



ONE Health – Effekte organischer Dünger und von Beregnungs- wasser auf das Vorkommen übertragbare Antibiotikaresistenzen im Pflanzenmikrobiom

Kornelia Smalla

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
(JKI), Braunschweig, kornelia.smalla@julius-kuehn.de

ONE Health Effekte organischer Dünger und von Beregnungswasser auf das Vorkommen übertragbarer Antibiotikaresistenzen im Pflanzenmikrobiom

Kristin Hauschild¹, Masaki Shintani^{2,3,4}, Masato Suzuki⁵, Birgit Wolters¹, Khald Blau¹, Maho Tokuda², Rin Yamazaki³, Megumi Masumoto³, Ryota Moriuchi⁴, Hideo Dohra^{4,5}, Boyke Bunk⁶, Sara Gallego¹, Leila Sofie⁷, Elisabeth Grohmann⁷, Bennie Heyde⁸, Jan Siemens⁸ and Kornelia Smalla^{1*}

¹ Julius Kuehn-Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Braunschweig, Germany

²Faculty of Engineering, ³Research Institute of Green Science and Technology, ⁴Graduate School of Integrated Science and Technology, Ibaraki University, Utsunomiya, Japan

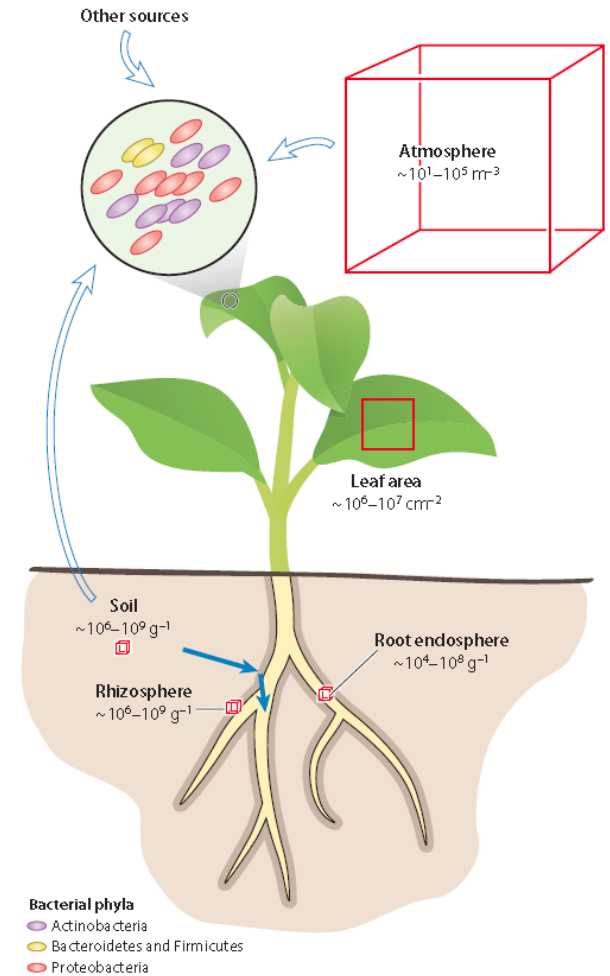
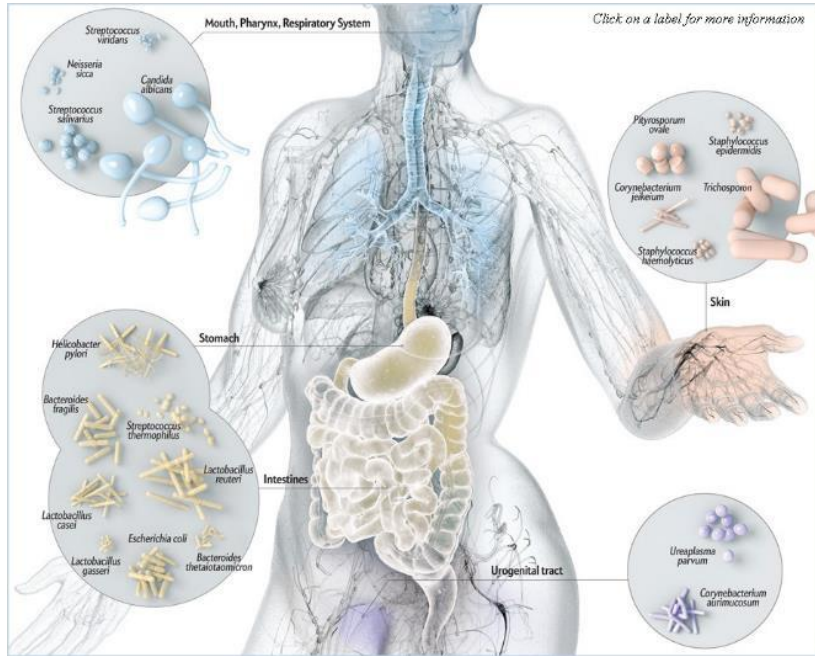
⁶Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Department of Bioinformatics, Braunschweig, Germany

⁷Berlin University of Applied Sciences, Faculty of Life Sciences and Technology, Department of Microbiology, Berlin, Germany

⁸Institute of Soil Science and Soil Conservation, Justus Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-

Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany

Antibiotika-Resistenz



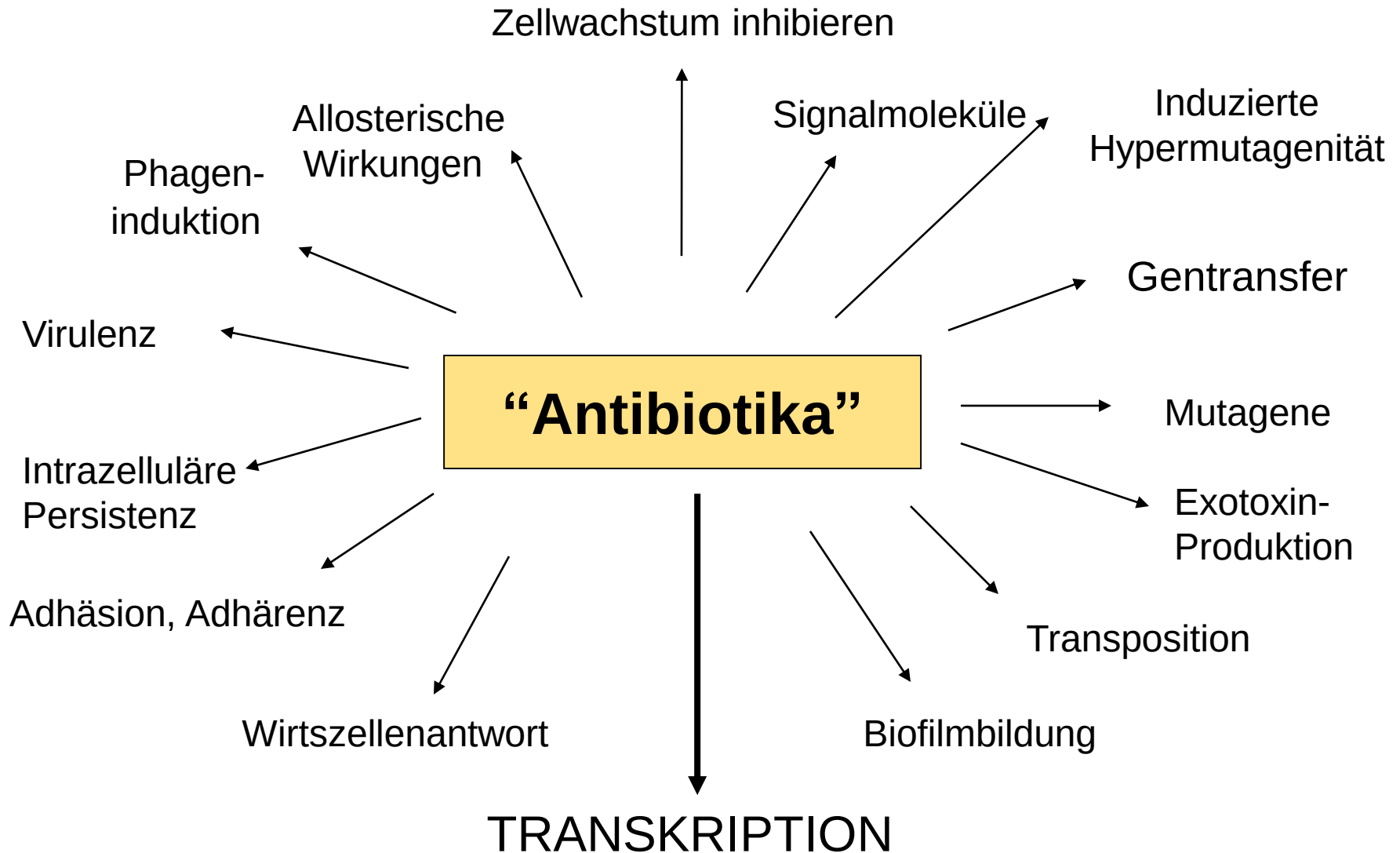
Das natürliche oder intrinsische Resistome

kein Bindungsort, Inaktivierung, durch geringe Aufnahme oder effizienten Efflux (Olivares et al., 2013; Perry & Wright, 2013)

Erworbene Antibiotikaresistenz

Antibiotika-, Metall- und Biozid-Verbindungen, die vom Menschen genutzt werden, verursachen Veränderungen in der Mikrobiom-Zusammensetzung, Selektion von resistenten Bakterien, fördern horizontalen Gentransfer

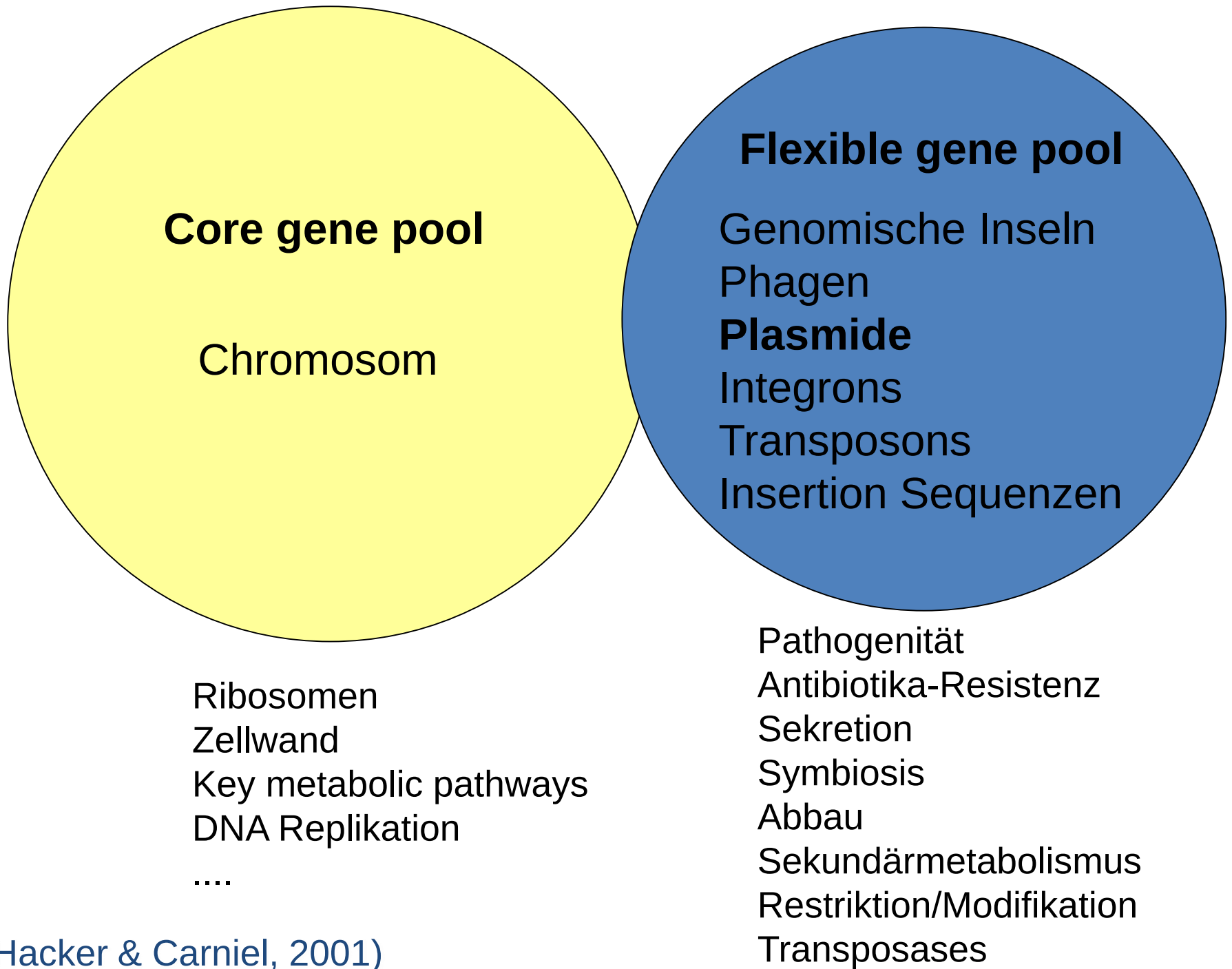
Natürliche Funktionen von Antibiotika: bioaktive Moleküle, die bei sub-inhibitorischen Konzentrationen



Umwelt “hot spots”

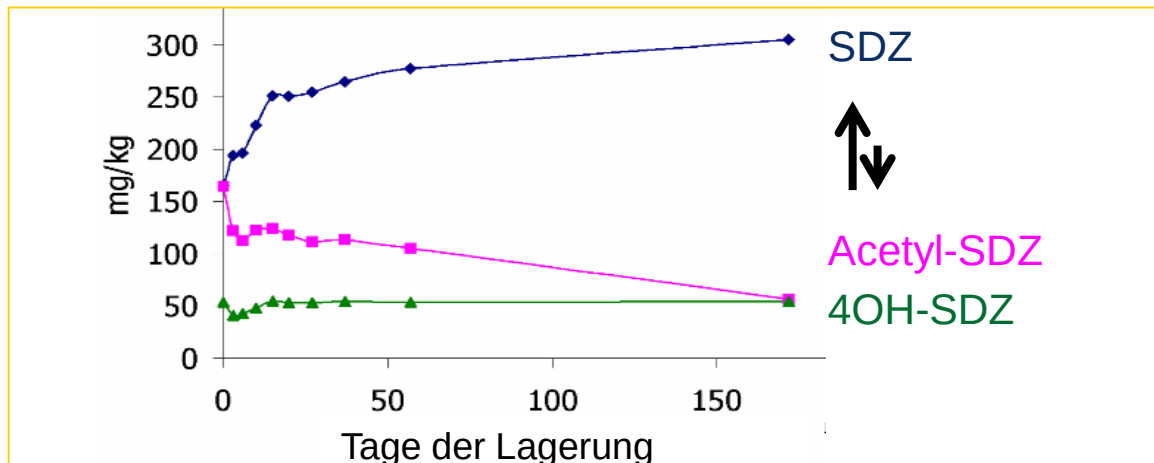


- ➔ Abwasser, Klärschlämme, Gülle, Gärreste sind Umwelthabitate mit einer großen Zahl von Bakterien mit transferablen Resistenzgenen gegen Desinfektionsmittel, Metall- und Antibiotikaverbindungen.
- ➔ Komplexe Interaktionen zwischen Bakterien in Habitaten mit sub-inhibitorischen Konzentrationen von unterschiedlichsten selektiven Agenzien.



Unbeabsichtigte Effekte der Nutzung von Antibiotika in der Human- und Tiermedizin

- ➡ Sie beeinflussen Nichtziel-Mikroorganismen des Mikrobioms von Tieren, Menschen, Pflanzen, von Oberflächenwasser und des Bodens
- ➡ Da sie ausgeschieden werden, beeinflussen sie Umweltmikroorganismen.
- ➡ Sie fördern die Fixierung und Transferabilität von Mehrfachresistenzen.
- ➡ Sie wirken bei sub-inhibitorischen Konzentrationen.



SDZ: Sulfadiazin (Antibiotikum der Sulfonamidgruppe)

Modifiziert nach M. Gillings
Heuer et al., 2008

ONE health approach

Antibiotikaresistenz – Rolle des Agro-Ökosystems

➤ Hot spots:

Mischen des Mikrobioms von **organischem Dünger mit Bodenbakterien**;
hohe Zelldichten;
Nährstoffverfügbarkeit;
Selektionsdruck.

➤ **Antibiotika, Metall- und Desinfektionsmittel und resistente Bakterien** werden mit Gülle, Gärresten und Klärschlämmen in landwirtschaftliche Böden eingebracht.

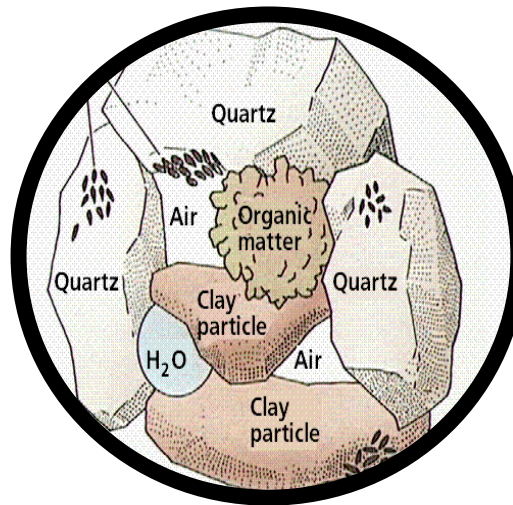
➤ **Beregnungswasser.**



Monitoring der Transmission von Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) und mobile genetischen Elementen (MGEs)

Organischer Dünger → Boden → Gemüse & Obst → Darmmikrobiom

Gülle
Gärreste
Klärschlamm
Beregnungswasser



Monitoring der Antwort des Boden- und Pflanzenmikrobioms auf organische Dünger oder Berregnungswasser

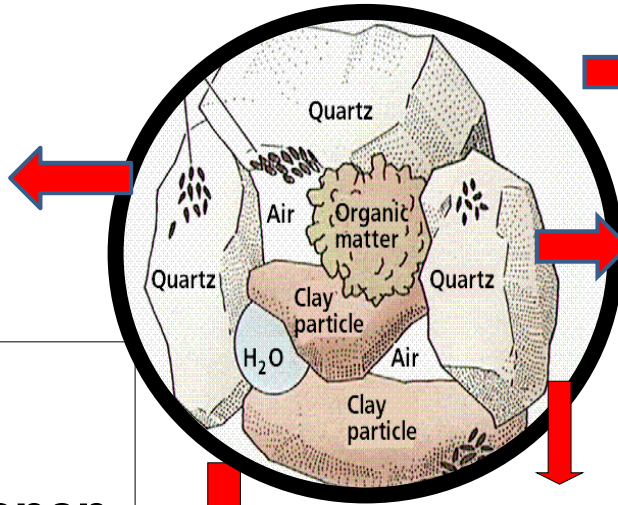
DNA/RNA-Extraktion



PCR-Amplifikation von
16S rRNA-Genen &
anderen funktionellen Genen



Quantitative PCR
PCR-Southern Blot
Amplikonsequenzierung



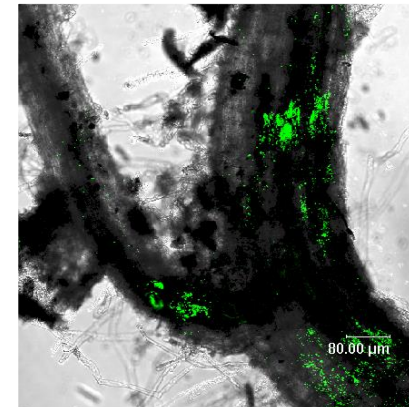
Mikroskopie

Plattierung direkt oder
nach Anreicherung

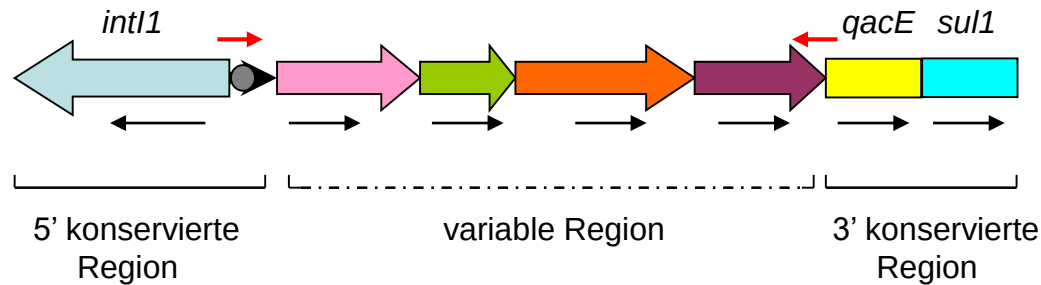


Exogene Isolierung von Plasmiden

Metagenomsequenzierung



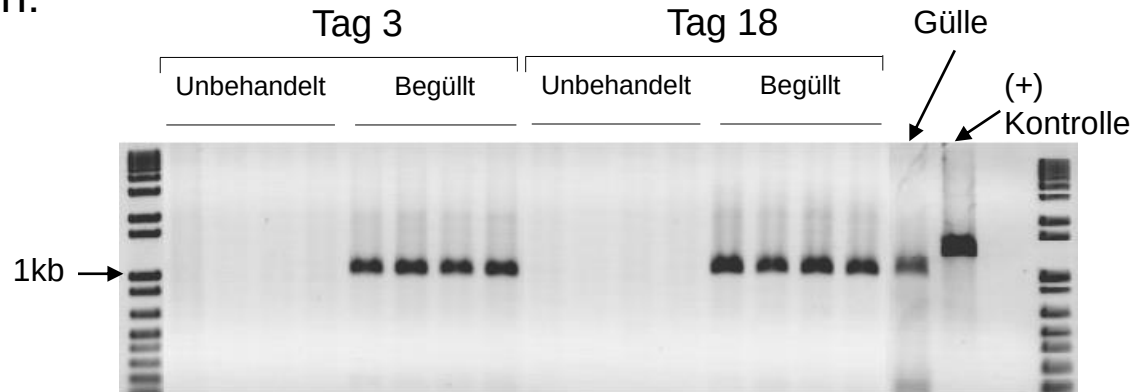
PCR-Amplifikation aus Boden oder Gülle-Gesamt-DNA



Klasse 1 Integrons

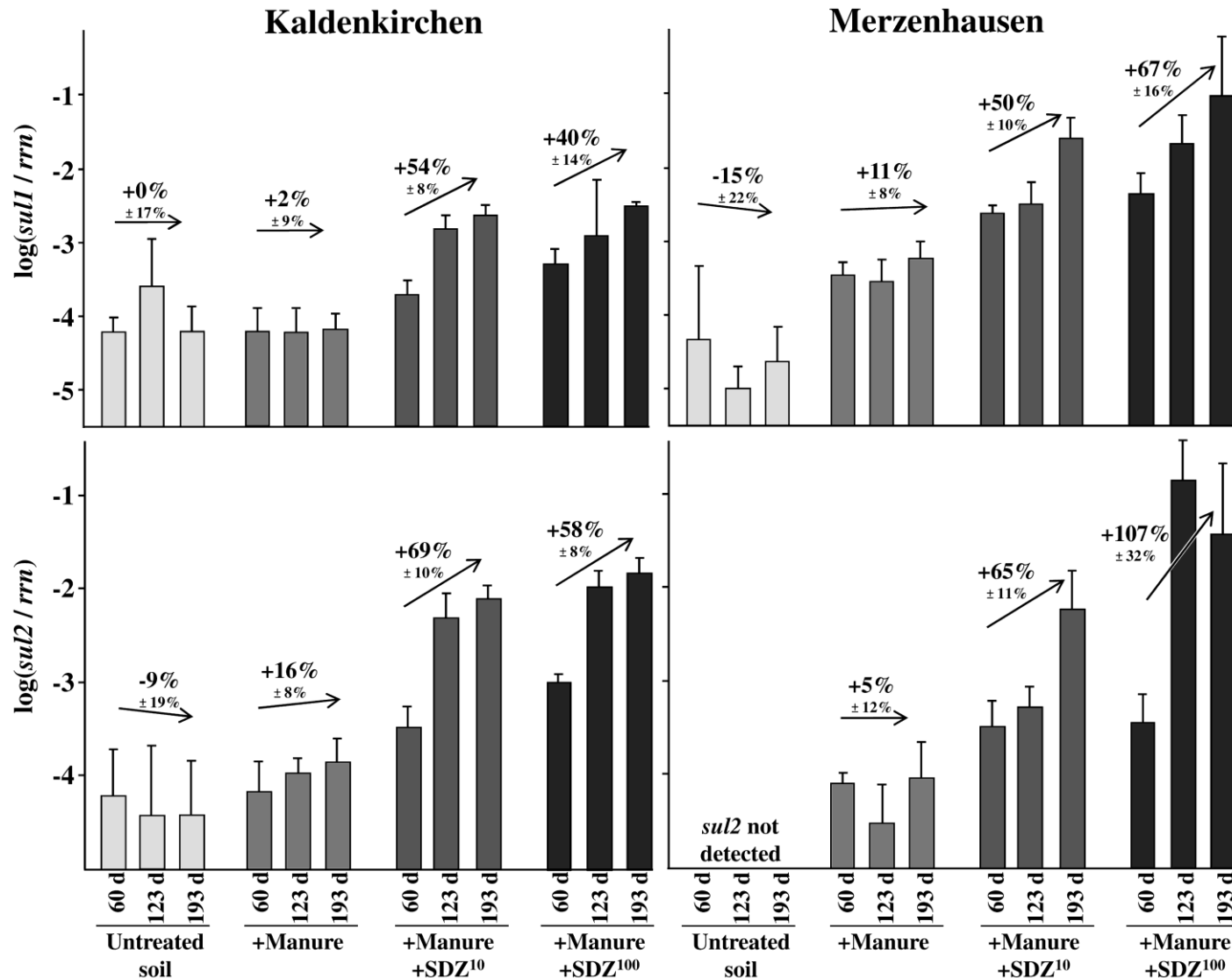
Beispiel Klasse 1 integron-Genkassetten PCR

Boden aus
Merzenhausen:



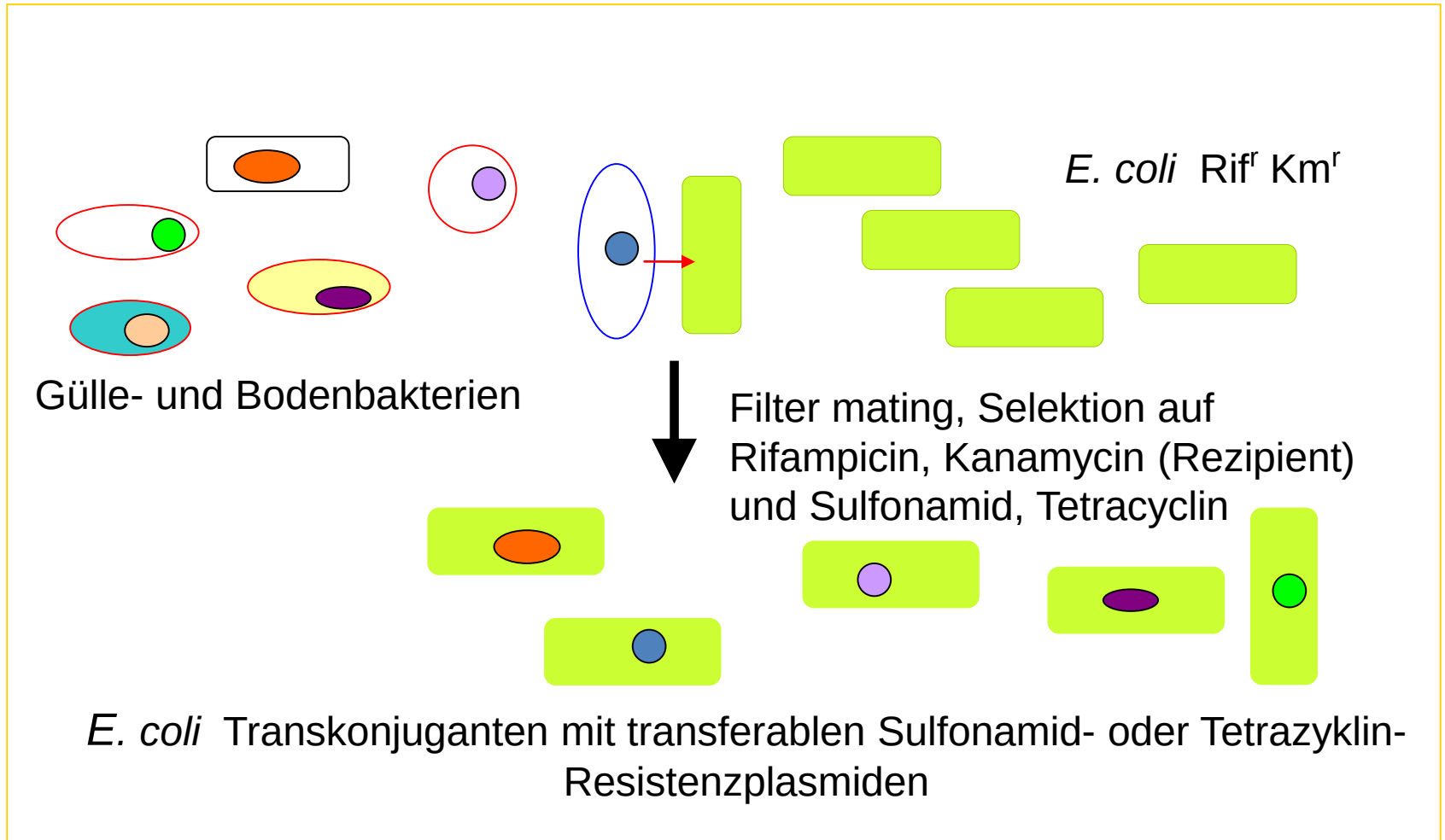
➡ Anwendung von Gülle erhöht die Abundanz von Bakterien mit Klasse 1 Integron-Genkassetten in Boden aus Merzenhausen (vorher nur Mineraldünger gedüngt)

Wiederholte Begüllung führt in Gegenwart von Sulfadiazin zu einer Akkumulation von Sulfonamid-Resistenzgenen (*sul1*, *sul2*)



Quantitative real-time PCR mit Taqman-Sonden mit Gesamt-DNA ermöglicht die Quantifizierung der Abundanz von Resistenzgenen und Plasmiden

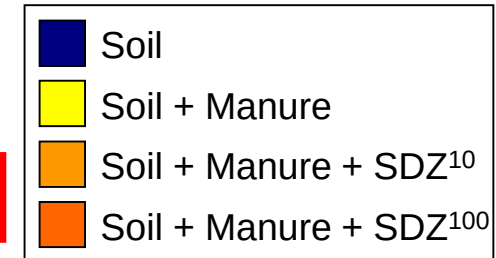
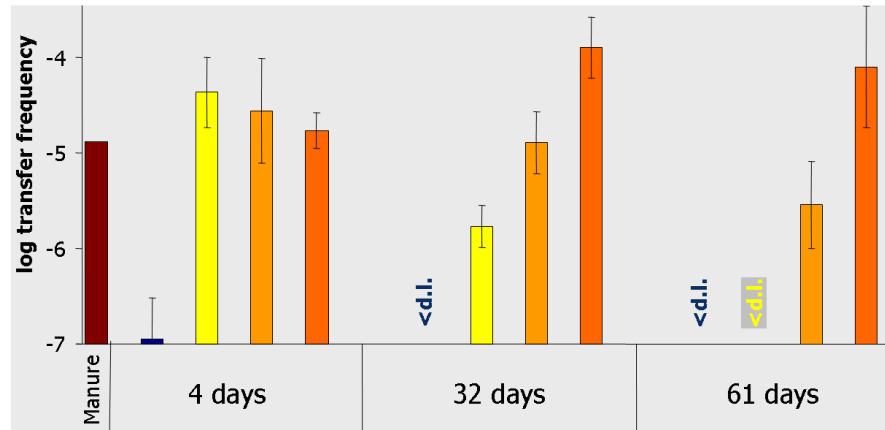
Exogene Isolierung von übertragbaren Antibiotika-Resistenzen in Gülle- und Bodenbakterien



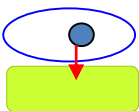
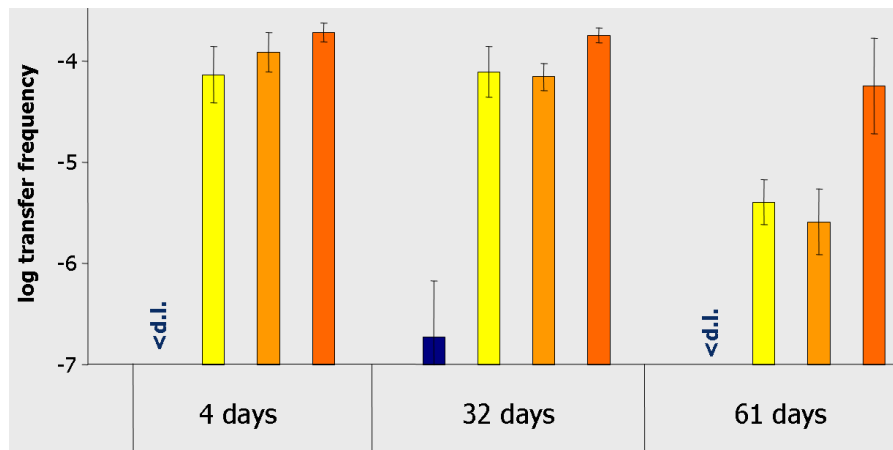
Methode wurde erfolgreich angewendet, um Antibiotika-Resistenzplasmide aus Boden, Rhizosphäre, Gülle, Gärresten zu isolieren.

Transferfrequenzen in exogenen Isolierungen waren signifikant höher bei Behandlungen von Böden mit Gülle + Sulfadiazin (SDZ)

Soil KS



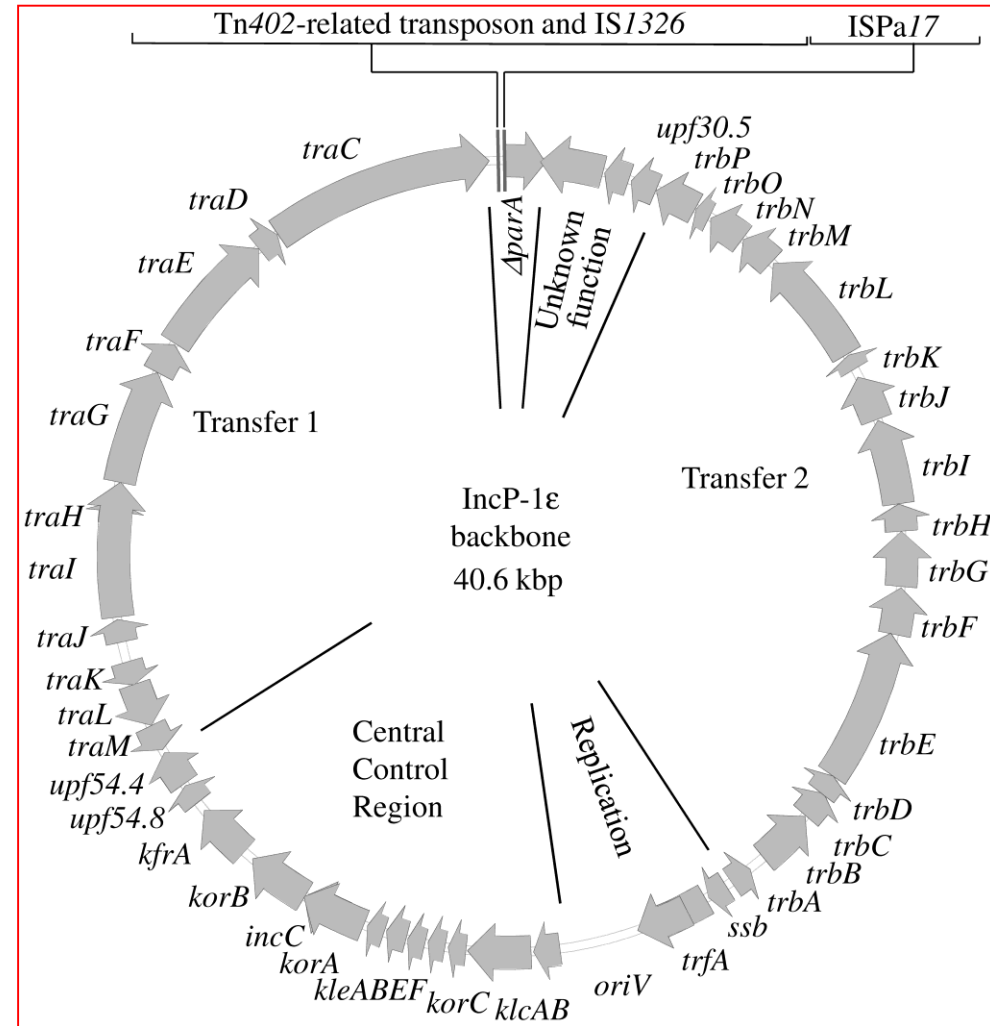
Soil ML



- ➡ Nährstoffe sind notwendig, um das Transferpotential zu aktivieren
- ➡ Geringere Zahl von Transkonjuganten aus Gülle im Vergleich zu begülltem Boden

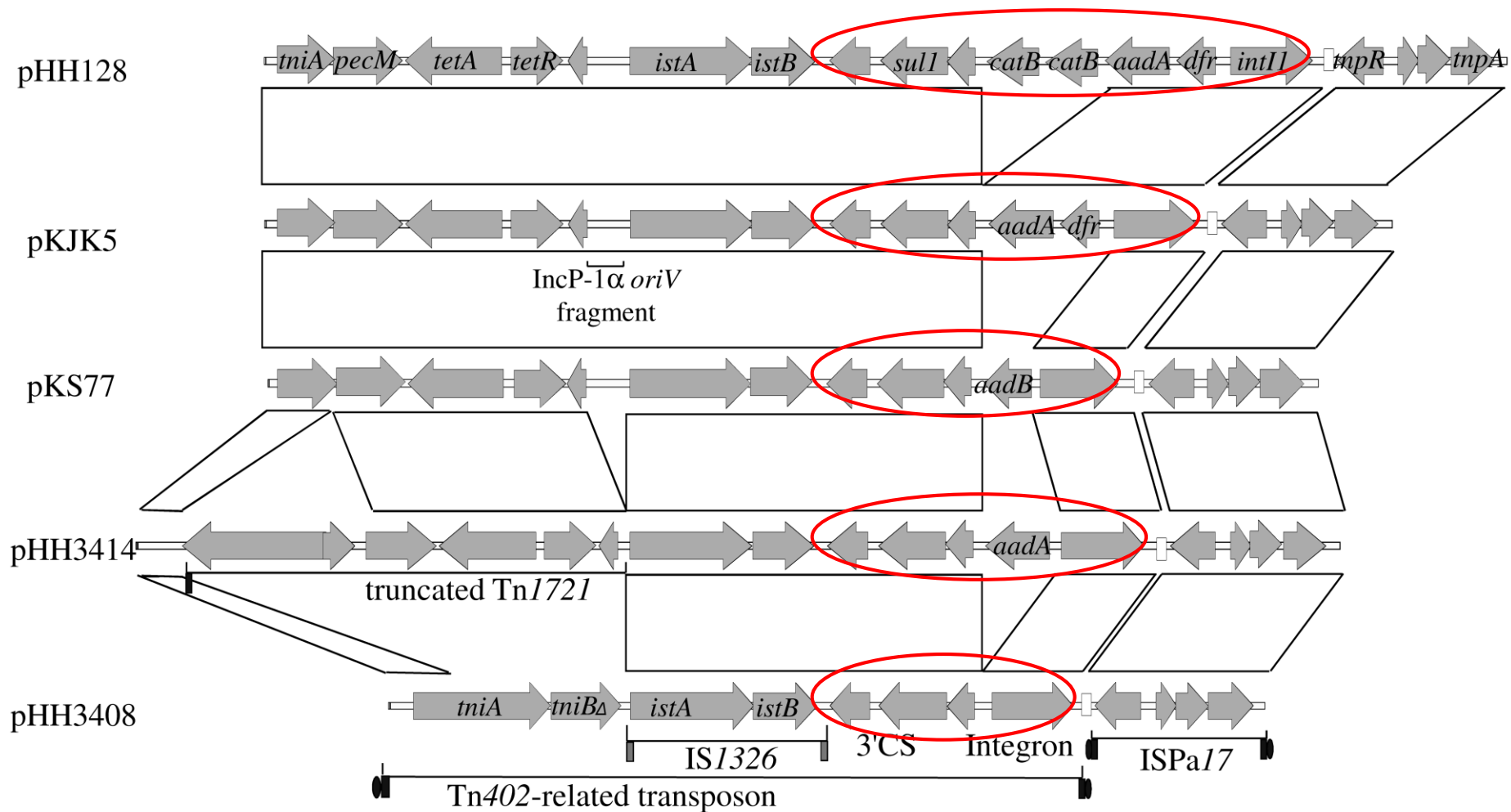
Sehr häufig “gefischt”: IncP-1 ϵ Plasmide

Sehr breiter Wirtsbereich;
mobilisieren nichtkonjugative
Plasmide;
Transferieren effizient im Boden



- ➡ Das Plasmidrückgrat ist bei allen Plasmiden dieser Gruppe identisch zum Referenzplasmid pKJK5.
- ➡ Das Plasmidrückgrat besteht aus Modulen für Replikation, Regulation, Partitioning, Regulation, Mating pair formation und konjugativen Transfer.

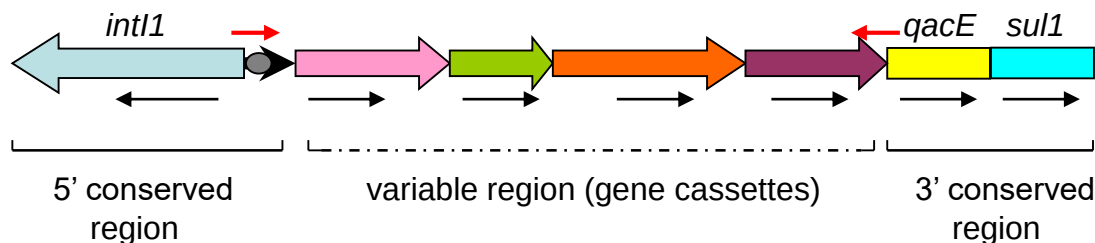
Akzessorische Gene von IncP-1 ϵ Plasmiden



Hohe Diversität der IncP-1 ϵ Plasmide durch akzessorische Gene (Klasse 1 Integrons)

IncP-1 ϵ Plasmide konnten auch aus Gärresten verschiedener Biogasanlagen exogen isoliert werden

# TF	BGP	Detected markers	Gene cassette size [bp]	Resistance	Moderate resistance	# rp
Ps26	2	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A), <i>aadA1</i>	1000	SDZ, TET*	DOX	3
Ps28	2	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)	1600	SDZ, TET*, TMP	DOX, SM	1
Ps29	2	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A), <i>aadA1</i>	2300 + 1700	SDZ, CM, SM, TET*	DOX	2
Ps32	2	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A), <i>aadA1</i>	1000	SDZ, SM, TET*	DOX	4
Ps101	5	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A), <i>aadA1</i>	1700	SDZ, SM, TET*	DOX, CM	5
Ps110	5	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A), <i>aadA1</i>	1000	SDZ, TET*	DOX, SM	6
Ps151	6	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)	1500	SDZ, TET*, TMP	DOX, SM	1
Ps152	6	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)	2200	SDZ, TET*, TMP	DOX, SM	1
Ps154	6	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)	2200	SDZ, TET*, TMP	DOX, SM	1
Ps156	6	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)	2200	SDZ, TET*, TMP	DOX, SM	1
Ps128	7	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)	2200	SDZ, TET*, TMP	DOX, SM	1
Ps134	7	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A), <i>aadA1</i>	2300 + 1700	SDZ, CM, SM, TET*	DOX	2
E9	1	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)	2200	SDZ, TET*, TMP	DOX, SM	1
E10	1	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)	2200	SDZ, TET*, TMP	DOX, SM	1
E12	1	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)	2200	SDZ, TET*, TMP	DOX, SM	1
E17	1	<i>intl1</i> , <i>qacE</i> Δ 1, <i>sul1</i> , <i>tet</i> (A)	2200	SDZ, TET*, TMP	DOX, SM	1



Integrations

Wolters et al., 2015,
Frontiers in Microbiology

Detektion von Plasmiden, Integrans und Antibiotika in Schweinegülle

Farm	IncN	IncP-1	IncQ	IncW	LowGC	<i>intl1</i>	<i>intl2</i>	Detected antibiotics [mg/kg DW]
F1	-	+++	+++	-	-	+++	+++	Tc 300.00
F2	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	Doxy 20.30
F3	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	Tc 52.90
F4	-	+++	+++	-	-	+++	+++	Tc 161.00
F5	-	++	+	-	-	+++	+++	Tc 263.00
F6	-	+++	+++	-	-	+++	+++	Tc 287.00, SDZ 0.72, Ac-SDZ 11.50
F7	-	+++	+	-	-	+++	+++	Tc 5.50, CTc 26.60
F8	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	-
B1	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	Doxy 50.00
B2 Cellar Silo	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	Tc 4.60, Doxy 19.00
	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	Tc 9.40
B3 piglets fatten.	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	Oxy 211.00
	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	CTc 15.80, Oxy 14.90
B4 Silo a Silo b	+	+++	+++	-	-	+++	+++	CTc 26.40, Doxy 27.70
	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	Doxy 101.00
B5	++	+++	+++	+++	-	+++	+++	Tc 1.50, Enr 1.30, Tia 1.40
B6	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	Doxy 52.60, SDM 23.00

→ IncN and lowGC plasmids only detected in manures from pig breeding

Nachweis von Resistenzgenen in DNA aus Schweinegüllen

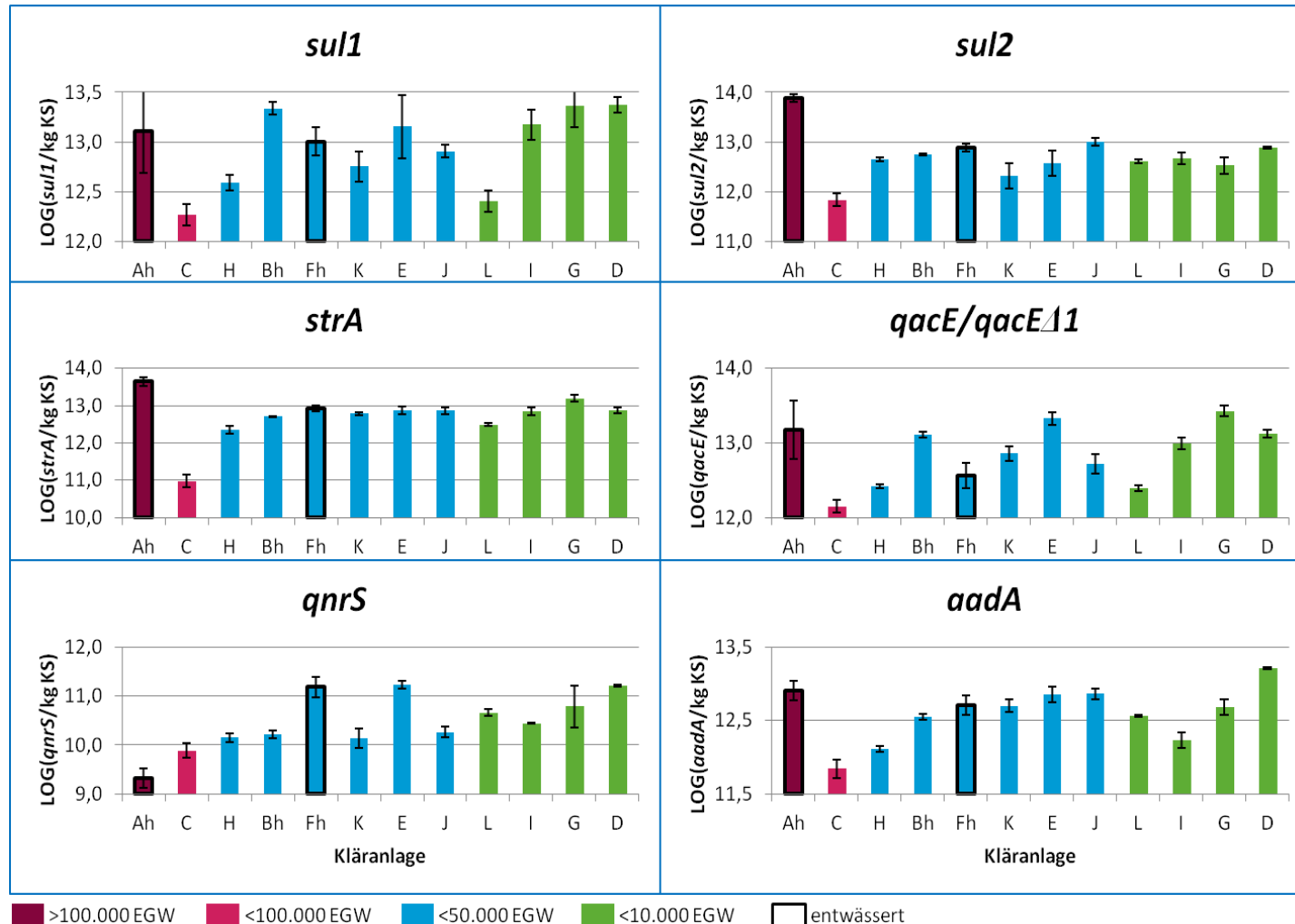
Farm	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(X)</i>	<i>qacE</i>	<i>qacE</i> Δ 1
F1	+++	+++	-	++	++	++	-	+++
F2	+++	+++	-	++	++	++	-	+++
F3	+++	+++	-	++	++	++	-	+++
F4	+++	+++	-	++	++	++	-	+++
F5	+++	+++	-	++	+	++	-	+++
F6	+++	+++	-	++	+	++	-	+++
F7	+++	+++	-	++	+	++	-	+++
F8	+++	+++	-	++	+	++	-	+++
B1	+++	+++	-	++	+	++	-	+++
B2								
Cellar	+++	+++	-	++	+	++	(+)	+++
Silo	+++	+++	-	++	(+)	++	-	+++
B3								
piglets	+++	+++	-	++	+	++	-	+++
fatten.	+++	+++	-	++	+	++	-	+++
B4								
Silo a	+++	+++	-	++	+	++	-	++
Silo b	+++	+++	-	++	+	++	-	+++
B5	+++	+++	-	++	+	++	-	+++
B6	+++	+++	-	++	++	++	-	+++

Nutzung von Klärschlämmen als organische Dünger: Ist die Größe der Kläranlage entscheidend für die Belastung mit ARG, MGE und Mikroschadstoffen?

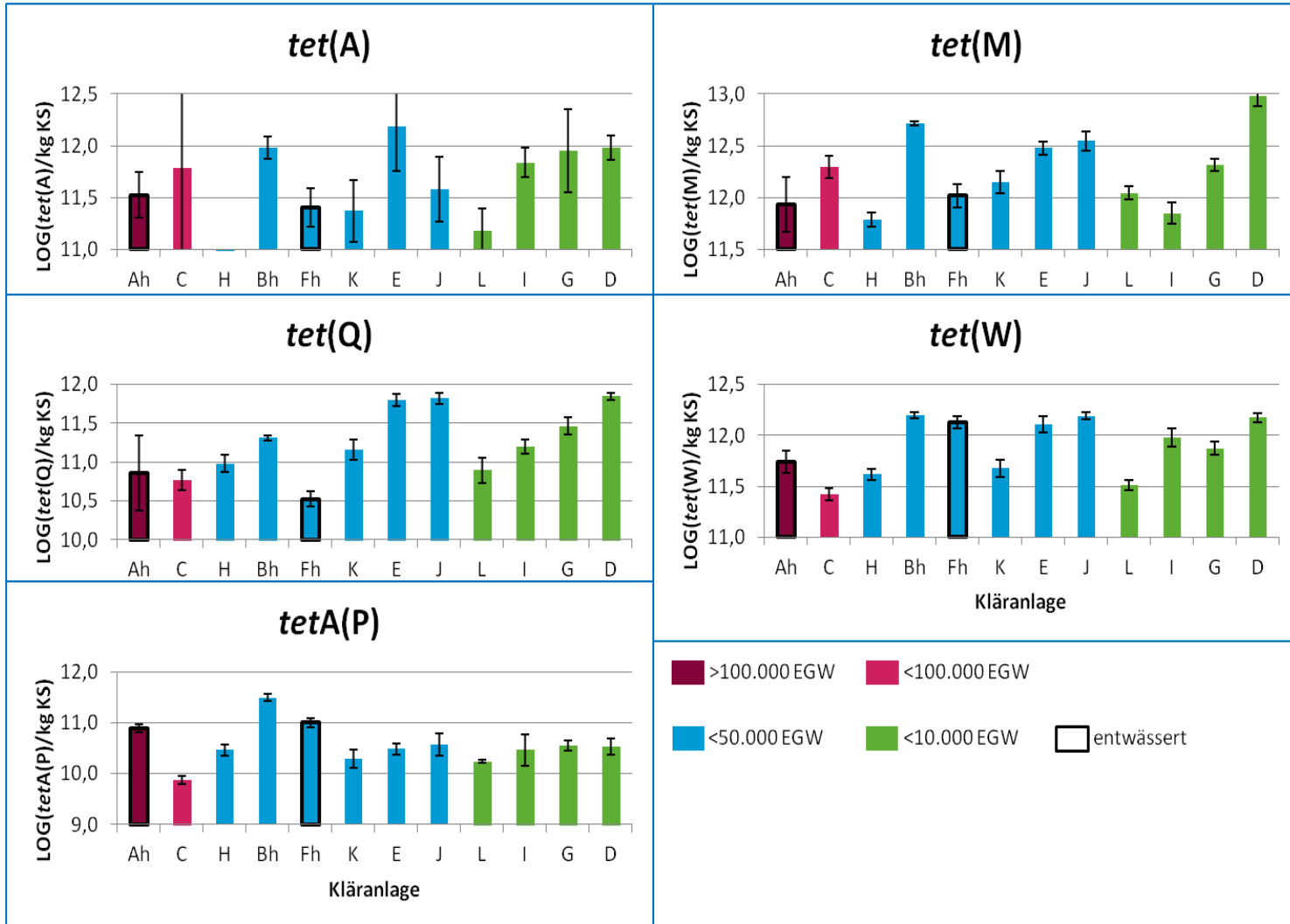
Wolters et al., Environ Microbiol 2022

WWTP	IEs*	Size	WWTP Treatment	State of biosolids	Hospital in catchment area	Biosolid disposal	Other features of catchment area
A ^L	>100,000	Large	Anaerobic digestion	Dewatered	Yes	Land use	Hospital
B ^M	<50,000	Medium	Anaerobic digestion	Liquid	Yes	Land use	Hospital, food industry
C ^L	<100,000	Large	Aerobic stabilization	Liquid	No	Incineration	Food industry
D ^S	< 10,000	Small	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	
E ^M	< 50,000	Medium	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	
F ^M	< 50,000	Medium	Anaerobic digestion	Dewatered	Yes	Land use	Hospital
G ^S	< 10,000	Small	Aerobic stabilization	Liquid, non-stabilized**	No	Land use**	
H ^M	< 50,000	Medium	Aerobic stabilization	Liquid	No	Incineration	
I ^S	< 10,000	Small	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	
J ^M	< 50,000	Medium	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	
K ^M	< 50,000	Medium	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	
L ^S	< 10,000	Small	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	Amino-acid production factory

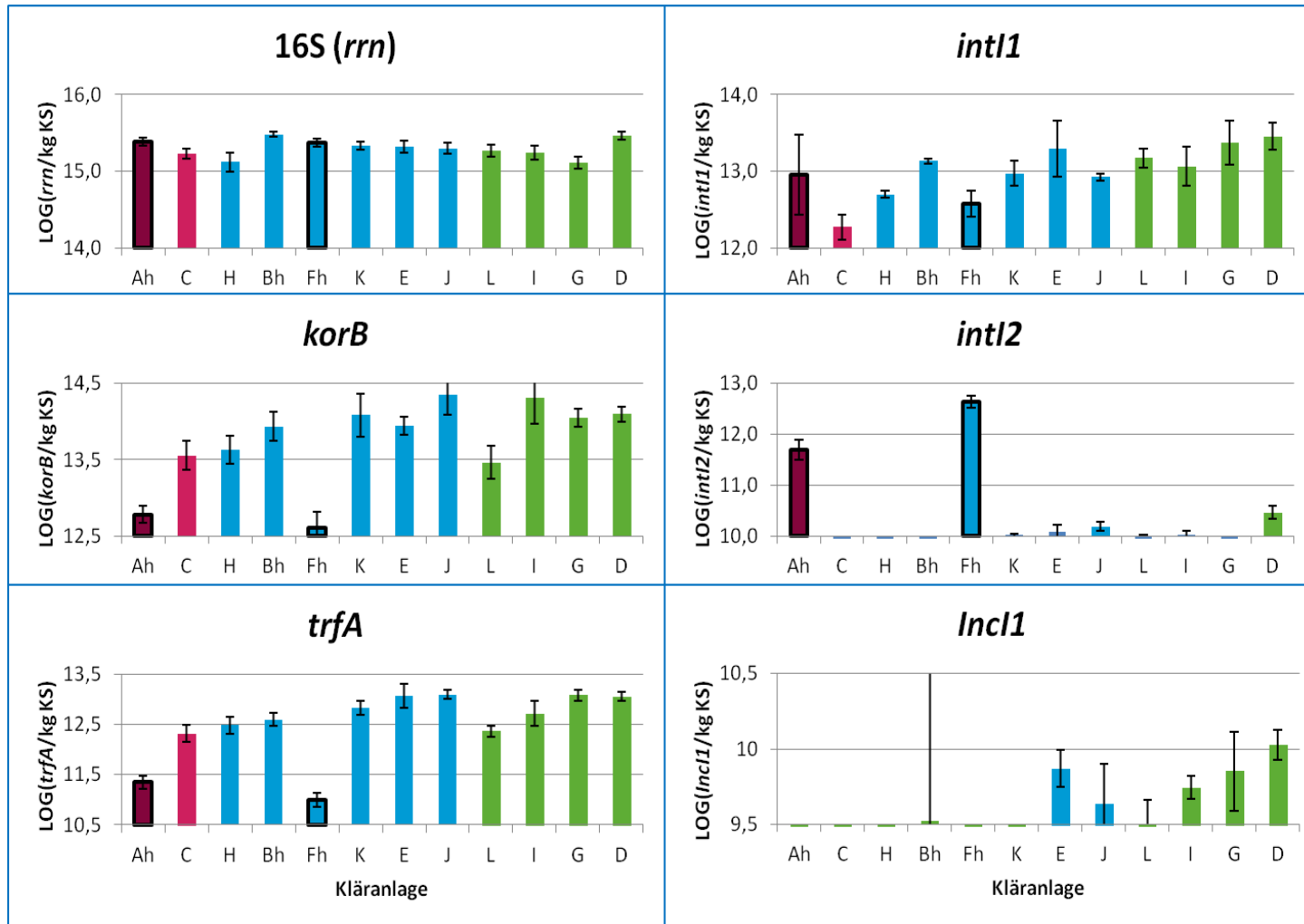
Antibiotika- Resistenzgenen (ARGs) in Klärschlämmen



Tetrazyklin-Resistenzgene in Klärschlamm

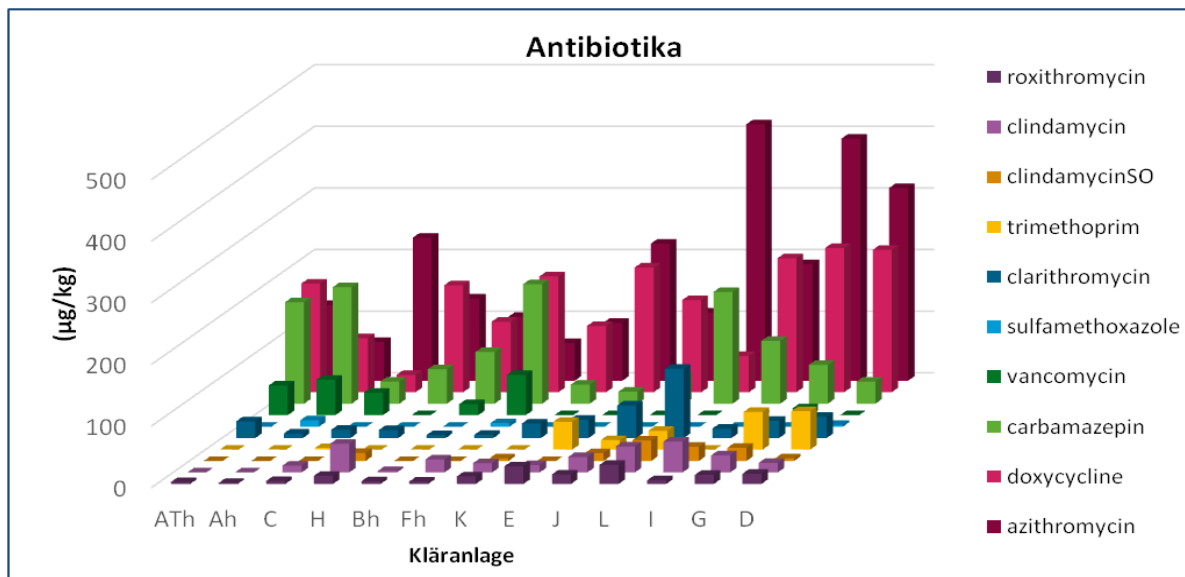


Mobile genetische Elemente (MGE) in Klärschlamm

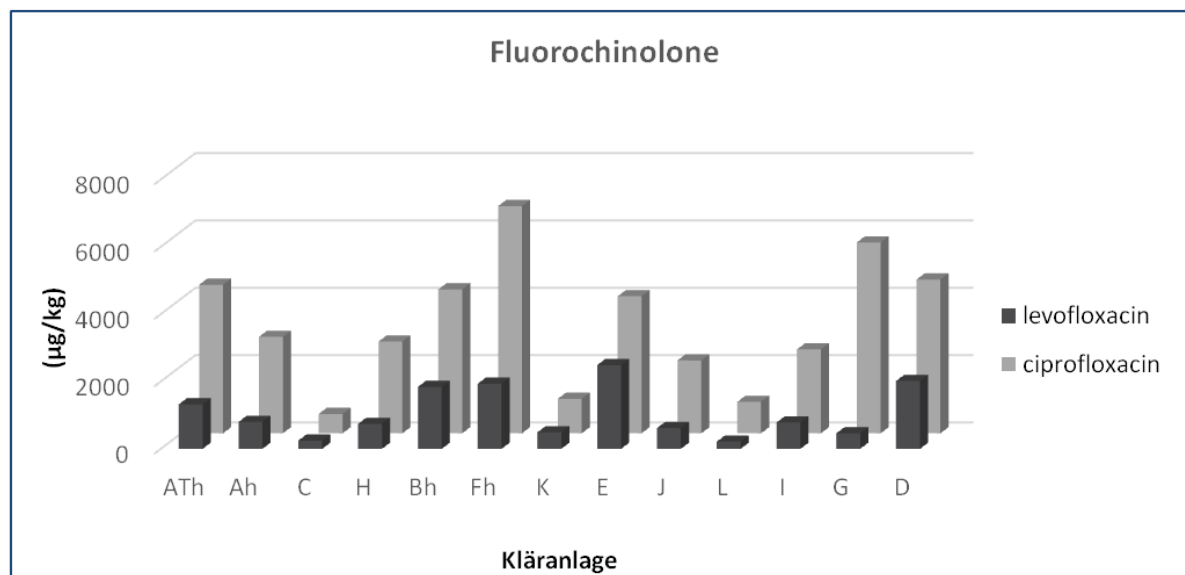


■ >100.000 EGW
 ■ <100.000 EGW
 ■ <50.000 EGW
 ■ <10.000 EGW
 entwässert

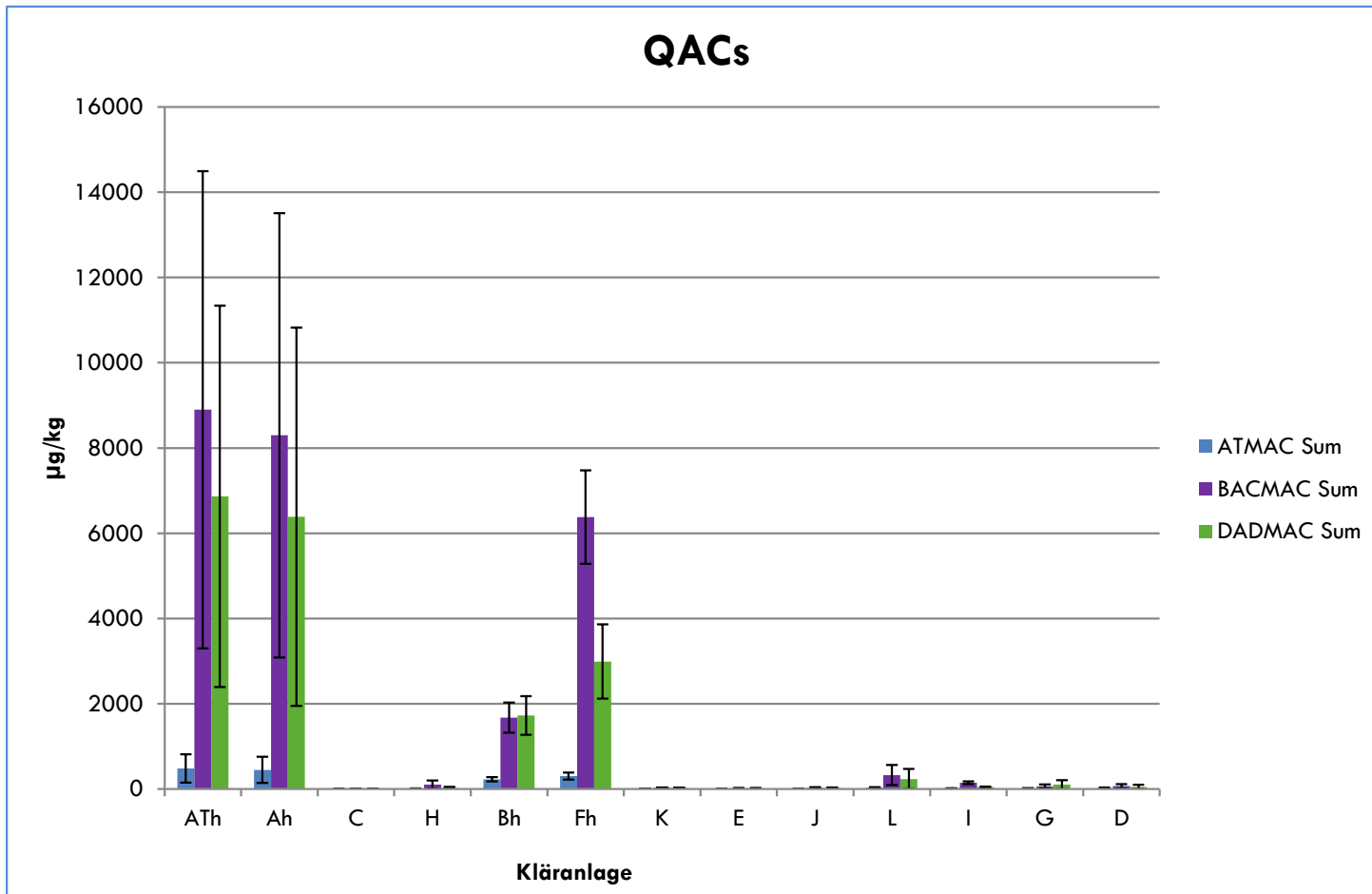
Antibiotika in Klärschlamm



WWTP	IEs*
A ^L	>100,000
B ^M	<50,000
C ^L	<100,000
D ^S	< 10,000
E ^M	< 50,000
F ^M	< 50,000
G ^S	< 10,000
H ^M	< 50,000
I ^S	< 10,000
J ^M	< 50,000
K ^M	< 50,000
L ^S	< 10,000



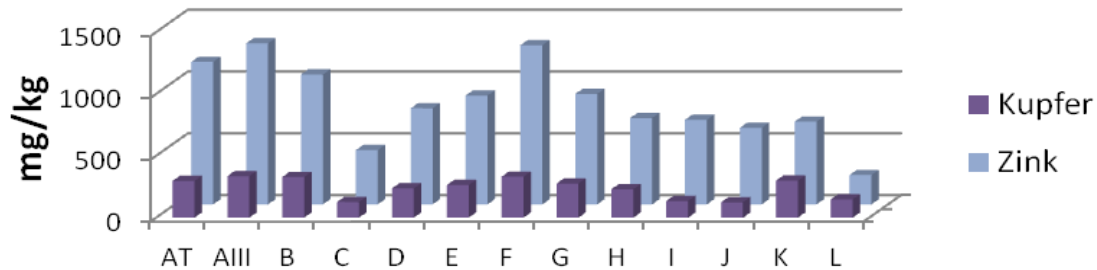
Quartäre Ammoniumverbindungen in Klärschlämmen



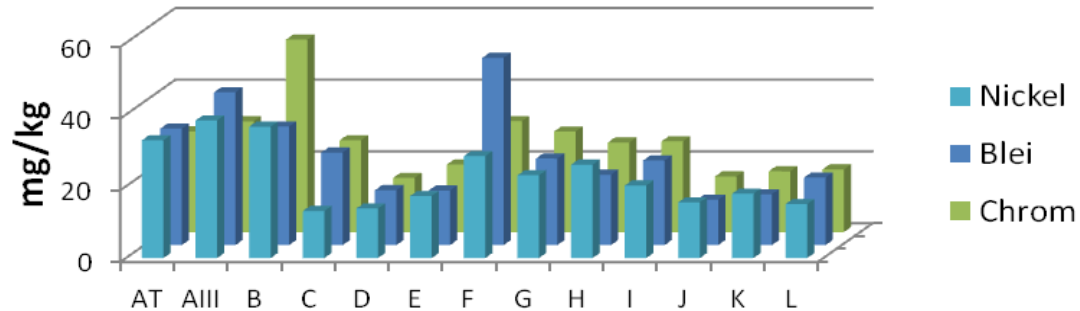
WWTP	IEs*
A ^L	>100,000
B ^M	<50,000
C ^L	<100,000
D ^S	< 10,000
E ^M	< 50,000
F ^M	< 50,000
G ^S	< 10,000
H ^M	< 50,000
I ^S	< 10,000
J ^M	< 50,000
K ^M	< 50,000
L ^S	< 10,000

Schwermetalle in Klärschlamm

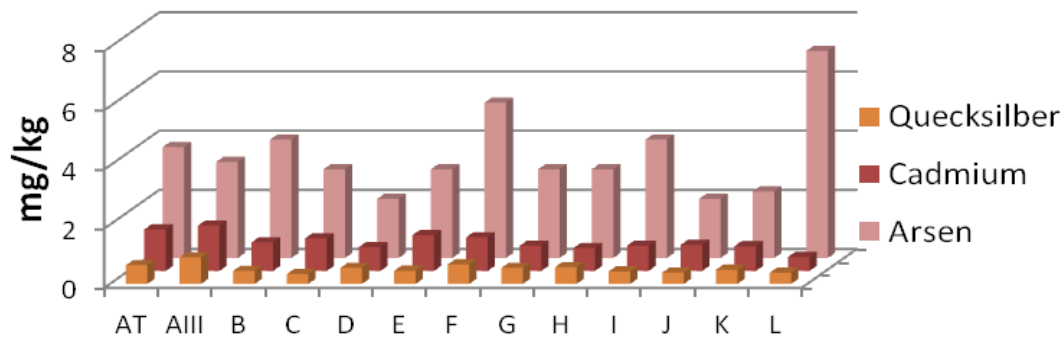
Kupfer und Zink



Nickel, Blei und Chrom



Quecksilber, Cadmium und Arsen

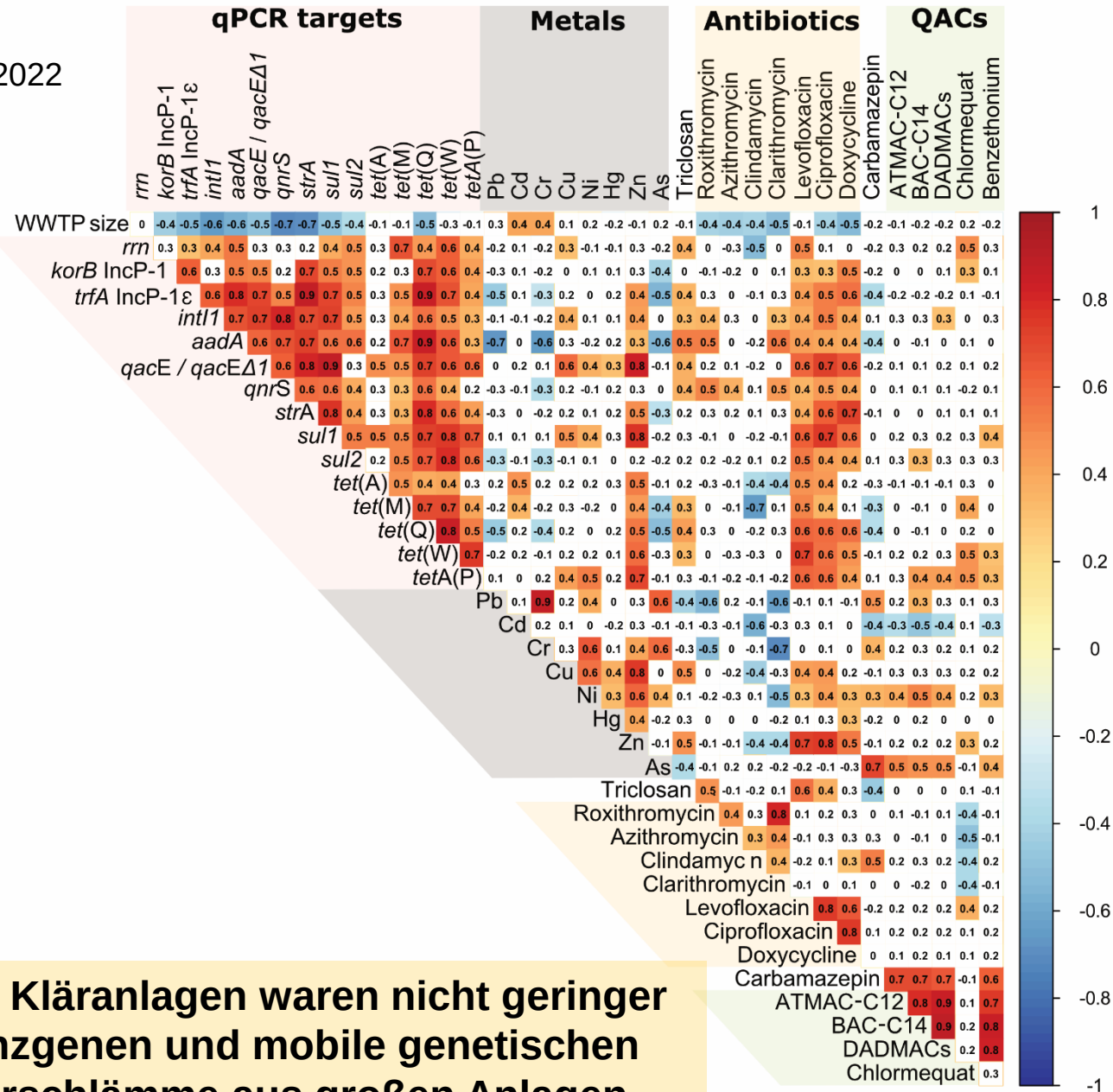


Kläranlage

WWTP	IEs*
A ^L	>100,000
B ^M	<50,000
C ^L	<100,000
D ^S	< 10,000
E ^M	< 50,000
F ^M	< 50,000
G ^S	< 10,000
H ^M	< 50,000
I ^S	< 10,000
J ^M	< 50,000
K ^M	< 50,000
L ^S	< 10,000

Korrelogramm zwischen allen in Klärschlämmen gemessenen Parameter

Wolters et al., Environ Microbiol 2022

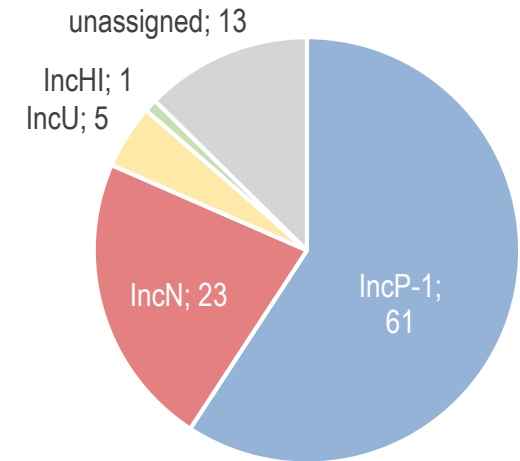


Klärschlämme aus kleinen Kläranlagen waren nicht geringer mit Schadstoffen, Resistenzgenen und mobile genetischen Elementen belastet als Klärschlämme aus großen Anlagen.

Die exogene Plasmidisolierung wurde auch genutzt, um Plasmide aus Klärschlämmen zu isolieren

WWTP	Σ	IncP-1	IncP-1 ϵ	IncN	IncHI1	IncU	int1	int2	qacE/ qacE Δ 1	su1	su2	tet(A)	tet(M)
A-hd ^L	16	16	16	-	-	-	16	-	16	16	-	16	-
C ^L	16	12	9	4	-	-	10	-	10	10	5	10	4
B-h ^M	10	10	10	-	-	-	10	-	10	10	-	10	2
E ^M	4	1	-	-	-	3	4	-	4	4	-	-	-
F-hd ^M	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1
H ^M	11	7	5	-	1	-	8	-	7	7	2	5	4
J ^M	4	1	1	-	-	-	1	-	1	1	-	1	3
K ^M	15	7	5	8	-	-	7	-	6	7	8	12	1
G ^S	5	2	2	1	-	1	4	1	4	4	-	2	1
I ^S	13	1	-	6	-	-	3	-	3	3	3	5	-
L ^S	8	3	2	4	-	1	6	-	6	6	3	7	-
Σ	103	61	50	23	1	5	60	2	58	59	21	68	16

h: Krankenhaus im Einzugsgebiet; d: entwässerte Klärschlamm; S: kleine WWTP; M: mittlere WWTP; L: large WWTP



Identifizierung durch RT-PCR
oder PCR-Replikon-Typing

Hauschild et al., in preparation

Mehrzahl der Plasmide gehörten der IncP und der IncN Gruppe an
(breiter Wirtsbereich)

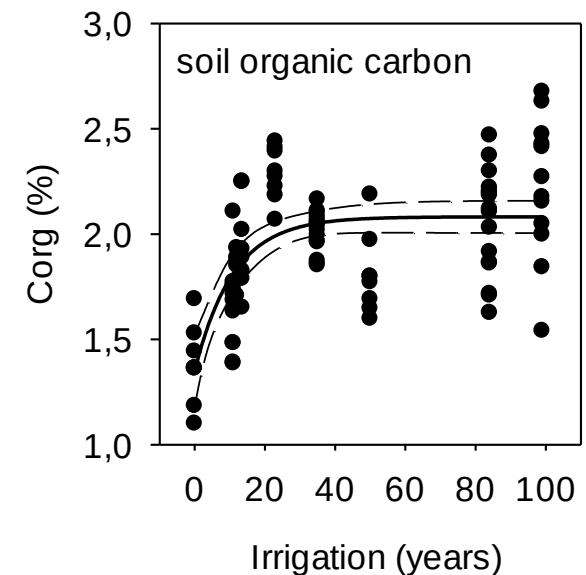
Bedeutung der Qualität von Beregnungswasser

Vorteile und Risiken der Beregnung mit behandeltem Abwasser

Vorteile

- Höhere Erträge und weniger Kosten für Mineraldünger
- Geringer Ertragsverluste bei Trockenperioden
- Die Kohlenstoffbindung im Boden verlangsamt den Anstieg von CO₂ in der Atmosphäre

aber...



Behandeltes Abwasser enthält eine Vielzahl von Mikroschadstoffen



Substance	Minimum	Maximum	Number of Plants Without Detection
Cefalexin	37	308	3
Trimethoprim	15.2	190.6	0
Ciprofloxacin	38.4	584.9	0
Enrofloxacin	69.4	69.4	12
Ofloxacin	20	305.1	1
Orbifloxacin	6.5	6.7	11
Clindamycin	6.5	110.7	1
Azithromycin	45.2	597.5	0
Clarithromycin	4.5	313.2	1
Metronidazole	7.6	93.2	4
Ampicillin	68.1	99.4	11
Nalidixic Acid	25.3	50.3	11
Oxolinic Acid	5.3	5.3	12
Pipemidic Acid	3.2	30.1	1
Sulfamethoxazole	7.1	123.4	3
Sulfapyridine	4.7	184	0
Tetracycline	15.4	231.2	2

EU watch list

Ciprofloxacin

Amoxicilin

Erythromycin

Clarithromycin

Azytrhomycin

Zusammen mit

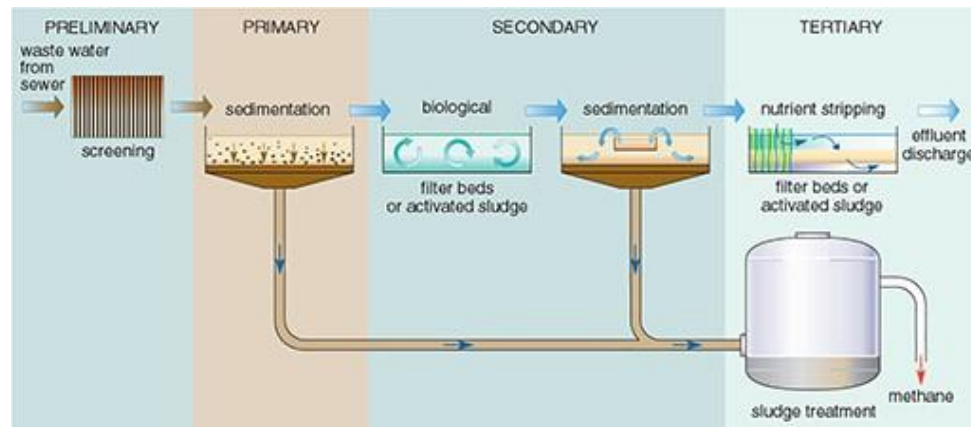
Modifiziert nach Rodriguez-Mozaz et al. 2020 Environ. Int

... Antibiotika-resistenten Bakterien

Die taxonomische Zusammensetzung und das Vorkommen von ARGs und MGEs hängen vom Ursprung der Abwässer



und vom Behandlungsprozess ab

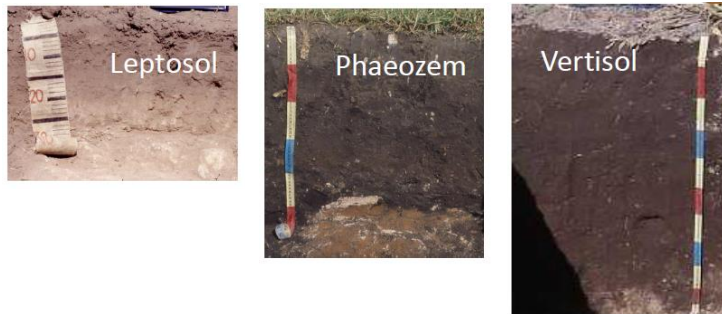


Pollutant Antibiotic Resistance Pathogen Interactions in a Changing Wastewater Irrigation System (DFG FOR 5095)



Wie tragen Mikroschadstoffe im behandelten und unbehandelten Abwasser zur Verbreitung von ARGs in Abhängigkeit vom Boden bei?

Soil



clay content

Water types



Investments in wastewater treatment

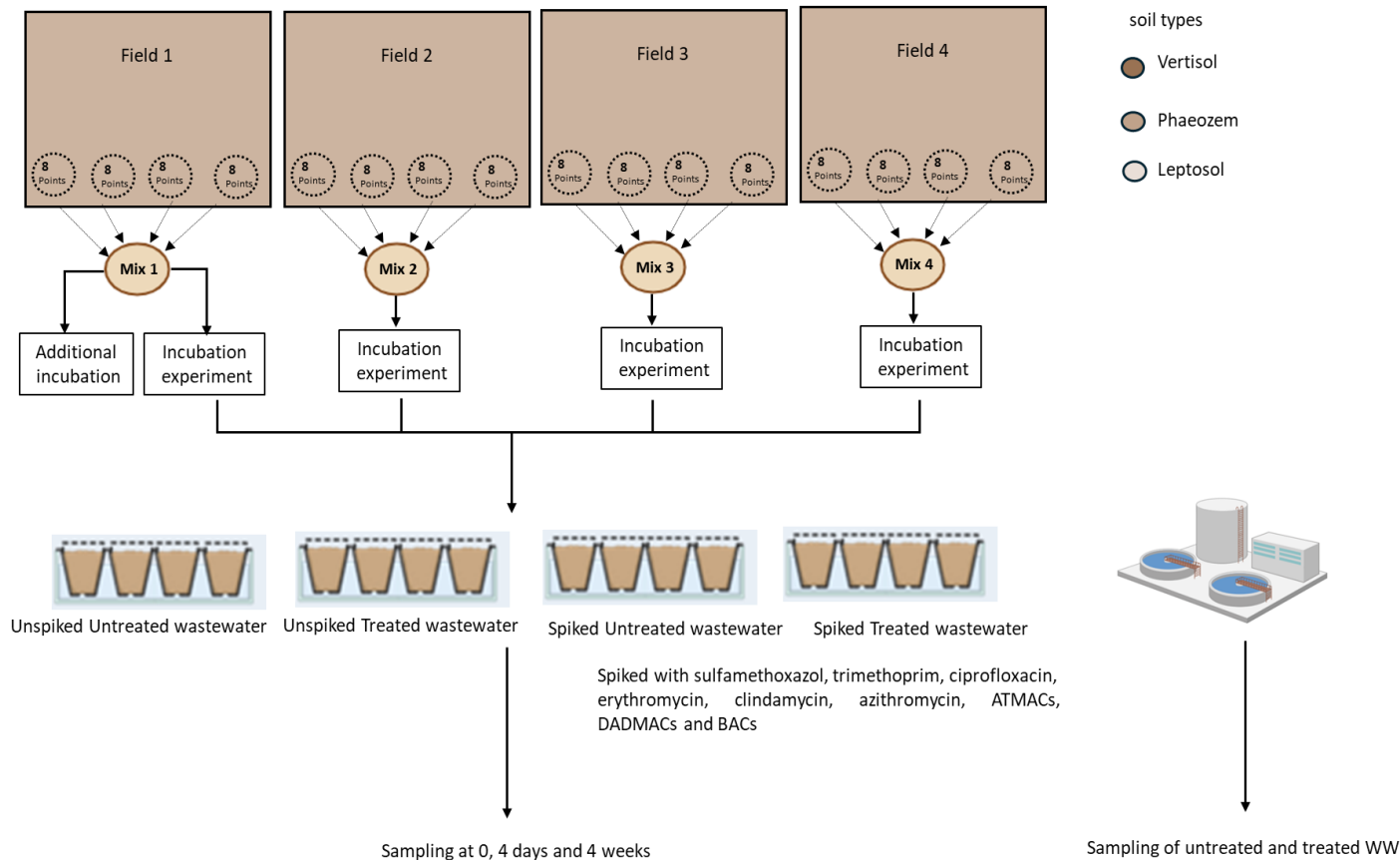


Zentralexperiment



Hypothesen

Der Bodentyp, die Beregnungswasserqualität und das Vorhandensein von Schadstoffen beeinflusst die Mikrobiomdiversität & -zusammensetzung, ARG und MGE Profile

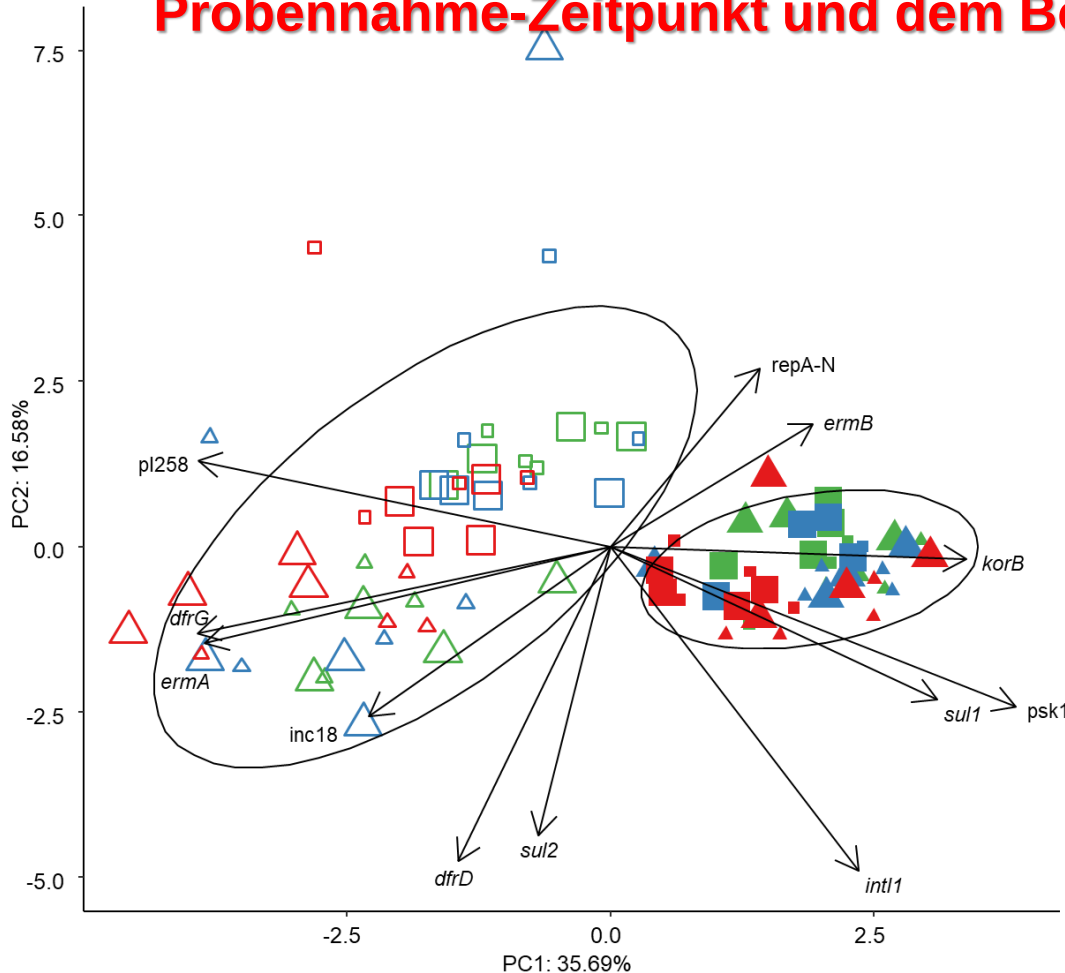


Heyde, B.J., Braun, M., Soufi, L., Lüneberg, K., Gallego, S., Amelung, W., Axtmann, K., Bierbaum, G., Glaeser, S.P., Grohmann, E., Arredondo-Hernández, R., Mulder, I., Pulami, D., Smalla, K., Zarfl, C., Siebe, C., Siemens, J., 2025. Transition from irrigation with untreated wastewater to treated wastewater and associated benefits and risks. *npj Clean Water* 2025 81 8, 1–19.

<https://doi.org/10.1038/s41545-025-00438-6>



Die relative Abundanz von ARGs und MGEs wurde durch das Vorhandensein von Mikroschadstoffen (spike), dem Probennahme-Zeitpunkt und dem Bodentyp beeinflusst



Water type

water_type

● treated

● untreated

Spiking level and time

Spiking_&_Time

▲ spiked_4d

■ spiked_4w

△ unspiked_4d

□ unspiked_4w

Soil type

● Leptosol

● Phaeozem

● Vertisol

PERMANOVA Adonis analysis of ARGs and MGEs relative abundance distribution.

Factor(s)	R ²	p-Value
soil type	0.03	0.0047**
spike level	0.30	0.0001***
water type	0.01	0.2259
sampling date	0.06	0.0001***

Das Pflanzenmikrobiom

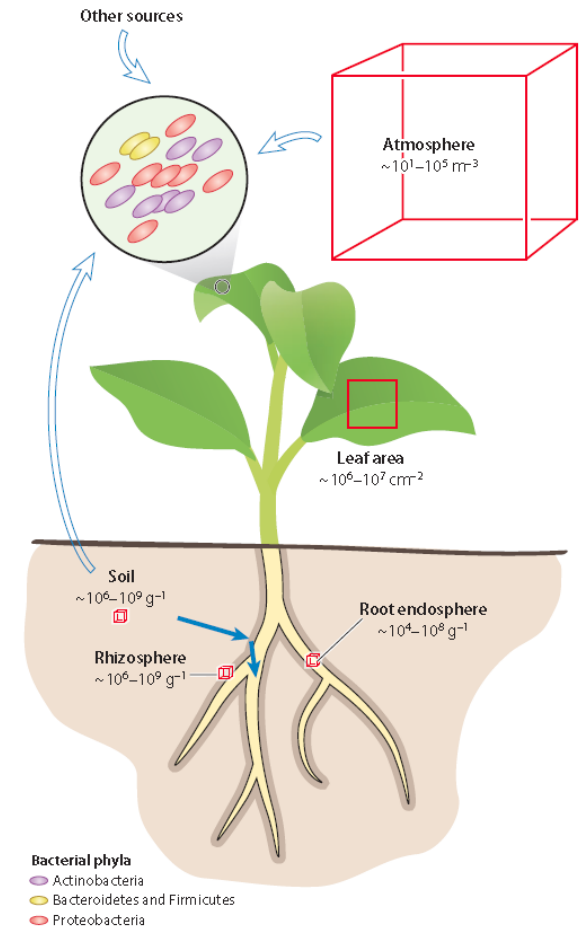
- Diverse bakterielle Gemeinschaften
- Phyllosphäre: 10^6 - 10^7 CFU/g
- Dominante Phyla
 - *Proteobacteria*
 - *Firmicutes*
 - *Actinobacteria*
 - *Bacteroidetes*

Mikrobiom-Zusammensetzung ist abhängig:

Pflanzenart, -genotype, -entwicklungsstadium,

Bodentyp, bei hydroponischen Kulturen von der Wasserqualität

Abiotischen und biotischen Faktoren (pH, Salinität)



Bakterien, die mit Pflanzen assoziiert sind, gehören häufig zu Gattungen wie

Acinetobacter

Burkholderia

Enterobacter

Klebsiella

Citrobacter

Pantoea

Pseudomonas

Stenotrophomonas

Serratia

Raoultella

Viele Noskomialkeime gehören zu diesen Gattungen (Berg et al., 2005; Ryan et al., 2009).

Gründe für den Erfolg dieser Gattungen im Krankenhaus:

Viele Pflanzen-assoziierte Bakterien bilden Biofilme

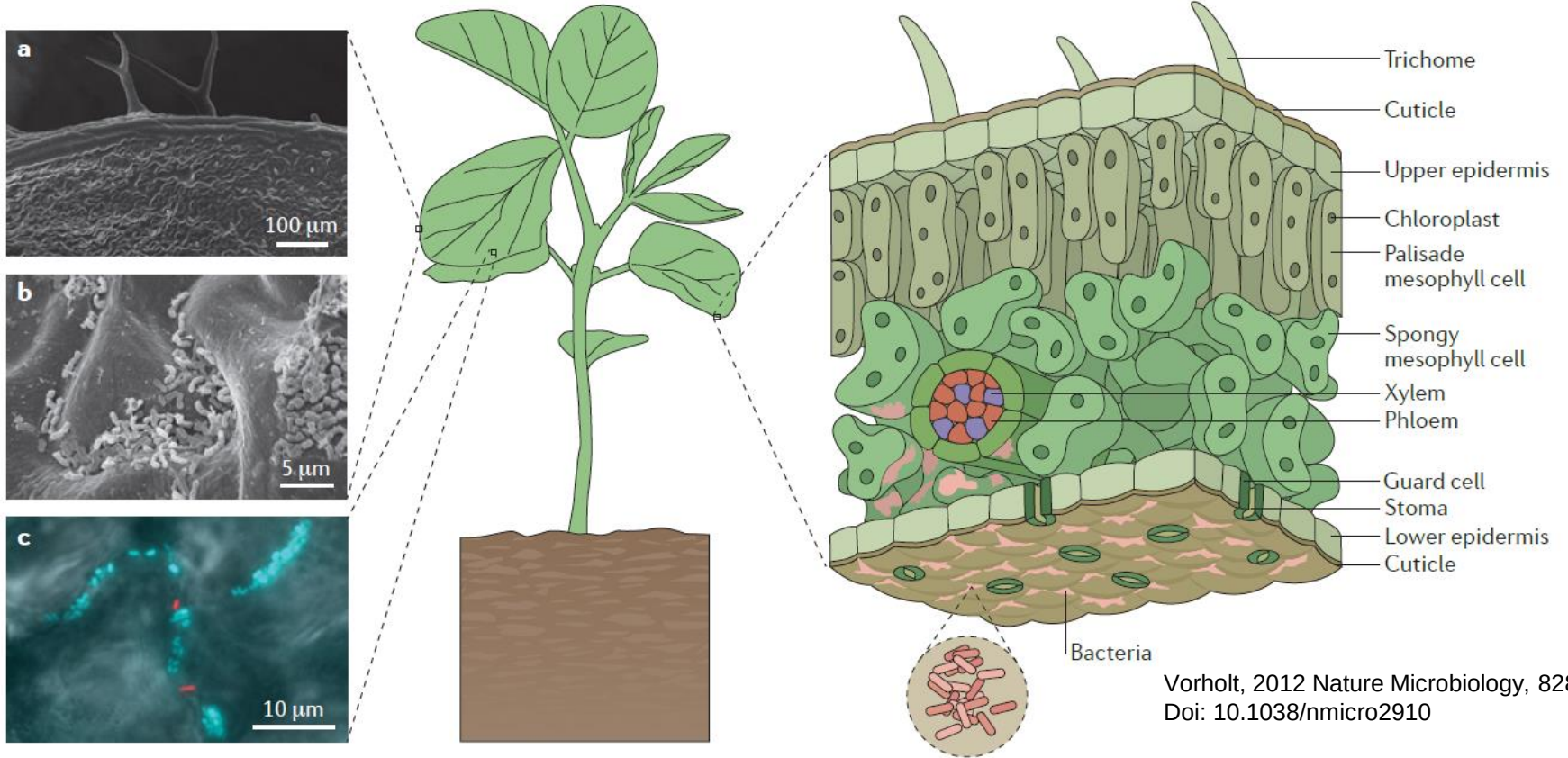
Sie haben natürlicherweise Mehrfachantibiotikaresistenzen z.B. durch effiziente Effluxpumpen.



dadurch haben sie einen Selektionsvorteil unter den Bedingungen des Krankenhauses

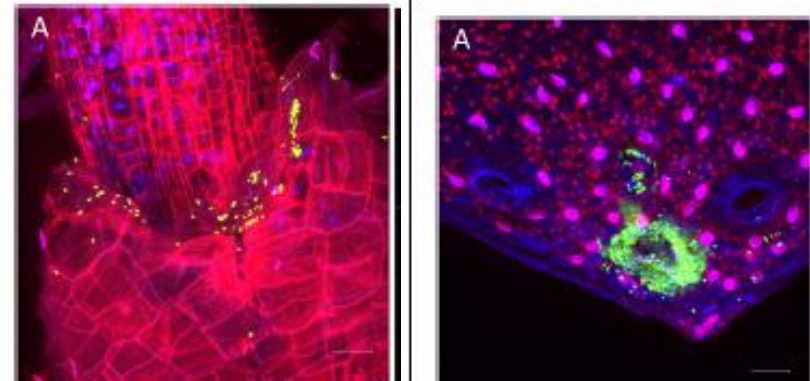
Im Pflanzenmikrobiom auch *E. coli* nachgewiesen werden (niedrige KBE)

Die Phyllosphäre als Habitat

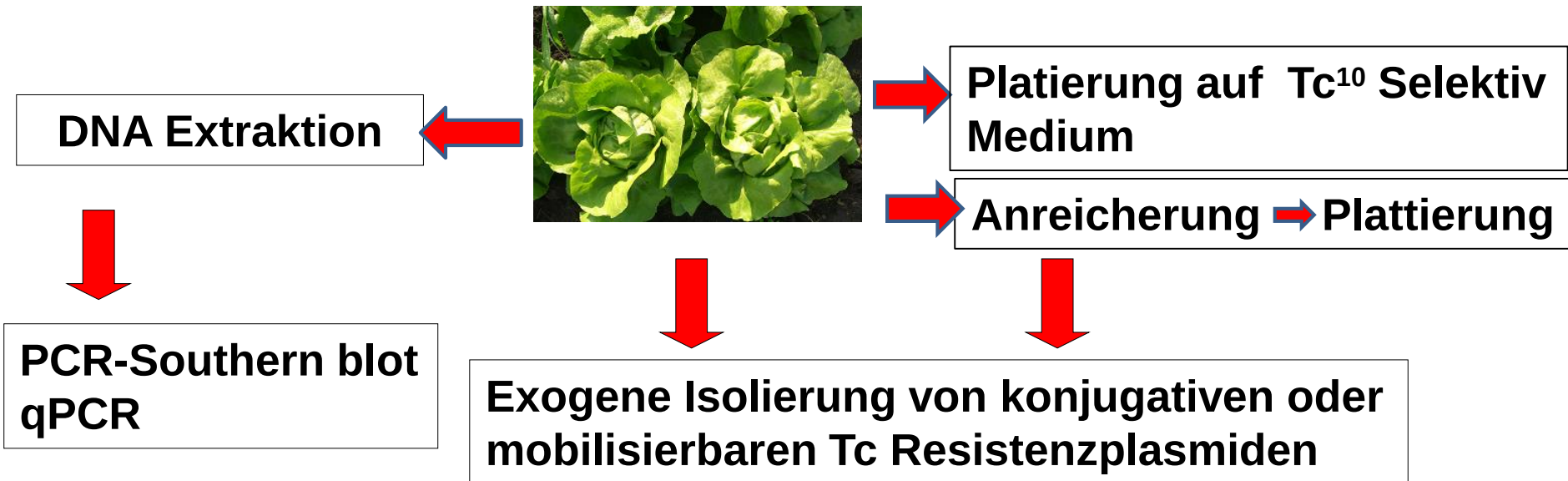


- a) SEM Arabidopsis leaf with trichomes
- b) SEM of *Spingomonas*
- c) Epifluorescence of *Pantoea agglomerans* cfp and *Pseudomonas syringae* mCherry

Heterogene Kolonisierungsmuster
Lokal hohe Zelldichten (Aggregate, Biofilme)
Heterogene Verteilung der Nährstoffe



Übertragbare Antibiotikaresistenzplasmide in Pflanzen-assoziierten Bakterien



Charakterisierung von repräsentativen Tetrazyklin-resistenten *E. coli* Isolaten von Koriander

<i>E. coli</i> isolates	ST	Inc groups ^a	<i>bla</i> genes	Resistance and integrase genes	Antibiotic resistance profile ^b
EK2.1	0	FII ^l	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A)</i> , <i>qnrS</i>	AM, AMX, TE, CIP, OFX
EK2.5	0	I1 ^l	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A)</i> , <i>qnrS</i>	AM, AMX, TE, CIP
EK2.7	0	U ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intI1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, OFX
EK2.8	0	I1 ^l	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intI1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i>	AM, AMX, TE, S, TMP
EK2.11	0	I1 ^f	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A)</i>	AM, AMX, TE
EK2.15	0	I1 ^f	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A)</i> , <i>sul2</i>	AM, AMX, TE
EK2.16	0	N ^g	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>strA</i>	AM, AMX, TE, S
EK2.18	0	X1 ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>strA</i>	AM, AMX, TE, S
EK3.34	0	FII ^l	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intI1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>strA</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, NA, OFX
EK3.35	0	FII ^l	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A)</i> , <i>sul1</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, NA

^a: l: detected by RT-PCR and PBRT; f: detected by RT-PCR; g: detected by PCR; h: detected by PBRT.

^b: AM: Ampicillin; AMX: Amoxicillin; TE: Tetracycline; S: Streptomycin; TMP: Trimethoprim; SD: Sulfadiazine; CIP: Ciprofloxacin; OFX: Ofloxacin; NA: Nalidixic acid.

Charakterisierung von Tetrazyklin-resistenten *E. coli* Isolaten von Koriander

<i>E. coli</i> isolates	ST	Inc groups ^a	<i>bla</i> genes	Resistance and integrase genes	Antibiotic resistance profile ^b
EK2.2	0	U ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), sul2, strA, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, CIP, OFX
EK2.19	0	FII ^l	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), merRTΔP, sul2, aadA</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, D, GM, KM
EK2.20	0	HI1 ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), sul2, sul3, aadA, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, GM, OFX, C
EK2.21	0	X1 ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A)</i>	AM, AMX, TE, OFX
EK2.22	0	X1 ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), strA, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, OFX
EK2.25	0	U ^h , X1 ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), sul2, strA, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, CIP, OFX
EK2.26	0	U ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), sul1, aadA, qacEΔ1, strA</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, CIP, NA, OFX
EK2.29^k	0	N ^g	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>intl1, tet(A), sul1, strA, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, CRO, CTX, OFX, CIP
EK2.30	0	U ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), sul1, sul3, aadA, qnrS</i>	AM, AMX, TE, TMP, SD, C
EK3.33	0	X1 ^h	-	<i>intl1, sul1, strA</i>	TE, D
EK3.36	0	FIB ^l	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), merRTΔP, sul1, aadA</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, D, GM, KM
EK3.43^k	0	N ^g	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>tet(A), sul1, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, D, GM, CTX, OFX
EK3.44^k	7	N ^g	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>intl1, tet(A), merRTΔP, sul1, strA, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, CRO, CTX, C, NA, CIP, OFX
EK5.16	7	FII ^l , I1 ^f	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), aadA, qacEΔ1, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, D, OFX
EK5.19	7	X1 ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), sul2, strA, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, D, C
EK5.20	7	FII ^l , I1 ^f	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), aadA, qacEΔ1, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, OFX
EK5.25	7	FII ^l	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), qacEΔ1, qnrS</i>	AM, AMX, TE, TMP, OFX
EK5.28	7	FII ^l , I1 ^f	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), aadA, qacEΔ1, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, CIP, OFX
EK5.30	7	FII ^l , FIB ^l , I1 ^f	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), sul1, aadA, qacEΔ1, qnrS</i>	AM, AMX, TE, TMP, SD, D, CIP, NA, OFX
EK5.32	7	X1 ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), sul1, sul2, strA, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, OFX, C
EK5.40	7	X1 ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A), sul2, strA, qnrS</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, C
EK7.6	7	U ^h	<i>bla</i> _{TEM}	<i>intl1, tet(A)</i>	AM, AMX, TE, TMP, D

Charakterisierung von repräsentativen Tetracyclin-resistenten *E. coli* Isolaten

Gemischter Salat

<i>E. coli</i> isolates ^a	ST	Inc groups ^b	<i>bla</i> genes	Resistance and integrase genes	Antibiotic resistance profile ^c
M1 ^E	0	ND	<i>bla</i> _{TEM}	<i>int11, tet(A), sul1, sul2, qacEΔ1, strA, merRTΔP</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, D
M19 ^E	0	ND	<i>bla</i> _{TEM}	<i>int11, tet(A), sul1, sul2, qacEΔ1, strA</i>	AM, AMX, TE, S, TMP, SD, D

...open access: Blau et al., 2018, mBio
„The transferable resistome of produce“

Rucola

<i>E. coli</i> isolates ^a	ST	Inc groups ^b	<i>bla</i> genes	Resistance and integrase genes	Antibiotic resistance profile ^c
RE1 ^D	0	FII ^l	-	-	TE, D
RE4 ^D	0	I1	-	<i>int11, tet(A), sul3, aadA, merRTΔP</i>	TE, S, TMP, SD, D, CIP, NA
RE9 ^D	0	I1 ^l	-	<i>int11, tet(A), sul3, aadA, merRTΔP</i>	TE, S, TMP, SD, D, CIP, NA
RE10 ^D	0	I1 ^f	-	<i>int11, tet(A), sul3, aadA, merRTΔP</i>	TE, S, TMP, SD, D, CIP, NA
RE11 ^E	0	I1 ^f	-	<i>int11, tet(A), sul3, aadA, merRTΔP</i>	TE, S, TMP, SD, D, CIP, NA
RE14 ^E	7	FII ^l	-	-	TE, D
RE19 ^E	7	I1 ^f	-	<i>int11, tet(A), sul3, aadA, merRTΔP</i>	TE, S, TMP, SD, D, CIP, NA

^a: D: Direct plating; E: Enrichment.

^b: l: detected by RT-PCR and PBRT; f: detected by RT-PCR; g: detected by PCR; h: detected by PBRT.

^c: C: Chloramphenicol; AM: Ampicillin; AMX: Amoxicillin; TE: Tetracycline; S: Streptomycin; TMP: Trimethoprim; SD: Sulfadiazine; CIP: Ciprofloxacin; OFX: Ofloxacin; D: Doxycycline; GM: Gentamicin; NA: Nalidixic acid; ND: not detected.

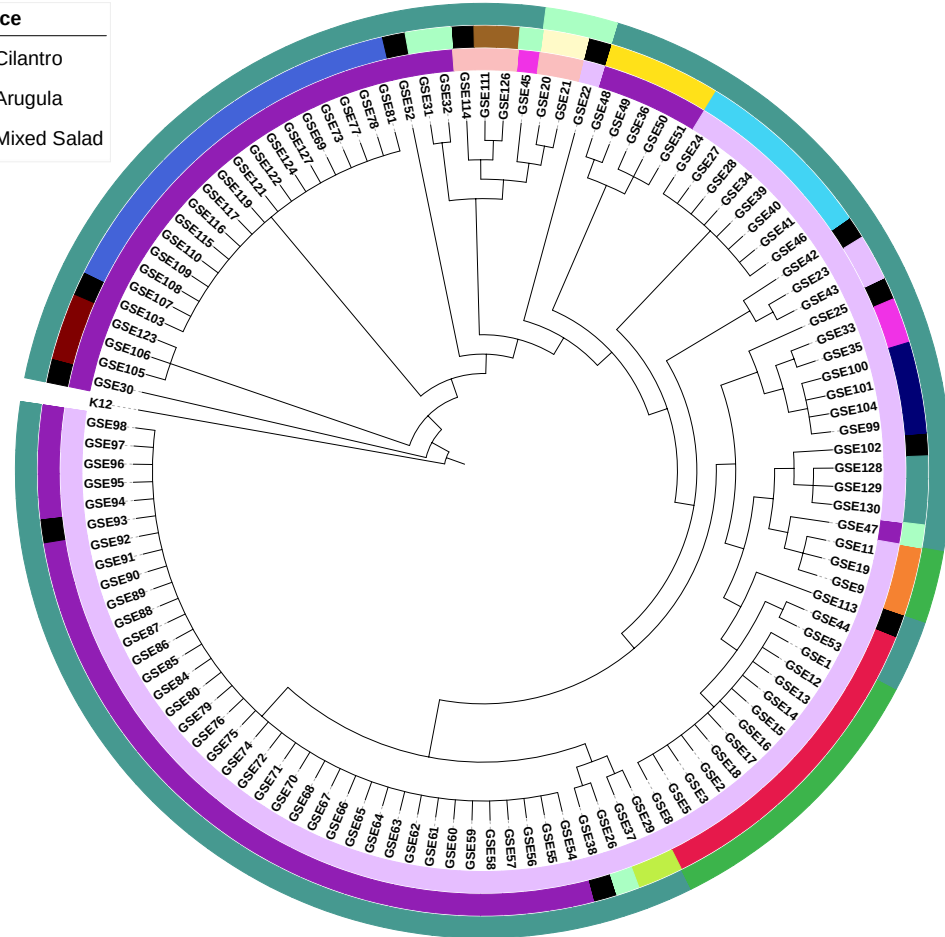
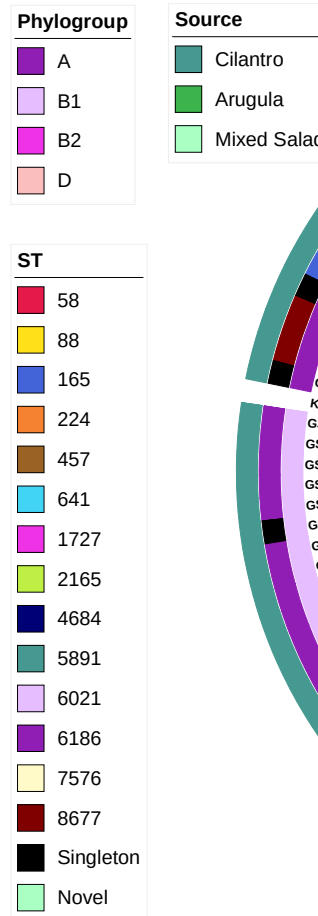
“Whole Genome Sequencing” (WGS) von 120 *E. coli* Isolaten von Frischeprodukten

Phylogruppe B1 dominiert
häufigsten STs:

6186, 165, 58, 641, 88

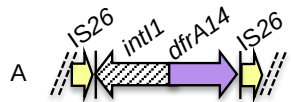
84/120 Stämmen trugen
Klasse 1 integrons (*intI1*)

ST58: 2 von 14 Stämmen
mit ESBL gene *bla*_{CTX-M15}

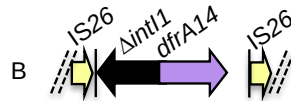


“Whole Genome Sequencing” (WGS) von 120 *E. coli* Isolaten von Frischeprodukten

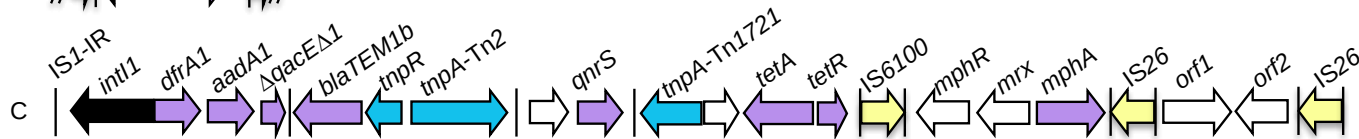
- Viele Klasse 1 integrons waren auch mit IS Elementen wie IS26 und verschiedenen ARGs assoziiert.
- Die Detektion der gleichen Integrons in *E. coli*- Stämmen verschiedener STs deutet auf HGT hin



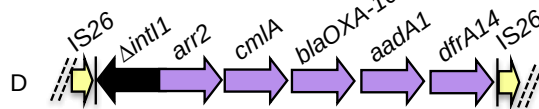
n=42; ST58, 88, 2165, 6186



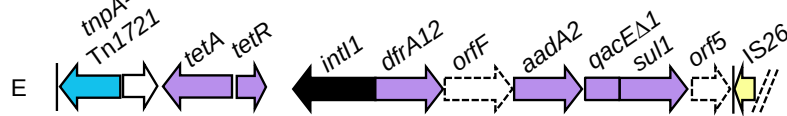
n=13; ST58, 641, 1704, 4684



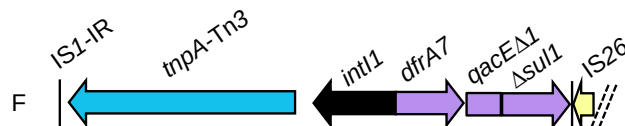
n=20; ST165, 457



n=1, ST1704



n=1, ST345

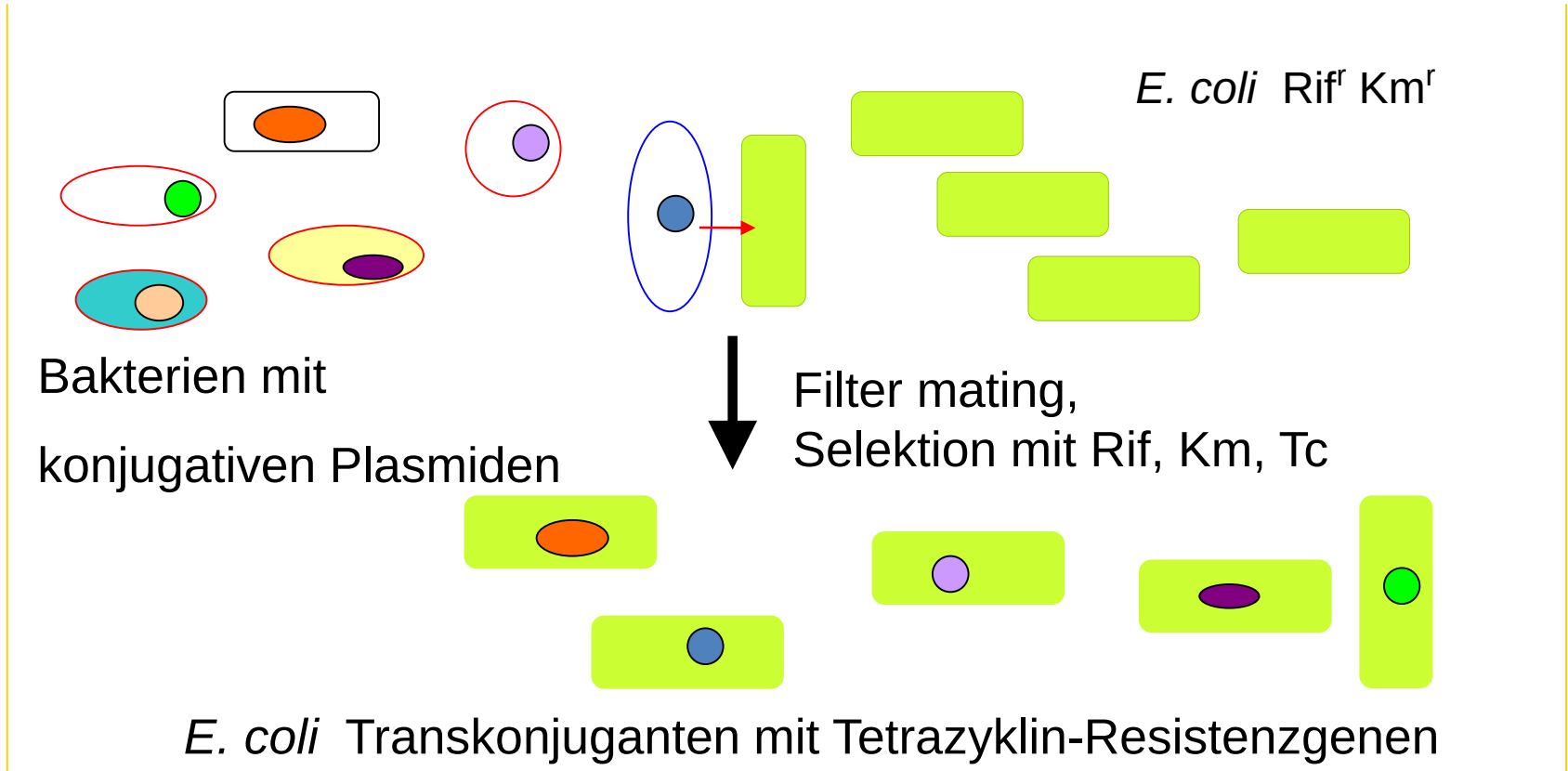


n=2, ST7576



n=3, ST224

Transfer von Antibiotikaresistenzgenen von Bakterien an Frischeprodukten



Charakterisierung von repräsentativen Tetrazyklin-resistenten *E. coli* CV601 Transkonjuganten von Frischeprodukten

TET ^R <i>E. coli</i> CV601 transconjugants	Sample source ^a	Inc groups ^b	<i>bla</i> genes	Resistance, integrase genes and IS ^c	Antibiotic resistance profile ^d
pBC1.1	Ci	P-1β^f	<i>bla</i> _{TEM}	<i>int11, tet(A), merRTΔP, qacEΔ1, IS1071</i>	TE, AM, AMX, D
pBC1.3	Ci	P-1β^f	-	<i>int11, tet(A), merRTΔP, qacEΔ1, IS1071</i>	TE, AM, AMX, D
pBC1.9	Ci	P-1β^f, FIIⁱ	<i>bla</i> _{TEM}	<i>int11, tet(A), merRTΔP, qacEΔ1, IS1071</i>	TE, AM, AMX, D
pBC1.12	Ci	P-1β^f, FIIⁱ	-	<i>int11, tet(A), merRTΔP, strA, qacEΔ1, IS1071</i>	TE, AM, AMX, D, S
pBC2.1	Ci	FIBⁱ	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A), sul1, qnrS</i>	TE, AM, AMX, D, CIP, NA, OFX, C
pBC2.2	Ci	FIBⁱ	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A), qnrS</i>	TE, AM, AMX, D, CIP, OFX
pBC2.3	Ci	FIBⁱ, I1^f	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A), qnrS</i>	TE, AM, AMX, D, CIP, OFX
pBC2.4	Ci	FIBⁱ	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A), sul2, qnrS</i>	TE, AM, AMX, D, CIP, NA, OFX
pBC2.6	Ci	FIBⁱ	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A), qnrS</i>	TE, AM, AMX, D, CIP, OFX, C
PBC2.8	Ci	FIBⁱ	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A), qnrS</i>	TE, AM, AMX, D, CIP, NA, OFX
pBC2.11	Ci	FIIⁱ	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A), qnrS</i>	TE, AM, AMX, D, CIP, OFX
pBC2.15	Ci	I1^{fi}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A), qnrS</i>	TE, AM, AMX, D, CIP, OFX
pBMS1	MS	FIIⁱ	<i>bla</i> _{TEM}	<i>int11, tet(Q), sul1, strA, merRTΔP</i>	TE, AM, AMX, D, TMP, C, S, SD
pBMS4	MS	FIIⁱ	<i>bla</i> _{TEM}	<i>int11, sul1, strA, merRTΔP,</i>	TE, AM, AMX, D, TMP, C, S, SD
pBA1	A	ND	<i>bla</i> _{TEM}	<i>tet(A)</i>	TE, AM, AMX, D, TMP, C, CIP
<i>E. coli</i> CV601 (R)	-	-	-	-	-

^a: Ci: Cilantro; MS: Mixed salad; A: Arugula.

^b: I: detected by RT-PCR and PBRT; f: detected by RT-PCR; ^c: IS, Insertion Sequence.

^d: C: Chloramphenicol; AM: Ampicillin; AMX: Amoxicillin; TE: Tetracycline; CIP: Ciprofloxacin; OFX: Ofloxacin; D: Doxycycline; NA: Nalidixic acid; TMP: Trimethoprim; SD: Sulfadiazine; ND: not detected.

Nachweis von IncF, I1, I2 Plasmiden, *intl1* und *tet(A)* in TC-DNA extrahiert aus Frischeprodukten direkt oder nach Anreicherung

Produce	DNA		IncF		IncI1		IncI2		<i>intl1</i>		<i>tet(A)</i>	
			qPCR	Blot	qPCR	Blot	qPCR	Blot	qPCR	Blot	qPCR	Blot
Mixed salad	Direct extraction	0	-	-	-	-	-	+++	+	(+++)	-	(++) ^{1*}
		7	-	-	-	-	-	+++	+	(+++)	-	(+++) ^{2*}
	Enrichment	0	+	(+++)	+	(++)	+	+++	+	(+++)	+	(++) ^{2*}
		7	+	(+++)	+	(++)	+	+++	+	(+++)	+	+++
Arugula	Direct extraction	0	-	-	-	-	-	(++) ^{3*}	+	(++)	-	(+++) ^{2*}
		7	-	-	-	-	-	(++) ^{1*}	+	(++)	-	(+++) ^{1*}
	Enrichment	0	+	(+++)	-	-	+	+++	+	(++)	+	+++
		7	+	(+++)	-	-	+	+++	+	(++)	+	+++
Cilantro	Direct extraction	0	-	-	-	-	-	-	(+) ^{1*}	(++)	(+) ^{1*}	(+++) ^{3*}
		7	(+) ^{1*}	(++) ^{2*}	-	-	-	-	(+) ^{3*}	(+++)	(+) ^{2*}	(+++) ^{3*}
	Enrichment	0	(+) ^{2*}	(+++) ^{2*}	(+) ^{1*}	(++) ^{2*}	-	-	(+) ^{3*}	(+++)	(+) ^{2*}	(+++) ^{3*}
		7	(+) ^{2*}	(+++) ^{2*}	(+) ^{2*}	(++) ^{2*}	-	-	(+) ^{3*}	(+++) ^{3*}	(+) ^{3*}	(+++) ^{3*}

(*): Number of positive replicates, -: Not detected or no signal, +: positive (qPCR), (++): Medium signal; (+++): Strong signal.

Faktoren, die das Mikrobiom und das übertragbare Resistom von Pflanzen beeinflussen

Pflanzenart und –sorte

Das Substrat (Bodentyp)

Beregnungsqualität

Nutzung organischer Dünger

Lagerung und Verarbeitung nach der Ernte: induzierte Mikrobiom-Verschiebungen

Zusammenfassung

- ➔ Das Mischen des Darmmikrobioms von Mensch (Klärschlämme) und Tier (Gülle und Gärreste) mit Bodenbakterien in Gegenwart von Nährstoffen und Selektionsdruck führt zum Wachstum von resistenten Populationen und stimuliert horizontalen Genaustausch.
- ➔ Organische Dünger tragen zu einem erhöhten Vorkommen von Bakterien mit transferablen Resistenzgenen im Boden und im Pflanzen-Mikrobiom bei
- ➔ Mobile genetische Elemente wie Plasmide helfen ihren bakteriellen Wirten sich schnell an sich verändernde Umweltbedingungen anzupassen
- ➔ Das Pflanzenmikrobiom ist ein Reservoir für transferable Resistenzgene z.B. für Bakterien im Darm sein

Organische Dünger aber auch behandeltes Abwasser enthalten wichtige Nährstoffe für Pflanzen und Mikroorganismen. Aber die enthaltenen Mikroschadstoffe und Bakterien mit transferablen Antibiotikaresistenzen stellen ein mögliches Risiko dar. Die Reduzierung bzw. noch besser die Entfernung solcher Mikroschadstoffe ist daher dringend geboten.

Herzlichen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



DFG FOR566, FOR5095, BMBF, DAAD, EU, UBA



Khald Blau



Sven Jechalke



Holger Heuer



Birgit Wolters



Sara Gallego



Kristin Hauschild



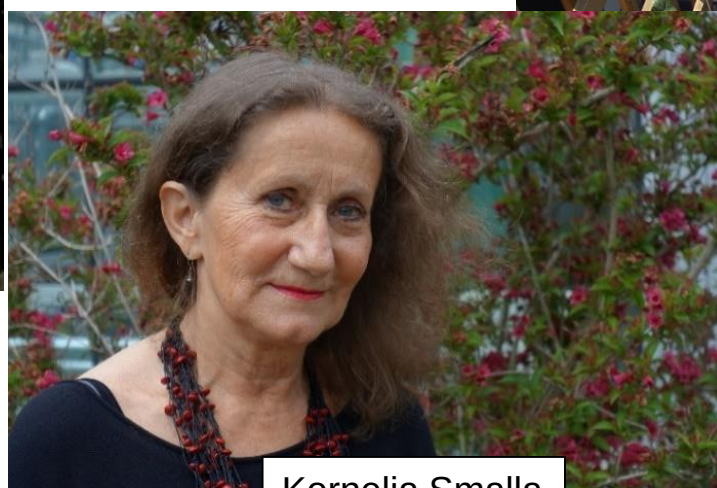
Ute Zimmerling



Ellen Krögerrecklenfort



Christoph Kopmann



Kornelia Smalla



Masaki Shintani

Plasmide können Resistenzen gegen verschiedene Verbindungen vermitteln

Class 1 integron

sul1 - sulfonamide

QacEΔ1 - quaternary ammonium compounds

aadA2 - streptomycin/spectinomycin

dfr - trimethoprim

pC15-1a cassette

tetA

tetR

TEM-1

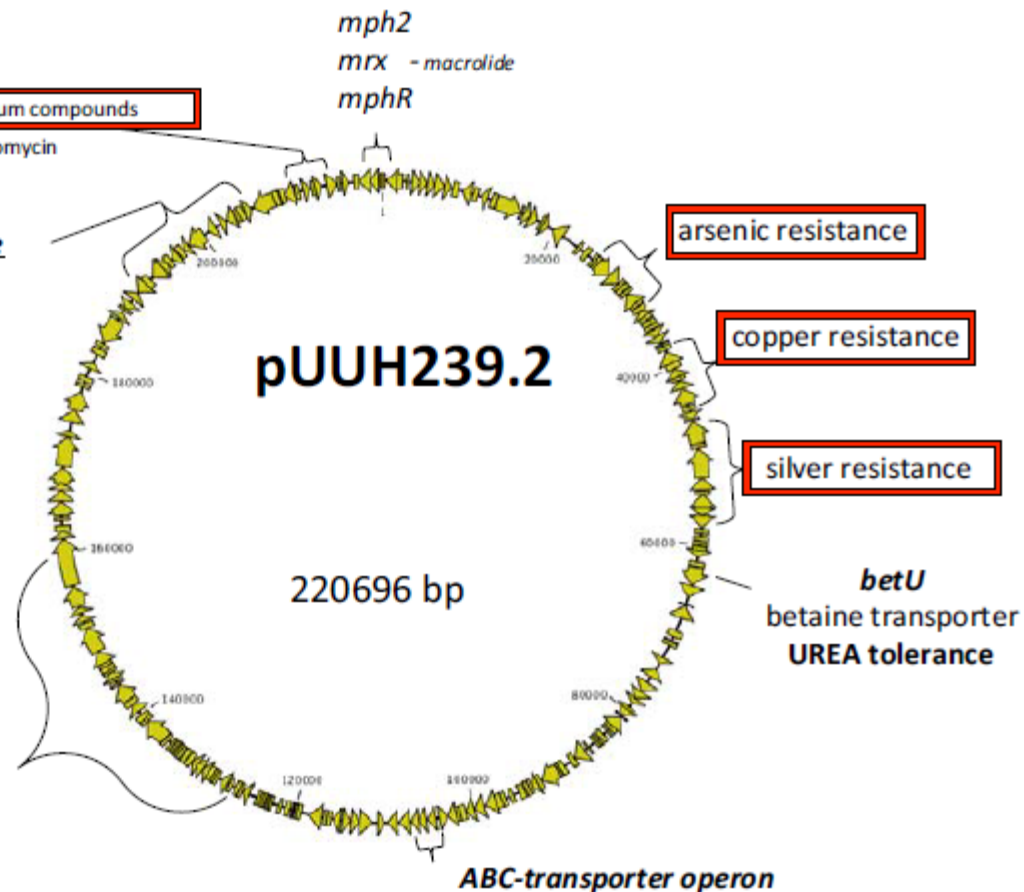
OXA-1

CTX-M-15

aac(6')-1b-cr

Multiple ARGs

Plasmid transfer



Gullberg et al. 2011

Courtesy of Chandan Pal