 0,2 µm; CA, 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Stomacherbeutel	Steril, seitlicher Filter	Interscience, Saint Nom la Bretèche, Frankreich
Tupfer		Applied SA, Châtel-Saint-Denis, Schweiz
Well-Platten	Hard-Shell 96-well PCR Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., München

Tabelle 47: Verwendete Kits.

<b>Kit</b>	<b>Modell / Typ</b>	<b>Hersteller</b>
DNA-Prep Kit		Illumina Inc., San Diego, USA
Experion DNA 12K Analysis Kit		Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Fluorometer Reagenzien	Qubit dsDNA HS Assay Kit, Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Genomic Micro AX Bacteria Gravity		A&A Biotechnology, Gdynia, Polen
Ligation sequencing	Kit V14	Oxford Nanopore Technologies Ltd., Oxford, UK
Ligationskit	SQK-LSK 109; SQK-NBD112.96	Oxford Nanopore Technologies Ltd., Oxford, UK
Native Barcoding Expansion Kit	EXP-NBD 103; EXP-NBD 114	Oxford Nanopore Technologies Ltd., Oxford, UK
NucleoSpin®	Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren
NucleoSpin® Microbial DNA	Mini kit for DNA from microorganisms	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren
PeqGold Bacterial DNA Kit		VWR International, Radnor, USA
Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit		Zymo Research, Irvine, USA
Reagent Kit	V2	Illumina Inc., San Diego, USA
TrueSeq Nano DNA LT Library Prep Kit		Illumina Inc., San Diego, USA

Tabelle 48: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
10 x PCR-Puffer E mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> mit MgCl <sub>2</sub>	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Agar-Agar, bakteriologisch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose Basic	AppliChem GmbH, Darmstadt
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol [99 %]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
GelRed Nucleic Acid Stain 10000x in DMSO	Biotium Inc., Hayward, USA
Gene Ruler DNA Ladder Mix low range	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Glycerin [98 %]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
iQ Multiplex Powermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Isopropanol	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc., München
Nukleasefreies Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nukleasefreies Wasser (Ambion)	Life Technologies Corporation, Austin, USA
Nukleasefreies Wasser (HyClone HyPure Water)	Cytiva, Logan, USA
Primer / Sonden (HPLC grade) [100 nmol/ml]	Microsynth Seqlab GmbH, Göttingen
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Massachusetts, United States
Q5® Reaktionspuffer [5x]	New England Biolabs, Massachusetts, United States
RNase	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Taq DNA-Polymerase [5 U/µl]	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm

Tabelle 49: Accession Number der Sequenzen von Enterobakterien-Stämmen und ihren Plasmiden in der NCBI-Datenbank.

<b>Stamm</b>	<b>Accession-Nummer bei NCBI</b>	<b>Plasmid</b>	<b>Accession-Nummer bei NCBI</b>
Cigi1	CP115035	pCIGI1_1	CP115036
		pCIGI1_2	CP115037
		pCIGI1_3	CP115038
Cipo4	CP126611	pCIPO4_1	CP126612
		pCIPO4_2	CP126613
Ciw5.1	CP126605	pCIW5.1_1	CP126606
		pCIW5.1_2	CP126607
Ciw5.2	CP115032	pCIW5.2_1	CP115033
		pCIW5.2_2	CP115034
Cipa6.1	CP115031		
Cipa6.2	CP115030		
Cif11	CP126623	pCIF11_1	CP126624
Cipo13	CP115024	pCIPO13_1	CP115025
		pCIPO13_2	CP115026
		pCIPO13_3	CP115027
		pCIPO13_4	CP115028
		pCIPO13_5	CP115029
Endy1	CP126604		
Endy2	CP126610		
Enh11	CP126608	pENH11_1	CP126609
Enb12	CP115601	pENB12_1	CP115602
Ec1115	CP126614	pEC1115_1	CP126615
		pEC1115_2	CP126616
		pEC1115_3	CP126617
		pEC1115_4	CP126618
Ec1117	CP126602	pEC1117_1	CP126603
Ec1119	CP126600	pEC1119_1	CP126601
Ec1120	CP126598	pEC1120_1	CP126599
Kgr1	CP126593	pKGR1_1	CP126594
		pKGR1_2	CP126595
		pKGR1_3	CP126596
		pKGR1_4	CP126597
Kva3	CP126619		
Kpneu4	CP115021	pKPNEU4_1	CP115022
		pKPNEU4_2	CP115023
Kpneu8	CP126622	pKPNEU8_1	CP126620
		pKPNEU8_2	CP126621



## Danksagung

Aus gutem Grund hat die Erforschung antibiotikaresistenter Bakterien in unserer Gesellschaft einen hohen Stellenwert. Alleine schon deshalb bin ich Herrn Prof. Dr. Charles M. A. P. Franz für das Thema meiner Doktorarbeit dankbar. Desweiteren hatte ich in ihm einen engagierten Betreuer, dessen Tür mir immer für einen fachlichen Austausch offen stand. Professor Franz hat mir oft durch hilfreiche Ratschläge, mit seiner großen Expertise und seiner Kreativität geholfen. Sein Vertrauen in meine Arbeit hat mich stets motiviert. Nicht zuletzt waren sein Interesse und Spaß an der Wissenschaft einfach ansteckend!

Ich bedanke mich herzlich bei allen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern des MBT für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Im Besonderen danke ich Dr. Gyu-Sung Cho für die fachliche Betreuung, die Unterstützung bei der Versuchsplanung, für das Finden von Lösungen und natürlich die „Motivase“. Weiterhin danke ich Dr. Diana Habermann und Dr. Martin Klemp für die Übernahme der Projektleitung des S2-Versuchs, für die Unterstützung bei der Planung der Versuche und das Vertrauen in mich bei deren Durchführung. Dr. Gregor Fiedler gilt mein Dank für die fachlichen Diskussionen und Anregungen hinsichtlich meiner Arbeit. Dank an Dr. Erik Brinks für die Sequenzier-Expertise und die Hilfe bei der Umsetzung meiner Sequenziervorhaben.

Ebenso danke ich Jessica, Katja, Benni, Adrian und Yvonne für die exzellente technische Unterstützung in den vergangenen Jahren. Der freundliche Umgang und die guten Gespräche bleiben mir in guter Erinnerung.

Dank auch an die (ehemaligen) Doktorandinnen und Doktoranden Jannike, Steffi, Sofia, Lu, Maghna, Pina, Erik, Gregor, Tobias, Tim, Peter, Christoph, Katharina, Jule, Peter, Flo und Vera für den wertvollen Austausch in Bezug auf die Doktorandenzeit und darüber hinaus.

Meine Kolleginnen und Kollegen am MBT behalte ich in guter Erinnerung. Weiterhin bedanke ich mich bei allen, die mich während meiner Zeit am Max Rubner-Institut unterstützt und begleitet haben. Ob ein kurzer Schnack auf dem Flur, oder gemeinsame Mittagspausen – diese Zeit war wertvoll. Danke an die gute Fee des Sekretariats Bozena.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie, auf die ich mich verlassen kann, die stets hinter mir steht und die mir viel Kraft gibt.

Danke auch an meinen Partner Max und seine Familie, die viel Verständnis aufbrachten und mich stets unterstützten.

Vielen Dank auch an meine Freundinnen und Freunde für die Unterstützung und (notwendige) Ablenkung. Ein besonderer Dank geht dabei an Melissa für die regelmäßigen Spaziergänge während der Pandemie und meiner Schreibphase.

## Liste der Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

### Veröffentlichungen

Cho, G. S., Stein, M., Bockelmann, W., Neve, H., Brinks, E., & Franz, C. M. A. P. (2018): Draft genome sequence of *Citrobacter gillenii* MBT-C3, isolated from lamb's lettuce. In: Microbiol Resour Announc 7 (15). DOI: 10.1128/MRA.01177-18.

Cho, G. S., Stein, M., Brinks, E., Rathje, J., Lee, W., Suh, S. H., & Franz, C. M. A. P. (2020): *Serratia nevei* sp. nov. and *Serratia bockelmannii* sp. nov., isolated from fresh produce in Germany and reclassification of *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* Ajithkumar et al. 2003 as a later heterotypic synonym of *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*. In: Syst Appl Microbiol 43 (2), S. 126055. DOI: 10.1016/j.syapm.2020.126055.

Stein, M., Brinks, E., Rathje, J., Cho, G. S., & Franz, C. M. A. P. (2020): Complete genome sequence of Tetracycline-resistant *Serratia liquefaciens* S1, isolated from mixed greens, obtained using Illumina MiSeq and Oxford Nanopore MinION sequencing. In: Microbiol Resour Announc 9 (19). DOI: 10.1128/MRA.00156-20.

Igbinosa, E. O., Brinks, E., Beshiru, A., Igbinosa, I. H., Stein, M., Cho, G. S., & Franz, C. M. A. P. (2021): Draft genome sequences of five *Staphylococcus saprophyticus* strains isolated from African fermented nono in Nigeria. In: Microbiol Resour Announc 10 (20). DOI: 10.1128/MRA.00315-21.

Cho, G. S., Stein, M., Fiedler, G., Igbinosa, E. O., Koll, L. P., Brinks, E., Rathje, J., Neve, H., & Franz, C. M. A. P. (2021): Polyphasic study of antibiotic-resistant enterobacteria isolated from fresh produce in Germany and description of *Enterobacter vonholyi* sp. nov. isolated from marjoram and *Enterobacter dykesii* sp. nov. isolated from mung bean sprout. In: Syst Appl Microbiol 44 (1), S. 126174. DOI: 10.1016/j.syapm.2020.126174.

### Konferenzbeitrag

Cho, G. S., Stein, M., Heuermann, L. P., Funk, N., Fiedler, G., Kabisch, J., Brinks, E., Neve, N., & Franz, C. M. A. P.: Antibiotikaresistente Enterobakterien aus pflanzlichen Frischeprodukten. 17. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Landshut (03.-05. April 2017).

Cho, G. S., Stein, M., Suh, S. H., Lee, W. J., & Franz C. M. A. P.: Characterization of *Serratia* species isolated from fresh vegetables using genomics. Foodborne pathogens and whole genome sequencing: impact on public health protection: Joint Conference, Paris (26.-28 März 2019).

Cho, G. S., Stein, M., & Franz, C. M. A. P.: Characterization of plasmid from *Serratia* spp. isolated from fresh produce in northern Germany. International Symposium of Multi-sectoral One Health AMR Initiative for AMR control, online (19.-20. November 2020).

Stein, M., Cho, G. S., Brinks, E., Habermann D., & Franz C. M. A. P.: Is fresh produce a vehicle for the spread of antibiotic resistance genes? 74. DGHM-Jahrestagung 2022, Berlin (05.-07. September 2022).