

Transfer von humanpathogenen Bakterien auf Salat und Gemüse bei biologischem Anbau

Andreas Hofmann

2014

Helmholtz Zentrum München

Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktionen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Eingereicht am 30.01.2014

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| 1. Gutachter / Prüfer: | Prof. Dr. Anton Hartmann |
| 2. Gutachter / Prüfer: | Prof. Dr. Dirk Schüler |
| 3. Gutachter / Prüfer: | Prof. Dr. Dirk Metzler |
| 4. Gutachter / Prüfer: | Dr. Thomas Ott |
| 5. Gutachter: | Prof. Dr. Heinrich Jung |
| 6. Gutachter: | Prof. Dr. Rainer Uhl |
- Mündliche Prüfung am 21.07.2014

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich ehrenwörtlich, dass meine Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt worden ist. Die vorliegende Dissertation wurde weder ganz, noch teilweise bei einer anderen Prüfungskommission vorgelegt. Ich habe noch zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

München, den _____ Andreas Hofmann _____

Publikationsliste

- Hofmann A, Fischer D, Hartmann A & Schmid M (2014) Colonization of plants by human pathogenic bacteria in the course of organic vegetable production. *Frontiers in Microbiology*; Volume: 5; Article: 191
- Fenzl C, Hackl E, Brankatschk K, Jäderlund L, Hofmann A, Arthurson V, Jensen AN, Wyss G, Rinnhofer T, Koller M, Friedel JK, Duffy B, Schmid M, Hartmann A & Sessitsch A; Incidence of human pathogenic bacteria in field vegetables fertilized with animal manures (in Vorbereitung)

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro (SI-Einheit)
&	und
Abb.	Abbildung
ad	auf
b	Base(n)
BHI	Hirn-Herz-Bouillon
BLEB	Gepufferte <i>Listeria</i> -Anreicherungsbouillon (buffered <i>Listeria</i> enrichment broth)
BPW	Gepuffertes Pepton-Wasser (buffered peptone water)
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CFU	Koloniebildende Einheiten (colony forming units)
CLSM	Konfokales Laser-Raster Mikroskop (confocal laser scanning microscope)
Cy3	5,5'-Disulfo-1,1'-(γ-carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolocarbo cyanin-N-hydroxysuccinimidester
Cy5	Cy5.18 Derivat, N-hydroxysuccinimidester
d	Tage (day)
dest.	Destiliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff (dissolved organic carbon)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> , und andere
EtOH	Ethanol

FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
Fluos	Fluorescein
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (green-fluorescent-protein)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Meter, milli (SI-Einheit)
M	Molar
min	Minuten
MQ	mehrfach destilliertes Wasser
MS	Murashige und Skoog
n	Nano (SI-Einheit)
N	Normal
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Nutrient-Broth
NFW	Nukleasefreies Wasser
OD	Optische Dichte
p	Piko
PBS	Phosphat gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat

sek.	Sekunde
sp.	Spezies
spp.	mehrere Spezies
ssp.	Subspezies
Std.	Stunden
sv.	Serovariation
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
U	Units, Einheiten
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of Amerika)
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
XLD	Xylose-Lysin-Deoxycholat
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung	12
A.1 Pathogene Bakterien auf Salat und Gemüsepflanzen	12
A.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	15
A.2.1 Taxonomie	15
A.2.2 Beschreibung.....	15
A.2.3 Pathogenese.....	16
A.2.4 Auf den Verzehr kontaminierter Pflanzen zurückzuführende Ausbrüche..	17
A.2.5 Besiedlung von Pflanzen	18
A.3 <i>Salmonella enterica</i>	18
A.3.1 Taxonomie	18
A.3.2 Beschreibung.....	19
A.3.3 Pathogenese.....	19
A.3.4 Auf den Verzehr kontaminierter Pflanzen zurückzuführende Ausbrüche..	20
A.3.5 Besiedlung von Pflanzen	21
A.4 Ziele dieser Arbeit	21
B Material und Methoden	23
B.1 Verwendete Puffer und Nährmedien.....	23
B.1.1 Puffer	23
B.1.2 Nährmedien zur Anzucht, Stammhaltung und selektiven Anreicherung von Bakterien.....	24
B.1.2.1 Flüssigmedien	24
B.1.2.2 Nährmedien für Agar-Platten zum Nachweis pathogener Bakterien ..	28
B.1.3 Medien zur Anzucht von Pflanzen	32
B.2 Verwendete Bakterienstämme	33
B.3 Verwendete Pflanzenarten.....	33

B.4 Inokulation von Pflanzen mit Bakterien	34
B.4.1 Anzucht der Bakterien	34
B.4.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> Serovarianten	34
B.4.1.2 <i>Salmonella enterica</i> ssp. Weltevreden	34
B.4.2 Axenisches (monoxenisches) System	35
B.4.3 Bodensystem	35
B.5 Probenahme und Aufbereitung	36
B.5.1 Probenahme von Hofdünger.....	36
B.5.2 Feldprobenahme von Salat- und Gemüsepflanzen.....	38
B.5.3 Probenahme inokulierter Pflanzen.....	39
B.6 Anreicherung pathogener Bakterien	40
B.6.1 Selektive Anreicherung von <i>Listeria</i> spp. und Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	40
B.6.2 Selektive Anreicherung von <i>Campylobacter</i> spp.	42
B.6.3 Anreicherung von <i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> und <i>Staphylococcus</i> spp.	42
B.7. Extraktion hochmolekularer DNA	43
B.7.1 Optimierung der DNA-Extraktion aus komplexen Proben.....	43
B.7.2 DNA-Extraktionsprotokoll.....	45
B.8 Molekularbiologischer Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i> und <i>Salmonella enterica</i>	45
B.8.1 Spezifische PCR zum Nachweis von <i>L. monocytogenes</i> und <i>S. enterica</i>	45
B.8.2 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	49
B.8.3 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	49
B.8.4 Sequenzierung der PCR-Produkte	50
B.8.5 Sequenzanalyse	50
B.9 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) und konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM).....	51
B.9.1 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung von Bakterien auf Pflanzenteilen.....	51

B.9.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie.....	53
B.10 Messung von Standardparametern der in Deutschland genommenen Proben von biologischen Düngern.....	54
B.10.1 Bestimmung des Trockengewichts	54
B.10.2 Herstellung von Extrakten und Messung des DOC.....	54
B.10.3 Bestimmung des pH-Wertes der Hofdüngerproben	55
B.10.4 Bestimmung des Gesamtstickstoffes.....	55
B.10.5 Bestimmung des Ammoniums	55
B.10.6 Bestimmung des Nitrats.....	55
B.10.7 Bestimmung des Phosphors	55
C Ergebnisse.....	56
C.1 Optimierung der DNA-Extraktion	56
C.2 Analyse der Hofdüngerproben	57
C.2.1 Chemische Analysen der in Deutschland genommenen Hofdünger- proben	58
C.2.2 Kultivierungsabhängiger Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i> aus den in Deutschland genommenen Hofdüngerproben	60
C.2.3 Molekularbiologischer Nachweis der analysierten pathogenen Bakterien aus allen untersuchten Hofdüngerproben	61
C.3 Feldproben von Salat- und Gemüsepflanzen.....	65
C.3.1 Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i> aus den in Deutschland genommenen Spinat- und Feldsalatproben	65
C.3.2 Molekularbiologischer Nachweis der analysierten pathogenen Bakterien aus allen untersuchten Feldproben von Salat- und Gemüsepflanzen	65
C.4 Inokulationsansätze im axenischen (monoxenischen) System.....	71
C.4.1 Nachweis einer Besiedlung der inokulierten Pflanzen mittels selektiver Anreicherung sowie spezifischer PCR	71
C.4.1.1 Inokulation mit <i>S. enterica</i> ssp. Weltevreden	71
C.4.1.2 Inokulation mit <i>L. monocytogenes</i> sv. 4b	74
C.4.1.3 Inokulation mit <i>L. monocytogenes</i> sv. 1/2a EGD-E	76

C.4.2 FISH-Analyse der inokulierten Pflanzen	78
C.4.2.1 Kolonisierung durch <i>S. enterica</i> ssp. Weltevreden	79
C.4.2.2 Kolonisierung durch <i>L. monocytogenes</i> sv. 4b	83
C.4.3 Inokulationsversuche mit GFP-markierten <i>L. monocytogenes</i> Stämmen .	85
C.5 Inokulationsansätze im Bodensystem.....	88
C.5.1 Nachweis einer Besiedlung der inokulierten Pflanzen mittels selektiver Anreicherung sowie spezifischer PCR	88
C.5.1.1 Kolonisierung durch <i>S. enterica</i> ssp. Weltevreden	89
C.5.1.2 Kolonisierung durch <i>L. monocytogenes</i> sv. 4b	93
C.5.1.3 Kolonisierung durch <i>L. monocytogenes</i> sv. 1/2a EGD-E.....	95
C.5.2 CLSM-Analysen der Inokulationsansätze im Bodensystem	96
D Diskussion	97
D.1 Methoden.....	97
D.1.1 Selektive Anreicherung.....	97
D.1.2 DNA-Extraktion.....	99
D.1.3 PCR-Nachweis	99
D.1.4 FISH und CLSM Analyse.....	100
D.2 Pathogenbelastung der untersuchten Hofdüngerproben	102
D.3 Pathogenbelastung der untersuchten Feldproben von Salat- und Gemüsepflanzen	104
D.4 Inokulationsversuche	106
D.4.1 Inokulationsversuche im axenischen System	106
D.4.1.1 <i>Salmonella enterica</i> ssp. Weltevreden	106
D.4.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	107
D.4.1.3 Zusammenfassung und Vergleich der Inokulationsansätze im axenischen System.....	108
D.4.2 Inokulationsversuche im Bodensystem	109
D.4.2.1 <i>Salmonella enterica</i> ssp. Weltevreden	109
D.4.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	110

D.4.2.3 Zusammenfassung und Vergleich der Inokulationsansätze im Bodensystem	112
D.5 Faktoren, die eine Besiedlung von Salat- und Gemüsepflanzen durch humanpathogene Bakterien beeinflussen können.....	113
D.5.1 Bakterienart	113
D.5.2 Pflanzenart	114
D.5.3 Art des verwendeten Hofdüngers	114
D.5.4 Schlussfolgerungen	115
E Zusammenfassung.....	117
F Summary	120
G Literatur	123
H Danksagung	136
I Lebenslauf.....	137

A Einleitung

Der Verzehr von Salat und Gemüse ist unerlässlich für eine gesunde Ernährung und wird von unterschiedlichen nationalen und internationalen Gesundheitsorganisationen neben der Versorgung mit Mineralien und Vitaminen auch zur Prävention von Krebs und Herz-Kreislaufkrankungen empfohlen (World Health Organization, 2003; Robert Koch Institut, 2011; United States Department of Agriculture, 2011). In den Jahren 1997-1999 konnte ein Anstieg des Konsums von Salat- und Gemüsepflanzen in den USA festgestellt werden, der in den folgenden Jahren auf annähernd gleichbleibendem Niveau blieb (Blanck *et al.*, 2008; Berger *et al.*, 2010). Die meisten dieser Lebensmittel werden roh oder minimal verarbeitet verzehrt, daher muss bei dem Anbau sowie bei den weiteren Schritten der Produktionskette dieser Nahrungsmittel darauf geachtet werden, Kontaminationen mit gesundheitsschädlichen Substanzen, Bakterien oder Viren zu vermeiden, um dem Endkonsument sichere Produkte zur Verfügung zu stellen.

A.1 Pathogene Bakterien auf Salat und Gemüsepflanzen

In den letzten Jahren konnte ein Anstieg von Ausbrüchen bakterieller Infektionen festgestellt werden, die auf den Verzehr von kontaminiertem Salat oder Gemüse zurückzuführen waren (Sivapalasingam *et al.*, 2004; Heaton & Jones, 2008). Zum Beispiel wurden in einem im Jahr 2010 veröffentlichtem Bericht des „Center of Disease Control and Prevention“ der USA bezüglich Nahrungsmittel assoziierter Krankheitsausbrüchen im Jahr 2007 der Verzehr von kontaminiertem Blattsalat und Gemüse als dritthäufigster Auslöser für diese Art von Erkrankungen genannt. Beispiele für solche Ausbrüche wurden für *Escherichia coli* Infektionen (Center of Disease Control and Prevention, 2006; Sodha *et al.*, 2011) und *Salmonella enterica* Infektionen (Koch *et al.*, 2005; Takkinen *et al.*, 2005; Emberland *et al.*, 2007) veröffentlicht. Ein sehr aktueller Fall von *E. coli* Infektionen in Deutschland konnte auf

den Verzehr von kontaminierten Bockshornklee-Keimlingen (Robert Koch Institut, 2011a) und ein Ausbruch von *Listeria monocytogenes* Infektionen in den USA auf den Verzehr kontaminierter Wassermelonen (Center of Disease Control and Prevention, 2011) zurückgeführt werden. Beide Ausbrüche resultierten in einer hohen Anzahl erkrankter sowie verstorbener Personen.

Als Ursprung der Kontamination von Salat und Gemüsepflanzen kommen mehrere Quellen in Frage. Zum Einen ist ein natürliches Vorkommen der Bakterien im Boden, im speziellen für *L. monocytogenes*, nicht auszuschließen. Somit ist eine Kontamination der Pflanzenblätter entweder über eine Verunreinigung mit kontaminiertem Boden oder nach primärer Besiedlung der Wurzel und Ausbreitung in oberirdische Pflanzenteile möglich.

Des Weiteren können Bakterien durch kontaminiertes Wasser beim Gießen der Pflanzen sowohl über den Boden und die Wurzel (Wachtel *et al.*, 2002) als auch über direkten Kontakt zwischen Wasser und den Blättern der Pflanzen auf diese übertragen werden.

Wildtiere sind ebenfalls ein mögliches Reservoir für humanpathogene Bakterien. So konnten *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. und pathogene *E. coli* in diversen Wildtierarten, unter anderem auch Vögeln, nachgewiesen werden (Palmgren *et al.*, 1997; Makino *et al.*, 2000; Refsum *et al.*, 2002; Handeland *et al.*, 2002; Millan *et al.*, 2004; Renter *et al.*, 2006; Hellström *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2010; Wacheck *et al.*, 2010; Doyle *et al.*, 2011; Vieira-Pinto *et al.*, 2011). Da viele der hierbei untersuchten Wildtierarten auf landwirtschaftlich genutzten Flächen in Kontakt mit dort angebauten Salat- und Gemüsepflanzen kommen können, ist eine Kontamination der Pflanzen durch diese Tiere möglich. Unterschiedliche Insektenarten konnten ebenfalls als Träger humanpathogener Bakterien identifiziert werden (Skov *et al.*, 2004) und werden daher ebenfalls als potentielle Überträger dieser Bakterien auf Salat- und Gemüsepflanzen gesehen (Beuchat & Ryu 1997).

Die Düngung der Pflanzen mit Gülle oder Mist stellt einen weiteren möglichen Ursprung einer Belastung von Salat- und Gemüsepflanzen mit humanpathogenen Bakterien dar. Hutchison *et al.* (2004a) konnten verschiedene dieser Bakterien in unterschiedlichen Hofdüngerproben nachweisen. Außerdem wurde festgestellt, dass

diese Bakterien einige Monate in Gülle und Mist überleben können (Wang *et al.*, 1996; Kudva *et al.*, 1998; Hutchison *et al.*, 2005). Falls kontaminierter Hofdünger bei dem Anbau von Salat und Gemüsepflanzen zum Einsatz kommt, kann wiederum eine Kontamination der Pflanzen durch direkten Kontakt mit dem Hofdünger oder über den Boden und die Wurzeln stattfinden.

Bei den weiteren Verarbeitungsschritten zwischen Ernte und Verzehr von Salat und Gemüsepflanzen ist ebenfalls eine Kontamination mit humanpathogenen Bakterien möglich. Zum Beispiel konnten bei einer Untersuchung von lebensmittelverarbeitenden Betrieben in Irland *L. monocytogenes* sowohl in Lebensmitteln als auch auf Böden, Wänden, Türgriffen und in Abflüssen der Betriebe nachgewiesen werden (O'Connor *et al.*, 2010). Ähnliches konnte in einer weiteren Studie für *S. enterica* gezeigt werden (Lettini *et al.*, 2011). Bakterien können außerdem auf Metalloberflächen, wie sie in den entsprechenden Betrieben zu finden sind, Biofilme bilden, wodurch sie vor vielen Desinfektionsmitteln geschützt sind (Sinde & Carballo, 2000).

Ziel des „PathOrganic“ EU-Projektes mit dem Titel „Risks and Recommendations regarding Human Pathogens in Organic Vegetable Production Chains“ war es, in Kooperation mit den Projektpartnern aus Österreich (ARC/BOKU Wien), Schweden (SLU Uppsala), Schweiz (FIBL Frick, ART Zürich, FAW Wädenswil), Dänemark (DFVF/RVAU Kopenhagen) sowie den Niederlanden (BFS Wageningen) durch Untersuchungen von Hofdünger- und Pflanzenproben ausgewählter landwirtschaftlicher Betriebe mögliche Kontaminationen mit den humanpathogenen Bakterien *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* und *Listeria monocytogenes* nachzuweisen. Chemische Analysen der Hofdüngerproben sollten zudem zeigen, ob ein Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern und der Kontamination mit zu untersuchenden Bakterien besteht. In Laborversuchen der einzelnen Projektpartner sollte zudem aufgeklärt werden, ob eine Übertragung der Bakterien vom Hofdünger über den Boden auf Salat- und Gemüsepflanzen möglich ist und welche Faktoren wie zum Beispiel Hofdüngerart, Düngungsregime, Zeit zwischen Ausbringen des Düngers und Einsetzen der Pflanzen, Pflanzenart oder Bakterienart eine Rolle für eine Kontamination dieser Pflanzen spielen. Diese Ergebnisse sollten dazu verwendet werden, mit Hilfe eines mathematischen Modells eine Einschätzung über

mögliche Risikofaktoren innerhalb der Produktionskette von Salat und Gemüse bis zur Pflanzenernte zu geben. Im Rahmen eines Workshops mit Vertretern von Landwirtschaftsverbänden und Regierungen der beteiligten Länder wurde abschließend eine Einschätzung der Risikofaktoren bezüglich der Kontamination von Salat- und Gemüsepflanzen mit humanpathogenen Bakterien abgegeben und Vorschläge unterbreitet, wie diese Risikofaktoren aus wissenschaftlicher Sicht minimiert werden können.

A.2 *Listeria monocytogenes*

A.2.1 Taxonomie

Phylum: *Firmicutes*, Klasse: *Bacilli*, Ordnung: *Bacillales*, Familie: *Listeriaceae*, Gattung: *Listeria*, Art: *Listeria monocytogenes*

Die Art *Listeria monocytogenes* ist unterteilt in Serovariationen, wobei *L. monocytogenes* sv. 4b und *L. monocytogenes* sv. 1/2b als Auslöser der meisten humanen Listeriose-Erkrankungen gelten.

A.2.2 Beschreibung

Listeria monocytogenes wurde erstmals 1911 von Hülphers in der Leber von Hasen entdeckt und als *Bacillus hepatis* beschrieben. 1926 wurde es in Hasen nachgewiesen und aufgrund des erhöhten Monocyten-Gehaltes des Blutes erkrankter Tiere *Bacterium monocytogenes* genannt (Murray *et al.*, 1926). Im Jahr 1927 wurde das Bakterium in Buschland-Nagetieren in Südafrika gefunden (Pirie, 1927). 1940 führte Pirie erst die Genus-Bezeichnung *Listerella* ein (Pirie, 1940a) und änderte sie in dem selben Jahr zu *Listeria* (Pirie, 1940b).

Bei *Listeria monocytogenes* handelt es sich um Gram-positive, coccoide Stäbchen mit einer Länge von ca. 0,5 - 2,0 μm und einer Breite von 0,4 – 0,5 μm , die manchmal wie parallele oder V-förmige Paare erscheinen. Unter Umständen können sie auch lange Stäbchen oder Filamente von 50 μm bis 100 μm bilden. Sie sind

mittels vier peritricher Flagellen beweglich. Die Vermehrung von *L. monocytogenes* kann bei niedrigen Temperaturen von bis zu 2,5°C sowie in einem pH-Bereich zwischen 4,4 und 9,4 und bei geringem Nährstoffangebot stattfinden (Seeliger & Jones, 1986). Aufgrund dieser Fähigkeit kommen sie in vielfältigen Habitaten natürlich vor. So konnten die Bakterien in Wasser (Botzler *et al.*, 1974; Dijkstra, 1982; Fenlon, 1985; Colburn *et al.*, 1990; Fenlon *et al.*, 1996), Boden (Welshimer & Donker-Voet, 1971; Watkins & Sleath, 1981) und wie oben beschrieben auch auf Pflanzen und in Wild- und Nutztieren nachgewiesen werden.

A.2.3 Pathogenese

Auslöser für Humaninfektionen mit *L. monocytogenes* ist meist der Verzehr kontaminierter Lebensmittel. In einem von der „US Food and Drug Administration“ 2003 veröffentlichten Bericht werden vor allem Wurstaufschnitt, Pasteten, Streichwurst, unpasteurisierte Milch, geräucherte Meeresfrüchte sowie gekochte und genussfertige Schalentiere als „Hoch-Risiko-Lebensmittel“ bezüglich dieses pathogenen Bakteriums eingestuft. Weitere Nahrungsmittel wie z.B. Obst und Gemüse, unterschiedliche Käsesorten und Speiseeis werden hierbei zwar als weniger risikoreich bewertet, deren Verzehr dennoch als mögliche Ursache für die Übertragung der Bakterien bezeichnet.

Die benötigte Infektionsdosis für Menschen ist nicht bekannt, wird aber als hoch eingeschätzt. Diese kann durch die Anfälligkeit bestimmter Personengruppen wie schwangeren, immunsupprimierten sowie älteren Menschen deutlich erniedrigt sein (Low & Donachie, 1997). Im Primaten-Modell, durchgeführt mit gesunden *Macaca fascicularis* (Langschwanzmakak) wurden Dosen von 10^9 Bakterienzellen benötigt, um Krankheitssymptome auszulösen (Farber *et al.*, 1991). Bei verschiedenen Ausbrüchen konnten Inkubationszeiten von 3 – 70 Tagen festgestellt werden. Die durchschnittliche Inkubationszeit liegt etwa bei drei Wochen (Allerberger & Wagner, 2010).

L. monocytogenes dringt hauptsächlich über die Darm-Mucosa in den Wirtskörper ein. Nach diesem Eintritt ist die Leber das erste Zielorgan, wo sich die Bakterien aktiv vermehren können (Ramaswamy *et al.*, 2007). Von dort aus werden über die Blutbahn sekundäre Zielorgane wie zum Beispiel das Gehirn oder die Plazenta

schwangerer Frauen besiedelt (Lorber, 1997). Bei all diesen Schritten wird die Immunantwort des Wirtes durch den intrazellulären Lebenszyklus dieser Bakterien, bestehend aus schnellem Entkommen aus dem Phagosom, schneller intrazytoplasmatischer Vermehrung, Actin-basierter Beweglichkeit, direkter Ausbreitung in benachbarte Zellen und der Möglichkeit in Makrophagen zu überleben umgangen (Ramaswamy *et al.*, 2007). Die klinischen Symptome der Listeriose können von fiebriger Gastroenteritis bei nicht invasivem Verlauf bis hin zu Sepsis und Meningoenzephalitis bei invasivem Verlauf reichen. Perinatale Listeriose wiederum kann zur Frühgeburt, Totgeburt sowie zu einer allgemeinen Infektion des Neugeborenen mit Sepsis oder Meningitis führen (Allerberger & Wagner, 2010). Hierbei wird die Plazentarbarriere von *L. monocytogenes* durchbrochen und es findet eine Übertragung der Bakterien von der infizierten Mutter auf den Fötus statt (Disson *et al.*, 2008). Die Mortalitätsrate bei Listeriose wird auf 20 - 30 % geschätzt (Allerberger & Wagner, 2010).

A.2.4 Auf den Verzehr kontaminierter Pflanzen zurückzuführende Ausbrüche

Einige Ausbrüche von Listeriose konnten auf den Verzehr kontaminierter Salat- und Gemüsepflanzen zurückgeführt werden. Ein Beispiel hierfür ist ein Ausbruch 1981 in Kanada, der durch kontaminierten Krautsalat ausgelöst wurde. Dies war zudem der erste dokumentierte Fall, bei dem ein Nahrungsmittel eindeutig als Ursprung der Erkrankung identifiziert werden konnte (Schlech *et al.*, 1983). Bei einem früheren Ausbruch 1979 in mehreren Krankenhäusern in Boston war dies nicht möglich. Die möglichen Quellen konnten jedoch auf Sellerie oder Salat, die roh verzehrt wurden, eingeschränkt werden (Ho *et al.*, 1986). Ein weiteres Beispiel ist der Listeriose-Ausbruch im August und September 2011 in den USA, der auf kontaminierte Wassermelonen zurückzuführen war (Center of Disease Control and Prevention, 2011). Zudem konnten bei einigen Erkrankungen von Einzelpersonen kontaminierte Salat- und Gemüsepflanzen als Quelle identifiziert werden (Farber & Peterkin, 1991). Aufgrund der langen Inkubationszeit bis zum Ausbruch der Krankheit konnten jedoch viele Ausbrüche und Einzelerkrankungen nicht eindeutig auf ein kontaminiertes Lebensmittel zurückgeführt werden (McLauchlin, 1996), wodurch eine große Zahl unaufgeklärter Fälle besteht.

A.2.5 Besiedlung von Pflanzen

L. monocytogenes konnte bisher schon auf vielen Arten von Salat- und Gemüsepflanzen wie z.B. Tomaten, Kohl und Kartoffeln nachgewiesen werden (Farber & Peterkin, 1991; Beuchat, 1996). In Laborversuchen wurde das Kolonisierungsverhalten der Bakterien auf verschiedenen Pflanzen untersucht. So konnten Jablasone *et al.* (2005) feststellen, dass nach Inokulation der Pflanzensamen von Karotte, Kresse, Spinat, Kopfsalat und Tomate mit *L. monocytogenes* die Bakterien die entsprechenden Keimlinge zwar besiedelt haben, jedoch nicht im Inneren der Pflanzen nachgewiesen werden konnten. Ähnliches wurde von Kutter *et al.* (2006) für Gerste im axenischen System festgestellt. Die Pflanzen wurden sowohl an der Wurzel als auch am Spross von *L. monocytogenes* besiedelt, innerhalb der Pflanzen wurden sie allerdings nicht nachgewiesen. Des Weiteren konnte von Dreux *et al.* (2007) festgestellt werden, dass die Bakterien auf Petersilienblättern eine gewisse Zeit überleben können. Ein Absenken der Umgebungsluftfeuchtigkeit von 100% zu 45% führt jedoch zu einer rascheren Abnahme der Bakterienzahl. Die Ergebnisse früherer Untersuchungen zum Besiedlungsverhalten von *L. monocytogenes* auf Salat- und Gemüsepflanzen wurden bei Beuchat (1996) sowie Farber und Peterkin (1991) zusammengefasst.

A.3 Salmonella enterica

A.3.1 Taxonomie

Phylum: *Proteobacteria*, Klasse: *Gammaproteobacteria*, Ordnung: *Enterobacteriales*,
Familie: *Enterobacteriaceae*, Gattung: *Salmonella*, Art: *Salmonella enterica*

Die Art *Salmonella enterica* ist unterteilt in Unterarten/Subspezies und Serovare.

A.3.2 Beschreibung

Die Bakterien wurden erstmals 1874 von Tadeusz Browicz entdeckt, der diese als Ursache für Typhuserkrankungen beschrieb (Browicz, 1874). Im Jahr 1880 entdeckte Karl Joseph Eberth den Erreger von Typhus abdominalis und beschrieb die Besiedlung verschiedener Organe durch die Bakterien (Eberth, 1880). Georg Gaffky gelang es 1884 erstmals, *Salmonella enterica* aus den Leichen an Typhus verstorbener Personen zu isolieren (Gaffky, 1884). 1886 wurden die Bakterien von Daniel E. Salmon und Theobald Smith beschrieben und später *Salmonella cholerae-suis* genannt (Salmon & Smith, 1886). Lignieres übernahm diesen Namen im Jahr 1900 für das Genus der Bakterien (Lignieres, 1900).

Bei *Salmonella enterica* handelt es sich um Gram-negative Stäbchen. Sie sind meist beweglich mittels peritricher Flagellen. Sie sind fakultativ anaerob sowie aerob. Das Wachstum findet auf Medien ohne spezielle Wachstumsfaktoren statt und Citrat kann als C-Quelle verwendet werden (Le Minor & Rhode, 1986). Die Träger der Bakterien sind Wild- sowie Haustiere und der Mensch (Krtinić *et al.*, 2010). Von diesen Trägern aus kann eine Kontamination von Wasser und Boden mittels Fäkalverunreinigung direkt sowie über Düngung mit kontaminiertem Mist oder Gülle stattfinden (Berger *et al.*, 2010). Nicholson *et al.* konnten 2005 nachweisen, dass *S. enterica* in der Lage ist, in Wasser und in Boden, der mit kontaminiertem Hofdünger gedüngt wurde, längere Zeit zu überleben.

A.3.3 Pathogenese

Auslöser für eine Humaninfektion mit *S. enterica* ist die Aufnahme kontaminierter Nahrung oder verunreinigten Wassers (Ohl & Miller, 2001). Eine exakte Aussage über die benötigte Infektionsdosis der Bakterien ist nicht möglich. Es gibt jedoch Angaben, dass diese, abhängig von *Salmonella enterica* Subspezies bzw. Serovariation und dem Gesundheitszustand des Patienten, zwischen ca. 10^3 und 10^6 Bakterienzellen liegt (Blaser & Newman, 1982; Xu *et al.*, 2010). Die Inkubationszeit bis zum Ausbruch der Krankheit beträgt durchschnittlich ca. 12 - 72 Stunden.

Bei einer Infektion durchdringt *Salmonella enterica* die Mucus-Schicht des Dünndarms, um zu den Darmepithelzellen vorzudringen und sich an diese

anzuheften (Ohl & Miller, 2001). Anschließend dringen die Bakterien mittels bakteriell vermittelter Endocytose in diese Zellen ein (Francis *et al.*, 1992). In dem so entstandenen modifizierten Phagosom können die Bakterien überleben und sich vermehren (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). Nach dem Durchdringen der Darmepithelzellen können die Salmonellen von Makrophagen aufgenommen werden, wo sie wiederum innerhalb eines Phagosoms persistieren (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994). Die Migration infizierter Phagozyten zu anderen Organen des reticuloendothelialen System des Wirtes kann zu einer Infektion dieser Organe wie beispielsweise Milz, Lymphknoten oder Knochenmark und somit einer systemischen Salmonellose führen (Ohl & Miller, 2001). Klinische Symptome der Erkrankung sind Fieber, Bauchschmerzen, Erbrechen, Durchfall oder Verstopfung und gelegentlich Hautausschlag. Ohne Behandlung liegt die Mortalitätsrate zwischen 10 und 15 % (Ohl & Miller, 2001). Zusätzlich können Menschen auch asymptomatische Träger der Bakterien sein und somit zu einer Verbreitung der Krankheit beitragen (Krtinić *et al.*, 2010).

A.3.4 Auf den Verzehr kontaminierter Pflanzen zurückzuführende Ausbrüche

S. enterica war in den USA 2002 - 2007 der häufigste Auslöser von Erkrankungen, die auf den Verzehr kontaminierter Nahrung zurückgeführt werden konnten. Der größte Ausbruch dieses Zeitraumes mit 802 dokumentierten Erkrankungen wurde durch mit *S. enterica* kontaminiertem Hummus (Kichererbsenpüree) ausgelöst (Center of Disease Control and Prevention, 2010). Hanning *et al.* (2009) haben Ausbrüche von *S. enterica* in den USA, die auf den Verzehr von kontaminierten Salat- und Gemüsepflanzen zurückzuführen waren, zusammengefasst. Eine Vielzahl unterschiedlicher Pflanzenarten konnten hierbei als Ursprung des jeweiligen Ausbruchs identifiziert werden. In Deutschland wurde zuletzt Ende 2011 bis Anfang 2012 ein Ausbruch beobachtet, der durch den Verzehr kontaminierter Melonen oder Mungbohnen-Keimlingen ausgelöst wurde (Robert Koch Institut, 2012).

A.3.5 Besiedlung von Pflanzen

Aufgrund der oben genannten hohen Anzahl von *S. enterica* Infektionen, die auf den Verzehr von Salat- und Gemüsepflanzen zurückzuführen sind, wurden viele Untersuchungen zur Kolonisierung von Pflanzen durch die Bakterien durchgeführt. Bei direkter Inokulation von Salat- oder Tomatenblättern konnte folgendes festgestellt werden: *S. enterica* kann sich auf der Oberfläche von Salatblättern, vor allem auf jungen, vermehren (Brandl & Amundson, 2008); die Bakterien sind in der Lage auf Blattoberflächen Biofilme zu bilden, allerdings bevorzugt an verletzten Stellen (Kroupitski *et al.*, 2009); eine interne Pflanzenbesiedlung kann über geöffnete Stomata stattfinden (Kroupitski *et al.*, 2009); eine Übertragung der Bakterien von kontaminierten Tomatenblättern auf die Frucht ist möglich (Barak *et al.*, 2011). Versuchsansätze im axenischen System zeigten, dass eine endophytische Besiedlung von Gerstenwurzeln (Kutter *et al.*, 2006) sowie von Salatpflanzen mit bis zu $4,4 \times 10^4$ CFU pro Pflanze möglich ist (Klerks *et al.*, 2007). Diese Kolonisierung ist vom untersuchten Pflanzenkultivar und *S. enterica* Serovar abhängig (Klerks *et al.*, 2007). In der Natur angenäherten Topfversuchen mit jeweils kontaminiertem Boden, Wasser oder Hofdünger konnten die Bakterien in Wurzel- und Sprossproben nachgewiesen werden (Arthurson *et al.*, 2011; Barak *et al.*, 2011; Klerks *et al.*, 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl Häufigkeit der Kontamination als auch das Auftreten endophytischer Besiedlung der Pflanzen von dem eingesetzten *S. enterica* Serovar abhängig sind (Franz *et al.*, 2007; Klerks *et al.*, 2007). Diese und weitere Forschungsergebnisse wurden beispielsweise von Berger *et al.* (2010), Brandl (2006) und Krtinić *et al.* (2010) zusammengefasst und deuten darauf hin, dass *S. enterica* in der Lage ist, Salat- und Gemüsepflanzen sehr gut zu besiedeln und somit eine Gefahr für potentielle Ausbrüche, die auf den Verzehr dieser Pflanzen zurückzuführen sind, besteht.

A.4 Ziele dieser Arbeit

Im Laufe der hier vorgestellten Arbeit sollten die im Rahmen des Gesamtprojektes (siehe S.13) genommenen Hofdünger- und Pflanzenproben mittels PCR-gestützter

Nachweismethoden auf eine Kontamination mit *Listeria monocytogenes* hin untersucht werden.

Begleitende Inokulationsversuche sollten im axenischen System mit Feldsalat und Spinat sowie den Bakterienstämmen *Salmonella enterica* ssp. Weltevreden, *L. monocytogenes* sv. 4b und *L. monocytogenes* EGD-E sv.1/2a durchgeführt werden. Der Fokus der Untersuchungen lag hierbei auf der minimalen Inokulationsdosis, bei der eine Besiedlung der Pflanzenwurzel und des Pflanzensprosses durch die eingesetzten Bakterienstämme noch nachweisbar ist. Eine genaue Lokalisierung der Bakterien auf oder im Pflanzengewebe mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) sollte durchgeführt werden. Mögliche Pflanzenart- oder Bakterienstamm-abhängige Unterschiede bei der Besiedlung der Pflanzen sollten analysiert werden.

Spinat und Feldsalat wurde in Topfversuchen mit landwirtschaftlich genutztem Boden und unter Düngung mit Gülle oder Stallmist, die mit den obengenannten Bakterienstämmen in bestimmten Konzentrationen versetzt wurden, angesetzt. In diesem, der Natur angenäherten System, sollte untersucht werden, wie viele der jeweiligen pathogenen Bakterien im eingesetzten Dünger vorhanden sein müssen, damit eine Übertragung dieser Bakterien auf Wurzel bzw. Spross der Pflanzen stattfindet.

Ein zusätzlich eingefügter Waschschrift bei den Probenahmen der inokulierten bzw. in den Topfversuchen angezogenen Pflanzen und ein anschließender Nachweis der eingesetzten Bakterien in der Waschflüssigkeit sollte zeigen, ob nur eine leichte oberflächliche Besiedlung der Pflanze vorlag und die Bakterien durch den Waschschrift entfernt werden konnten.

Insgesamt sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche dazu dienen, mögliche Faktoren beim Anbau von Salat und Gemüsepflanzen zu identifizieren, die einen Einfluss auf deren Besiedlung durch humanpathogene Bakterien haben. Dies kann dabei helfen, durch einfache Maßnahmen das Risiko einer Kontamination des Produktes schon in dem landwirtschaftlichen Betrieb zu minimieren und somit die Sicherheit der in die weitere Verarbeitung gehenden Lebensmittel zu erhöhen.

B Material und Methoden

B.1 Verwendete Puffer und Nährmedien

Alle mit * gekennzeichneten Nährmedien, Puffer oder Stoffe wurden zur Sterilisation in einem Wasserdampfhochdruckautoklaven (Systec DX-65, V-65, V-150, Systec GmbH, Wettberg, Deutschland) bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 min behandelt. Informationen zur Zusammensetzung und Wirkungsweise der verwendeten Puffer und Nährmedien, wurden den jeweiligen Herstellerangaben entnommen.

Die pH-Werte der Puffer und Nährmedien wurden mit Hilfe eines „inoLab® ph720“ (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland) bestimmt und mit NaOH-, oder HCl-Lösungen der entsprechenden Verdünnungen und Normalität auf die angegebenen Werte eingestellt.

B.1.1 Puffer

*1x Phosphat gepufferte Saline PBS** (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland):

Tab. B.1: Zusammensetzung von 1x PBS

Natriumchlorid	137,00 mM
Kaliumchlorid	2,70 mM
Gesamt Phosphat (200 mM NaH ₂ PO ₄ , 200 mM Na ₂ HPO ₄)	12,00 mM
pH	7,40

100x *Tris-Acetat-EDTA-Puffer TAE-Puffer** (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland):

Tab. B.2: Zusammensetzung von 100x TAE-Puffer

Trisbase	4,00 M
Natriumacetat	1,00 M
EDTA (0,5 M)	0,10 M
pH	8,00 mit Eisessig einstellen

B.1.2 Nährmedien zur Anzucht, Stammhaltung und selektiven Anreicherung von Bakterien

Nutrient-Broth No 4 NB* (Fluka, Buchs, Schweiz):

Tab. B.3: Zusammensetzung von NB-Medium für die Anzucht von Bakterien

Pepton aus Fleisch	5,00 g
Fleisch Extrakt	3,00 g
Agar-Agar (für NB-Agarplatten)	13,00 g
pH	7,00
H ₂ O _{dest.}	ad 1l

B.1.2.1 Flüssigmedien

Hirn-Herz-Bouillon BHI* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland):

Tab. B.4: Zusammensetzung von BHI-Medium für die Anzucht von Bakterien

Nährsubstrat (Hirnextrakt, Herzextrakt, Pepton)	27,50 g
D(+)-Glukose	2,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Di-Natriumhydrogenphosphat	2,50 g
Agar-Agar (zum Verfestigen des Nährmediums für BHI-Agarplatten)	13,00 g
pH	7,40
H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

Gepuffertes Pepton-Wasser BPW* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland):

Tab. B.5: Zusammensetzung von BPW-Medium für die Anzucht und Anreicherung von Bakterien

Pepton aus Casein	10,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Di-Natriumhydrogenphosphat x12 H ₂ O	9,00 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,50 g
pH	7,00
H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

Bolton-Selektiv-Medium mit Selektiv-Supplement* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland):

Bolton-Selektiv-Medium enthält Nährstoffe um die Erholung sublethal geschädigter *Campylobacter*-Zellen zu fördern. Zudem wird durch die im Bolton-Selektiv-Supplement enthaltenen Stoffe das Wachstum anderer Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien sowie von Hefen und Pilzen verhindert (Herstellerangaben).

5 ml Bolton-Selektiv-Supplement wurden aseptisch zu 500 ml sterilem, auf 45 – 50°C abgekühltem Bolton-Selektiv-Medium gegeben.

Tab. B.6: Zusammensetzung von Bolton-Selektiv-Medium für die selektive Anreicherung von *Campylobacter* spp.

Pepton aus Fleisch	10,00 g
Lactalbuminhydrolysat	5,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
α-Ketoglutar säure	1,00 g
Natriumpyruvat	0,50 g
Natriummetabisulphit	0,50 g
Natriumcarbonat	0,60 g
Haemin	0,01 g
pH	7,40
H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

Tab. B.7: Zusammensetzung von Bolton-Selektiv-Supplement für die selektive Anreicherung von *Campylobacter* spp.

Vancomycin	10,00 mg
Cefoperazon	10,00 mg
Trimethoprim	10,00 mg
Amphotericin B 5	5,00 mg
EtOH 50%	Zugabe von 5 ml

Gepuffertes Listeria-Anreicherungsbouillon mit Selektiv-Supplement BLEB* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland):

Durch die in gepuffertem *Listeria*-Anreicherungsbouillon enthaltenen Stoffen Acriflavin, Cycloheximid und Nalidixinsäure wird das unerwünschte Wachstum von anderen Bakterien- und Pilzen weitgehend unterdrückt. Zusätzlich unterstützt Natriumpyruvat die Erholung von sublethal geschädigten *Listeria*-Zellen (Herstellerangaben).

Die Zugabe des *Listeria*-Selektiv-Anreicherungs-Supplementes erfolgt 2 Stunden nach dem Animpfen der Anreicherungskultur. Hierbei werden 0,5 ml des Supplementes aseptisch zu 250 ml der BLEB Anreicherungskultur gegeben.

Tab. B.8: Zusammensetzung von BLEB-Medium für die selektive Anreicherung von *Listeria* spp.

Tryptisches Soja Medium	30,00 g
Hefeextrakt	6,00 g
Di-Natriumhydrogenphosphat	9,60 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,35 g
Natriumpyruvat	1,10 g
pH	7,30
H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

Tab. B.9: Zusammensetzung von Listeria-Selektiv-Anreicherungs-Supplement für die selektive Anreicherung von *Listeria* spp.

Acriflavin HCL	5,00 mg
Cycloheximid	25,00 mg
Nalidixinsäure (Natriumsalz)	20,00 mg
H ₂ O _{dest.} *	Zugabe von 1 ml

*FRASER Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon** mit *Selektiv-Supplement* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland):

Durch den hohen Nährstoffgehalt und die starke Pufferkapazität des *FRASER Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillons* werden ideale Wachstumsbedingungen für Listerien geschaffen. Zusätzlich wird das Wachstum anderer Bakterien durch die enthaltenen Stoffe Lithiumchlorid, Nalidixinsäure und Acriflavin gehemmt. Des Weiteren ist auch der Nachweis der β -D-Glucosidaseaktivität von Listerien durch Esculin und das Ammonium-Eisen-(III)-Citrat möglich. Hierbei wird Esculin in Esculetin und Glucose gespalten. Esculetin formt daraufhin einen oliv-grünen bis schwarzen Komplex mit den Eisen-(III)-Ionen, was schließlich zu einer Schwarzfärbung des Mediums bei Anwesenheit von Listerien führt (Herstellerangaben).

Um das im Laufe dieser Arbeit verwendete Halb-*FRASER-Bouillon* herzustellen, wurden 1 ml *FRASER Listeria-Ammonium-Eisen-(III)-Supplement* und 1 ml *FRASER Listeria-Selektiv-Supplement* aseptisch zu 1 l sterilem und auf 50°C abgekühltem *FRASER Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon* gegeben.

Tab. B.10: Zusammensetzung von FRASER *Listeria*-Selektiv-Anreicherungsbouillon zur selektiven Anreicherung von *Listeria* spp.

Proteose-Pepton	5,00 g
Caseinpepton	5,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
Fleischextrakt	5,00 g
Natriumchlorid	20,00 g
Di-Natriumhydrogenphosphat	9,60 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,35 g
Esculin	1,00 g
Lithiumchlorid	3,00 g
pH	7,20
H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

Tab. B.11: Zusammensetzung von FRASER *Listeria*-Ammonium-Eisen-(III)-Supplement zur selektiven Anreicherung von *Listeria* spp.

Ammonium-Eisen-(III)-Citrat	250 mg
H ₂ O _{dest.} *	Zugabe von 1 ml

Tab. B.12: Zusammensetzung von FRASER *Listeria*-Selektiv-Supplement zur selektiven Anreicherung von *Listeria* spp.

Acriflavin	6,25 mg
Nalidixinsäure	5,00 mg
H ₂ O _{dest.} *	Zugabe von 1 ml

B.1.2.2 Nährmedien für Agar-Platten zum Nachweis pathogener Bakterien

Xylose-Lysin-Deoxycholat-Agar XLD (Fluka, Buchs, Schweiz):

In XLD-Medium hemmt das Deoxycholat das Wachstum Gram-positiver Bakterien. Zusätzlich dient die Xylose zur Unterscheidung zwischen anderen enteropathogenen Bakterien und denen der Gattung *Shigella*, den einzigen nicht Xylose fermentierenden enteropathogenen Keimen. Der Komplex Natriumthiosulfat-Eisen-

Ammoniumcitrat führt durch das Ausfallen von Ammonium-Eisen-(III)-Citrat (H₂S-Produktion) zu Kolonien mit einem schwarzen Zentrum (Herstellerangaben).

Tab. B.13: Zusammensetzung von XLD-Agar für die Isolierung Gram-negativer enteropathogener Bakterien

Hefeextrakt	3,00 g
Laktose	7,50 g
Sucrose	7,50 g
Xylose	3,50 g
L-Lysine Hydrochlorid	5,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Ammonium-Eisen-(III)-Citrat	0,80 g
Natriumthiosulfat	6,80 g
Natriumdeoxycholate	2,50 g
Phenolrot	0,08 g
Agar-Agar	15,0 g
pH	7,40
H ₂ O _{dest.} *	ad 1 l

*Oxford-Listeria-Selektiv-Agar** mit *Selektiv-Supplement* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland):

Das Wachstum von Gram-negativen sowie den meisten Gram-positiven Bakterien wird im *Oxford-Listeria-Selektiv-Agar* durch Lithiumchlorid und durch die Inhaltsstoffe des *Oxford-Listeria-Selektiv-Supplementes* gehemmt. Zusätzlich führt die bei FRASER *Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon* beschriebene Reaktion von Esculin mit Ammonium-Eisen-(III)-Citrat zu braun-grünen *Listeria*-Kolonien mit schwarzem Hof (Herstellerangaben).

5 ml *Oxford-Listeria-Selektiv-Supplement* werden aseptisch zu 500 ml sterilem und auf 50°C abgekühltem *Oxford-Listeria-Selektiv-Agar* gegeben.

Tab. B.14: Zusammensetzung von Oxford-*Listeria*-Selektiv-Agar für die Isolierung und den Nachweis von *Listeria* spp.

Pepton	23,00 g
Stärke	1,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Agar-Agar	13,00 g
Esculin	1,00 g
Ammonium-Eisen-(III)-Citrat	0,50 g
Lithiumchlorid	15,00 g
pH	7,00
H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

Tab. B.15: Zusammensetzung von Oxford-*Listeria*-Selektiv-Supplement für die Isolierung und den Nachweis von *Listeria* spp.

Cycloheximid	200,00 mg
Colistinsulfat	10,00 mg
Acriflavin	2,50 mg
Cefotetan	1,0 mg
Fosfomycin	5,00 mg
EtOH 50%	Zugabe von 5 ml

*Palcam-Listeria-Selektiv-Agar** mit *Selektiv-Supplement* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland):

Bei *Palcam-Listeria-Selektiv-Agar* hemmen die Stoffe Polymyxin, Acriflavin, Cefotetan und Lithiumchlorid das Wachstum Gram-negativer und der meisten Gram-positiven Bakterien. Die oben beschriebene Reaktion von Esculin mit Ammonium-Eisen-(III)-Citrat führt zur Bildung schwarzer *Listeria*-Kolonien. Mannitol positive Bakterien wie zum Beispiel Staphylokokken wachsen zu gelben Kolonien, falls sie nicht gehemmt werden (Herstellerangaben).

5 ml *Palcam-Listeria-Selektiv-Supplement* werden aseptisch zu 500 ml sterilem und auf 50°C abgekühltem *Palcam-Listeria-Selektiv-Agar* gegeben.

Tab. B.16: Zusammensetzung von Palcam-*Listeria*-Selektiv-Agar für die Isolierung und den Nachweis von *Listeria* spp.

Pepton	23,00 g
Hefeextrakt	3,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Phenolrot	0,08 g
D(-)Manitol	10,00 g
Ammonium-Eisen(III)-Citrat	0,50 g
Esculin	0,80 g
Glucose	0,50 g
Lithiumchlorid	15,00 g
Agar-Agar	13,00 g
pH	7,20
H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

Tab. B.17: Zusammensetzung von Palcam-*Listeria*-Selektiv-Supplement für die Isolierung und den Nachweis von *Listeria* spp.

Polymyxin-B-Sulfat	5,00 mg
Ceftazidim	10,00 mg
Acriflavin	2,50 mg
H ₂ O _{dest.} *	Zugabe von 1 ml

5 ml Palcam-*Listeria*-Selektiv-Supplement werden aseptisch zu 500 ml sterilem und auf 50°C abgekühltem Palcam-*Listeria*-Selektiv-Agar gegeben.

Rapid L.mono Medium (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland):

Für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* wurde *Rapid L.mono Medium* eingesetzt. Dieses wurde in Form von gebrauchsfertigen Petrischalen vom Hersteller bezogen. Die Differenzierung der *Listeria*-Arten erfolgt mittels der PIPLC- (Phosphatidylinositol Phospholipase C) Aktivität, bei der eine Blaufärbung der Bakterienkolonien zu erkennen ist, sowie der Xylose-Fermentation, die zu einem gelben Hof um die Kolonien führt. *Listeria monocytogenes* bildet auf diesem Medium

blaue Kolonien ohne gelben Hof (PIPLC+/Xylose-), *L. ivanovii* blaue Kolonien mit gelben Hof (PIPLC+/Xylose-) und alle anderen *Listeria*-Arten weiße Kolonien mit oder ohne gelben Hof (PIPLC+/Xylose+/-).

B.1.3 Medien zur Anzucht von Pflanzen

Murashige und Skoog Medium MS-Medium* (Sigma-Aldrich® Co., St. Louis, USA):

Tab. B.18: Zusammensetzung von MS-Medium für die Anzucht von Pflanzen

Ammoniumnitrat	1,65 g
Borsäure	6,20 mg
Kalziumchlorid	332,20 mg
Kobaltchlorid x 6 H ₂ O	0,025 mg
Kupfersulfat x 5 H ₂ O	0,025 mg
Na ₂ -EDTA	37,26 mg
Eisensulfat x 7 H ₂ O	27,80 mg
Magnesiumsulfat	180,70 mg
Mangansulfat x H ₂ O	16,90 mg
Molybdänsäure	0,25 mg
Kaliumjodid	0,83 mg
Kaliumnitrat	1,90 g
Kaliumphosphat	170,00 mg
Zinksulfat x 7 H ₂ O	8,60 mg
pH	7,40
H ₂ O _{dest.}	ad 1 l

B.2 Verwendete Bakterienstämme

Tab. B.19: Im Laufe dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme; (1) TUM: Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie; (2) SLCC: Special *Listeria* Culture Collection, Würzburg; (3) Stammsammlung des Zoonoselaboratorium, DTU-FOOD, Dänemark; (4) Bubert *et al.* (1999)

Stamm	Referenz	Gentechnische Veränderung
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-E sv. 1/2a	TUMLis18 ⁽¹⁾	
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-E sv. 1/2a pSOD GFP	TUMLis18 ⁽¹⁾⁽⁴⁾	GFP- Markierung
<i>Listeria monocytogenes</i> sv. 4b	SLCC4013 ⁽²⁾	
<i>Listeria monocytogenes</i> sv. 4b pSOD-GFP	SLCC4013 ⁽²⁾⁽⁴⁾	GFP- Markierung
<i>Salmonella enterica</i> ssp. Weltevreden	2007-60-3289-1 ⁽³⁾	

B.3 Verwendete Pflanzenarten

Für die Inokulationsansätze im axenischen (monoxenischen) System, sowie für die Versuche im Bodensystem wurde Spinat (*Spinacia oleracea*) der Varietät „Butterflay“ und Feldsalat (*Vallerianella locusta*) der Varietät „Verte á ceour plein 2“ verwendet. Alle Samen sind für den biologischen Anbau zertifiziert und wurden von der Firma „Bingenheimer Saatgut AG“ (Echzell-Bingenheim, Deutschland) bezogen.

Vor der Auskeimung und dem Einpflanzen wurden die Samen nach dem Protokoll von Michael Rothbaler *et al.* (2003) mit Modifikationen mittels 70% EtOH und 13 % Natriumhypochlorit oberflächensterilisiert. Nach Inkubationsschritten für 2 min in 1% Tween 80 und anschließend für 2 min in 70% EtOH wurden die Samen 3 -mal mit sterilem H₂O_{dest.} gewaschen und anschließend für 20 min in ca. 13% Natriumhypochloritlösung inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten mit sterilem H₂O_{dest.} folgten Inkubationen für 4 Std. in sterilem H₂O_{dest.} und für 10 min in 13% Natriumhypochloritlösung. Es folgten weitere 5-6 Waschschriffe in sterilem H₂O_{dest.}. Anschließend wurden die Samen auf NB-Agarplatten (B.1.2) verteilt und für 3 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur zur Überprüfung der Oberflächensterilität sowie zur

Keimung inkubiert. Gekeimte Pflanzen, die nach visueller Prüfung weder mit Bakterien noch mit Pilzen kontaminiert waren, wurden für die weiteren Versuche verwendet.

B.4 Inokulation von Pflanzen mit Bakterien

B.4.1 Anzucht der Bakterien

B.4.1.1 *Listeria monocytogenes* Serovarianten

Die verwendeten *Listeria monocytogenes* Serovariationen wurden aus einer Vorkultur in Halb-FRASER-Bouillon angeimpft und über Nacht bei 30°C in flüssigem BHI-Medium (B.1.2) angezogen. Es folgte eine Zellernte bei 6000 rpm für 10 min in einer Zentrifuge 5471R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet in 1x PBS (B.1.1) aufgenommen. Anschließend wurde die optische Dichte mit Hilfe eines Photometers (CE 3021, Cecil Instruments Ltd., Cambridge, UK) bei einer Wellenlänge von 435 nm photometrisch bestimmt und durch Verdünnen der Bakteriensuspension mit 1x PBS auf 0,84 eingestellt, was einer Zelldichte von ca. 4×10^8 CFU/ml entsprach. Dies wurde in Vorversuchen ermittelt und bei den einzelnen Ansätzen mittels Plattenverdünnungsreihen der Bakteriensuspension überprüft.

B.4.1.2 *Salmonella enterica* ssp. Weltevreden

Salmonella enterica ssp. Weltevreden wurde über Nacht bei 37°C in BPW-Medium (B.1.2) angezogen. Nach der Zellernte bei 6000 rpm für 10 min wurde der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet in 1x PBS resuspendiert. Mit Hilfe eines Photometers wurde die OD bei einer Wellenlänge von 435 nm durch Verdünnen der Bakteriensuspension auf 0,79 eingestellt, was einer Zelldichte von ca. 4×10^8 CFU/ml entspricht. Dies wurde in Vorversuchen ermittelt und bei den einzelnen Ansätzen mittel ausplatieren von Verdünnungen der Bakteriensuspension überprüft.

B.4.2 Axenisches (monoxenisches) System

Spinat- und Feldsalatsamen wurden für die Inokulationsansätze im axenischen (monoxenischen) System, wie unter Punkt B.3 beschrieben, vorbehandelt und zur Keimung gebracht. Ausgekeimte und augenscheinlich nicht mit Bakterien oder Pilzen belastete Samen wurden mit verschiedenen Verdünnungen von 4×10^1 bis 4×10^6 CFU/ml der unter Punkt B.2 genannten Bakterien inokuliert. Die Samen wurden dabei für 1 h in der entsprechenden Bakteriensuspension inkubiert und anschließend in ein steriles Quarzsandsystem, bestehend aus sterilen „Phytatray II“-Boxen (Sigma-Aldrich® Co., St. Louis, USA) mit ca. 20 ml autoklaviertem und getrocknetem Quarzsand (Körnung: 2 - 3,5 mm), gepflanzt.

Nach 3 Wochen Wachstum in einer Phytokammer unter den in Tab. B.20 zusammengefassten Bedingungen erfolgte die unter 5.3 beschriebene Probenahme in Triplikaten.

Tab. B.20: Wachstumsbedingungen für die Pflanzen

Luftfeuchtigkeit	50%
Tageslänge	14 h
Nachtlänge	10 h
Tagestemperatur	23°C
Nachttemperatur	18°C
Lichtintensität	$360 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (= $78 \text{ W}/\text{m}^2$)

B.4.3 Bodensystem

Für die Ansätze im Bodensystem wurden Gülle (Tab. B.21, Probe G02SC) und Stallmist (Tab. B.21, Probe G01MC), sowie Ackerboden vom Versuchsgut des Helmholtz Zentrums München in Scheyern verwendet. In Vorversuchen wurden Gülle, Mist und Ackerboden auf eine Kontamination mit Salmonellen und *Listeria monocytogenes* hin untersucht. Beide Bakterienarten konnten, nach Anwendung der unter Punkt B.6 und Punkt B.8 beschriebenen Methoden, nicht nachgewiesen werden.

Die verwendeten Bakterien wurden wie unter Punkt B.4.1.1 und Punkt B.4.1.2 beschrieben angezogen und die gewünschte Zelldichte mit 1x PBS eingestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zum jeweils verwendeten biologischen Dünger gegeben. Die Konzentrationen betragen hierbei 4×10^5 , 4×10^6 , 4×10^7 und 4×10^8 CFU/ml Gülle oder CFU/mg Stallmist. Es wurden 500 g Ackerboden mit 100 ml $H_2O_{\text{dest.}}$ und 20 g des vorbereiteten Stallmistes oder 30 ml der vorbereiteten Gülle gemischt und in Pflanztöpfe (Pöppelmann GmbH & Co. KG, Lohe, Deutschland) gefüllt. Die eingesetzte Hofdüngermenge entspricht hierbei den in der Landwirtschaft üblichen angewendeten Mengen (2-4 kg Mist/m² bzw. 3-6 l Gülle/m²; persönliche Mitteilung: Martin Koller, FIBL, Frick, Schweiz). Die Endkonzentration im Boden betrug daher für die Ansätze mit Gülle $2,4 \times 10^4$, $2,4 \times 10^5$, $2,4 \times 10^6$ oder $2,4 \times 10^7$ CFU/g, sowie für die Ansätze mit Stallmist $1,6 \times 10^4$, $1,6 \times 10^5$, $1,6 \times 10^6$ oder $1,6 \times 10^7$ CFU/g. Ansätze mit Hofdünger der nicht mit Bakterien versetzt wurde, dienten als Negativkontrolle.

Nach 3 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur in einem Minigewächshaus (Edm. Romberg & Sohn GmbH & Co. KG, Ellerau, Deutschland) wurden oberflächensterilisierte Pflanzenkeimlinge (B.3) in die Töpfe gepflanzt. Pro Bakterien-Verdünnungsstufe wurden 3 Töpfe mit jeweils 4 Pflanzenkeimlingen angesetzt. Nach 4 Wochen Wachstum in einer Phytokammer unter den in Tab. B.20 zusammengefassten Bedingungen erfolgte die unter Punkt B.5.3 beschriebene Probenahme von jeweils 5 Pflanzen pro Inokulationsstufe.

B.5 Probenahme und Aufbereitung

B.5.1 Probenahme von Hofdünger

Im Rahmen des gesamten „PathOrganic“ EU-Projektes wurden 151 Hofdüngerproben von unterschiedlichen Landwirten aus Österreich, Dänemark, Deutschland, Schweiz und Schweden genommen. Hierfür wurde von allen beteiligten Kooperationspartnern ein standardisiertes Protokoll verwendet.

Flüssiger Hofdünger wurde direkt aus dem jeweiligen Lagerungstank genommen. Mit Hilfe von bereits installierten oder mobilen Einrichtungen wurde die Gülle vor der

Probenahme von den Landwirten für mindestens eine Stunde gemischt. Mit sterilen Behältnissen wurden drei mal 1 l Probe von unterschiedlichen Stellen des Lagerungstanks genommen und anschließend zusammengefasst. Die Probe wurde gerührt, ca. 2 l in sterile PET Weithalsflaschen gefüllt, gekühlt in ein Labor transportiert und dort bei 4°C für die unter Punkt B.6 beschriebenen Anreicherungen oder bei -20°C für die unter Punkt B.10 beschriebenen chemischen Analysen gelagert.

Bei den Probenahmen von festem Hofdünger wurden 10 kg Probematerial unter sterilen Bedingungen von verschiedenen Tiefen und unterschiedlichen Stellen des jeweiligen Lagerplatzes genommen und zusammengefasst. Nach dem Mischen der Probe wurde ca. 2 kg Material unter sterilen Bedingungen verpackt, gekühlt in ein Labor verbracht und dort unter den zuvor beschriebenen Bedingungen bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Tabelle B.21 fasst alle in Deutschland genommenen Hofdüngerproben zusammen. Alle hier dargestellten Proben stammen aus der Rinderhaltung.

Tab. B.21: In Deutschland genommene Hofdüngerproben; Genaue Ortsangaben und Namen der landwirtschaftlichen Betriebe sind in der Abteilung für Mikroben-Pflanzen Interaktionen des Helmholtz Zentrums München hinterlegt

Probe	Hofdünger Art
G01MC	Stapelmist, 3 Monate gelagert
G02SC	Gülle, 6 Monate gelagert
G03SC	Gülle, fermentiert, 6-8 Wochen
G04MC	Stapelmist, 1 Jahr gelagert
G05MC	Stapelmist, 1-3 Monate gelagert
G06MC	Stallmist, keine Lagerung
G07MC	Stallmist, keine Lagerung
G08SC	Gülle, 0-3 Monate gelagert
G09MC	Mist, kompostiert, 3 Monate gelagert

B.5.2 Feldprobenahme von Salat- und Gemüsepflanzen

Im Rahmen dieses Versuches wurden in Österreich, Dänemark, Deutschland, Schweiz und Schweden jeweils 3 Felder, die mit Feldsalat, Kopfsalat, Romanasalat, Eisbergsalat oder Spinat bepflanzt waren, beprobt. Diese Felder waren mit dem zuvor analysierten und auf die gesuchten Bakterien positiv getesteten Hofdünger behandelt worden. Für die Probenahme wurde von allen Kooperationspartnern ein standardisiertes Protokoll verwendet.

Es wurden jeweils 500 Pflanzen geerntet und unter sterilen Bedingungen verpackt. Es wurde darauf geachtet, die Wurzelanteile bei der Ernte komplett zu entfernen. Die Pflanzen wurden anschließend gekühlt transportiert und sofort verarbeitet. Dabei wurden jeweils 10 Pflanzen zu einer Probe zusammengefasst. Die Pflanzen wurden mit Leitungswasser gespült, um anhaftenden Boden zu entfernen, anschließend mit Hilfe eines „Universalzerkleinerer UZ 3861“ (Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland) nach Zugabe von 1 ml/g Pflanzenmaterial 1x PBS homogenisiert. Aufgrund der 1 : 1 Verdünnung des Pflanzenmaterials wurden jeweils 50 g der Probe für die unter Punkt B.6 beschriebenen Anreicherungen der gesuchten Bakterien eingesetzt.

Tabelle B.22 fasst die in Deutschland genommenen Proben mit dem jeweils verwendeten Hofdünger zusammen.

Tab. B.22: In Deutschland genommene Pflanzenproben

Probenahme	Pflanze	Pflanzen Anzahl	Verwendeter Hofdünger
1	Spinat	250	G01MC
		250	G02SC
3	Spinat	390	G08SC
4	Feldsalat	500	G08SC

B.5.3 Probenahme inokulierter Pflanzen

Die Probenahme der Inokulationsansätze im axenischen (monoxenischen) sowie im Bodensystem wurden nach demselben Protokoll durchgeführt. Hierbei erfolgte die Pflanzenernte unter sterilen Bedingungen. Die Pflanze wurde geerntet und Wurzel und Spross getrennt. Daraufhin folgte ein Waschschritt in 30 ml 1x PBS. Die einzelnen Pflanzenteile wurden anschließend in 1 ml 1x PBS pro 100 mg gemörsert und 1 ml davon zum Animpfen der jeweiligen Anreicherung verwendet.

Zusätzlich wurde 1x PBS, welches zum Waschen des jeweiligen Pflanzenteiles verwendet wurde, nach diesem Schritt weiter untersucht. Hierfür wurde bei dieser Waschflüssigkeit eine Zellernte für 10 min bei 6000 rpm durchgeführt. Das entstandene Pellet wurde in 2 ml 1x PBS resuspendiert und anschließend 1 ml dieser Suspension zum Animpfen der jeweiligen Anreicherung (B.6) verwendet.

Die Durchführung der Probenahme wird in Abb. B.1 schematisch zusammengefasst.

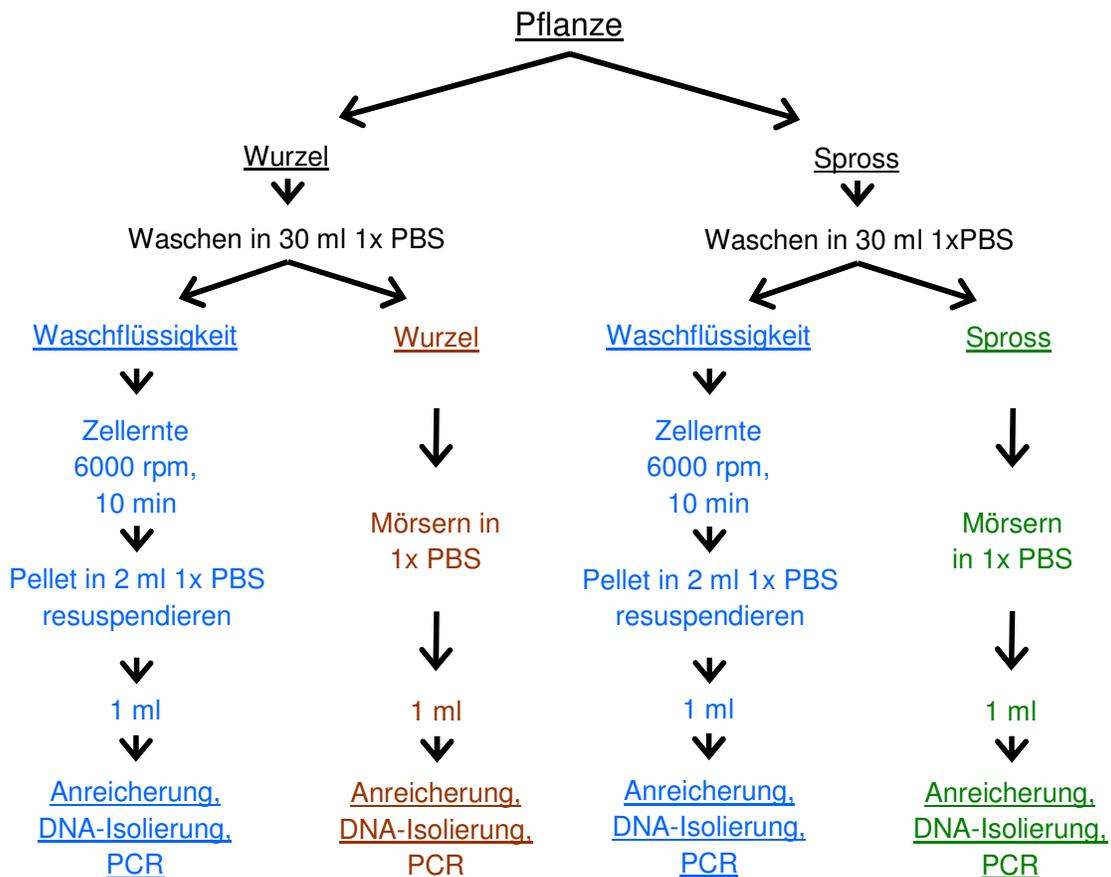


Abb. B.1: Durchführung der Probenahme inokulierter Pflanzen

Zusätzlich zu den in Abb. B.1 gezeigten Arbeitsschritten wurden vor dem Waschen der Pflanzenteile Fixierungen für eine spätere FISH-Analyse (B.9) angefertigt. Hierfür wurden Stücke von Wurzel und Spross mit einem sterilen Skalpell (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) abgetrennt und anschließend, abhängig von den inokulierten Bakterien, in 4% PFA oder 1 : 1 EtOH/PBS nach dem in Punkt 9.1 beschriebenen Protokoll fixiert.

B.6 Anreicherung pathogener Bakterien

B.6.1 Selektive Anreicherung von *Listeria* spp. und Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Der kultivierungsabhängige mikrobiologische Nachweis von Listerien und *Listeria monocytogenes* im speziellen mittels selektiver Anreicherung erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden 225 ml BLEB (B.1.2) mit 25 g Probenmaterial (Bzw.: 50 g, siehe B.5.2) angeimpft. Bei den Anreicherungen der Proben aus den Inokulationsansätzen (B.5.3) wurden aufgrund des geringen Probenvolumens 9 ml Medium mit 1 ml Probe angeimpft. Nach einer Vorinkubation von 2 h bei 30°C wurden 0,5 ml des *Listeria*-Selektiv-Anreicherungssupplements (B.1.2) aseptisch hinzugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation bei 30°C. Nach 24 h, 48 h und 7 Tagen wurden jeweils Subkulturen angelegt. Hierfür wurden jeweils 10 ml Halb-FRASER-Bouillon (B.1.2) mit 0,1 ml der ersten Anreicherungskultur angeimpft und bei 37°C aerob inkubiert. Nach jeweils 24 h und 48 h erfolgte der kulturelle Nachweis von *Listeria* spp. indem mit einer sterilen Impföse Verdünnungsausstriche aus dem Halb-FRASER-Bouillon auf Oxford- und Palcam-Platten (B.1.2) angefertigt wurden. Oxford-Agarplatten wurden bei 30°C und Palcam-Agarplatten bei 37°C für 48 h inkubiert. Wenn ein Wachstum von schwarzen Kolonien und somit ein Nachweis von *Listeria* spp. zu sehen war, wurde ein weiterer Verdünnungsausstrich auf Rapid´L.mono Medium (B.2.1) angefertigt. Dieses Medium ermöglicht nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37°C die Identifikation von *Listeria monocytogenes* mittels der in Punkt B.2.1 beschriebenen Blau-Färbung der Kolonien, die diese Bakterienspezies charakteristisch hervorruft. Bei den Inokulationsansätzen im axenischen System wurde auf die Verwendung des Rapid´L.momo Mediums

Protokoll ebenso für die Probenahme von Hofdünger (B.5.1) sowie die Feldprobenahme von Salat- und Gemüsepflanzen (B.5.2) von allen beteiligten Projektpartnern durchgeführt.

B.6.2 Selektive Anreicherung von *Campylobacter* spp.

Die selektive Anreicherung von *Campylobacter* spp. wurde für die Probenahme von Hofdünger (B.5.1) sowie die Feldprobenahme von Salat und Gemüsepflanzen (B.5.2) durchgeführt. Dabei wurden 225 ml Bolton-Selektivmedium (B.1.2) mit 25 g Probenmaterial (bzw. 50 g, siehe B.5.2) angeimpft. Nach einer Inkubation von 4-6 h bei 37°C gefolgt von 42 h bei 41,5°C erfolgte eine Zellernte von 2 ml der Anreicherungskultur bei 6000 rpm für 10 min. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml 1x PBS resuspendiert und anschließend bei -20°C bis zur DNA-Extraktion gelagert. Diese Arbeitsschritte wurden von allen beteiligten Projektpartnern für die in dem jeweiligen Land genommenen Proben durchgeführt. Der molekularbiologische Nachweis von *Campylobacter* spp. wurde von den schwedischen Projektpartnern durchgeführt. Hierbei diente das *mapA*-Gen, welches für ein Lipoprotein der äußeren Zellwand dieser Bakterien kodiert (Stucki *et al.*, 1995) als Ziel-DNA für den spezifischen Nachweis mittels PCR.

B.6.3 Anreicherung von *Salmonella* spp., *Escherichia coli* und *Staphylococcus* spp.

Salmonella spp., *E. coli* und *Staphylococcus* spp. wurden in gepuffertem Pepton-Wasser (BPW) (B.1.2) angereichert. Hierfür wurden 225 ml BPW mit 25 g Probenmaterial (Bzw.: 50 g, siehe B.5.2) angeimpft. Für die Anreicherungen der Proben aus den Inokulationsansätzen (B.5.3) wurden aufgrund des geringen Probenvolumens 9 ml Medium mit 1 ml Probe angeimpft. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurde eine Zellernte von 2 ml der Anreicherungskultur bei 6000 rpm für 10 min durchgeführt. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml 1x PBS resuspendiert und anschließend bis zur DNA-Extraktion, bzw. bis zum direkten PCR-Nachweis (B.8) für alle Proben aus den Inokulationsversuchen im axenischen System bei -20°C gelagert. Diese Arbeitsschritte wurden für die Probennahme von Hofdünger sowie die

Feldprobenahme von Salat- und Gemüsepflanzen von den beteiligten Partnern für die in den jeweiligen Ländern genommenen Proben durchgeführt. Der molekularbiologische Nachweis von *Staphylococcus* spp. wurde von den Österreichischen Projektpartnern durchgeführt. Hierfür wurde das *nuc*-Gen, welches für die thermostabile Nuklease dieser Bakterien codiert, mittels spezifischer PCR nachgewiesen (Tucker *et al.*, 1978). Für den molekularbiologischen Nachweis von humanpathogenen *E. coli* durch die schweizer Projektpartner wurden mehrere Gene verwendet. Die Gene *stx1* und *stx2* Shigatoxin-bildender *E. coli* Stämme (O'Brien & Holmes, 1987), das für *E. coli* O157 spezifische *rfbE* O157-Gen (Bilge *et al.*, 1996) und das für das Membranprotein Intimin kodierende und für enteropathogene (EPEC) sowie enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) spezifische *eae*-Gen (Donnenberg *et al.*, 1993) wurden mittels PCR nachgewiesen. Der Nachweis von *Salmonella* spp. in Hofdüngerproben sowie Feldproben von Pflanzen wurde von den schweizer Projektpartnern wie in B.8.1 dargestellt durchgeführt.

Bei der Probennahme der Inokulationsansätze wurde zusätzlich noch ein weiterer Anreicherungsschritt zur Identifizierung von *Salmonella* spp. durchgeführt. Hierfür wurde ein Verdünnungsausstrich auf XLD-Medium (B.1.2) aus der Anreicherungskultur angefertigt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C kann ein Wachstum von *Salmonella* spp. an der, in Punkt B.1.2 beschriebenen Schwarzfärbung der Kolonien erkannt werden.

B.7. Extraktion hochmolekularer DNA

B.7.1 Optimierung der DNA-Extraktion aus komplexen Proben

Die Extraktion hochmolekularer DNA aus den angereicherten Proben (B.6) wurde von allen beteiligten Partnern nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt werden. Daher wurden das kommerziell erhältliche „Bio 101 FastDNA® SPIN Kit for Soil“ und das dazugehörige „Fast-Prep-Instrument“ (MP-Biomedicals LLC., Solon, USA) als Basis verwendet. Um eine möglichst optimale DNA-Ausbeute zu ermöglichen, wurden verschiedene Lysematrizes von unterschiedlichen Herstellern an einer *Listeria monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E Reinkultur getestet. Hierfür wurde

bei einer Übernachtskultur dieses Bakteriums eine Zellernte bei 6000 rpm für 10 min durchgeführt. Das entstandene Pellet wurde in 1x PBS resuspendiert und anschließend in Aliquots aufgeteilt. Die DNA-Extraktion wurde nach Herstellerangaben mit der jeweiligen Lysematrix durchgeführt. Tabelle B.23 fasst die getesteten Lysematrizes zusammen.

Tab. B.23: Für die DNA-Extraktion getestete Lysematrizes

Matrix	Hersteller
Lyse Matrix E	MP Biomedicals LLC., Solon, USA
Lyse Matrix D	
Lyse Matrix C	
Lyse Matrix B	
Lyse Matrix A	
0,1 mm Glas-Beads	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
2,8 mm Keramik-Beads	
0,5 mm Glas-Beads	
2,8 mm Stahl-Beads	

Da *Listeria* spp. Gram-positiv sind und somit über eine stark ausgeprägte Zellwand verfügen, wurde zusätzlich eine Vorbehandlung der Proben mit Mutanolysin (Sigma-Aldrich® Co., St. Louis, USA) getestet. Hierbei handelt es sich um eine N-Acetyl Muramidase, welche die N-acetylmuramyl- β (1-4)-N-acetylglucosamin-Bindungen der Peptidoglycan-Polysaccharid-Schicht in der Zellwand Gram-positiver Bakterien spaltet (Fliss *et al.*, 1991; Lichtman *et al.*, 1992). Für die Überprüfung der Effizienz dieser Vorbehandlung wurden ebenfalls Aliquots der oben genannten Bakterienkultur verwendet. Es wurden Zellen geerntet und das entstandene Pellet in 50 μ l einer 300 U/ml Mutanolysin-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die DNA-Extraktion nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Eine ähnliche Vorbehandlung mit 500 U/ml Lysostaphin wurde von den österreichischen Kooperationspartnern für die DNA-Extraktion von *Staphylococcus* spp. getestet. Die extrahierte DNA-Menge sowie Qualität wurden spektralphotometrisch mit Hilfe eines ND-1000 Nanodrop-Photometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

B.7.2 DNA-Extraktionsprotokoll

Aufgrund der Ergebnisse der unter Punkt B.7.1 beschriebenen Optimierung der DNA-Extraktion wurde für alle Proben folgendes Protokoll angewendet:

Nach der in Punkt B.6. beschriebenen Anreicherung und Weiterbearbeitung wurde eine erneute Zellernte bei 6000 rpm für 10 min durchgeführt. Das entstandene Pellet wurde in 50 µl „Enzymlösung“ bestehend aus 300 U/ml Mutanolysin und 500 U/ml Lysostaphin resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min wurden 978 µl Natriumphosphatpuffer und 122 µl MT-Puffer (beides im Kit „Bio 101 FastDNA® SPIN Kit for Soil“ enthalten) hinzugegeben. Anschließend wurde nach dem im Kit enthaltenen Protokoll von Schritt 2 an fortgefahren. Nach Durchführung des Protokolls wurde die extrahierte DNA spektralphotometrisch auf ihre Qualität und Menge hin überprüft und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die extrahierte DNA aus den BPW- (B.6.3) und Bolton-Medium-Anreicherungen (B.6.2) der Probennahmen von Hofdünger (B.5.1) sowie Salat- und Gemüsepflanzen (B.5.2) wurde auf Trockeneis zu den auf den Nachweis der jeweiligen pathogenen Bakterien spezialisierten Kooperationspartnern versendet.

B.8 Molekularbiologischer Nachweis von *Listeria monocytogenes* und *Salmonella enterica*

B.8.1 Spezifische PCR zum Nachweis von *L. monocytogenes* und *S. enterica*

Zusätzlich zu den unter B.6 beschriebenen Nachweis der jeweiligen Bakterien mittels selektiver Anreicherung wurde eine molekularbiologische Nachweismethode mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Saiki *et al.* (1988) verwendet. Für die jeweilige Bakterienart spezifischen Virulenzgene wurden als Zielsequenzen ausgewählt.

Für den Nachweis von *L. monocytogenes* wurde das *iap*-Gen (Köhler *et al.*, 1990) als Zielsequenz verwendet. Dieses Gen kodiert für das P60-Protein welches sowohl an

der Zellteilung wie auch an der Adhäsion an die Wirtszelle beteiligt ist (Kuhn & Werner Goebel, 1989).

Als Zielsequenz für den spezifischen Nachweis von *S. enterica* wurde das *invA*-Gen gewählt, welches für ein Protein kodiert, dass an der Invasion der Bakterien in Darmepithelzellen beteiligt ist (Galan *et al.*, 1992).

Die verwendeten Primer wurden entweder von „Thermo Elektron GmbH“ (Ulm, Deutschland) oder „Eurofins MWG Biotech“ (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und in den, in Tab. B.24 zusammengefassten Kombinationen eingesetzt.

Tab. B.24: Verwendete Primer für den Nachweis von *L. monocytogenes* und *S. enterica* mittels spezifischer PCR

Primer	Ziel Gen	Primer Sequenz in 5' - 3' Orientierung	Fragmentgröße [bp]	Referenz
MonoA	<i>iap</i>	CAA ACT GCT AAC ACA GCT ACT	ca. 400	Bubert <i>et al.</i> , 1992
MonoB		GCA CTT GAA TTG CTG TTA TTG		
inv-A f	<i>inv-A</i>	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	284	Rahn <i>et al.</i> , 1992
inv-A r		TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C		

Für jede im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte PCR wurde das kommerziell erhältliche „Top Taq Polymerase“-System der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) verwendet. Die jeweiligen Mengen der eingesetzten Reagenzien richteten sich nach den Herstellerangaben. Um spezifische Amplifikate zu erhalten wurden zunächst sowohl Primerkonzentration als auch MgCl₂-Konzentration im Reaktionsansatz optimiert. Als Template für die PCR wurde entweder die, nach dem in Punkt B.7.2 beschriebenen Protokoll extrahierte DNA oder bei den Inokulationsversuchen im axenischen System, wie in den Punkten B.6.1 und B.6.3 beschrieben, direkt die in PBS aufgenommene Anreicherungskultur eingesetzt. Die Angaben zu den in die PCR eingesetzten Reagenzien sind in Tab. B.25 zusammengefasst.

Tab. B.25: Eingesetzte Reagenzien für den PCR-Nachweis von *L. monocytogenes* und *S. enterica*

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella enterica</i>
	Vol. in µl	Vol. in µl
10 x PCR Puffer	5	5
10 x CoralLoad Concentrate	5	5
5x Q-Solution	10	10
MgCl ₂ 25 mM	10	0
Primer F 50 pmol/µl	0,2	0,1
Primer R 50 pmol/µl	0,2	0,1
dNTP Mix 10 mM	1	1
Template	1	1
NFW	17,35	27,55
Top Taq DNA Polymerase	0,25	0,25

Alle PCR Reaktionen wurden in einem programmierbaren „PEQstar 96 Universal“ Thermocycler (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Laut Herstellerangaben ist bei Verwendung des „Top Taq Polymerase“ Systems eine Annealingtemperatur von 60°C für die meisten Primer-Template-Kombinationen obligat zu verwenden. Um die Spezifität der PCR-Nachweisreaktionen zu erhöhen wurde in dieser Arbeit zum Einen ein „Touchdown-PCR“-Programm nach Don *et al.* (1991) verwendet. Hierbei wird die Annealingtemperatur anfangs erhöht und in den folgenden Zyklen schrittweise jeweils um 1°C bis zur endgültigen, für die weiteren Zyklen verwendeten Annealingtemperatur verringert. Dies verhindert eine unspezifische Bindung der Primer in den ersten Amplifikationsschritten. Zum Anderen wurde die endgültige Annealingtemperatur auf 63°C erhöht. Die Verwendeten PCR-Bedingungen sind in Tab. B.26 zusammengefasst.

Tab. B.26: Für den PCR-Nachweis von *L. monocytogenes* und *S. enterica* verwendetes PCR-Programm

Zyklen	Temperatur °C	Zeit
1	94	5 min.
	94	30 sek.
	70	30 sek.
	72	1 min.
	94	30 sek.
	69	30 sek.
	72	1 min.
	94	30 sek.
	68	30 sek.
	72	1 min.
	94	30 sek.
	67	30 sek.
	72	1 min.
	94	30 sek.
	66	30 sek.
	72	1 min.
	94	30 sek.
	65	30 sek.
	72	1 min.
	94	30 sek.
64	30 sek.	
72	1 min.	
36	94	30 sek.
	63	30 sek.
	72	1 min.
1	72	10 min.

B.8.2 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der durchgeführten PCR-Nachweisreaktion qualitativ zu überprüfen, wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt. Bei dieser Methode können unter Zuhilfenahme eines Markers Größe und bedingt die Quantität der erhaltenen DNA-Fragmente überprüft werden. Für die Elektrophorese wurde 1%iges Agarose-Gel (Biozym DNA Agarose, Biozym® Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Dieser Nukleinsäuren-interkalierende Phenanthridin-Farbstoff lagert sich zwischen den Basen der zu untersuchenden DNA ein; der Komplex zeigt eine erhöhte Fluoreszenzaktivität bei Anregung mit ultraviolettem Licht. 5 µl der jeweiligen Amplifikationsprodukte wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Zudem wurde in jeder Taschenreihe ein 100 bp Längenstandard (Generuler™, Fermentas GmbH, ST. Leon-Rot, Deutschland) als Marker eingesetzt. Dies ermöglichte sowohl die Überprüfung der erhaltenen Menge, als auch die der erhaltenen Größe des PCR-Produktes. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einer Elektrophoresekammer (PerfectBlue Breitformat-Gelsystem Maxi ExW, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) mit 1x TAE Puffer (B.1.1) für 30 min bei 130 V und 130 mA. Nach dem Lauf wurden die Gele mit Hilfe eines „Image System Felix 6000“ (Mit DH-40/50, Biostep, Jahnsdorf, Deutschland) betrachtet und mit der Software „Argus X1“ fotografisch dokumentiert. Gegebenenfalls wurde das Foto mit der Software „Totallab 100“ nachbearbeitet.

B.8.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um eine Weiterverarbeitung der PCR-Produkte mittels Sequenzierung zu ermöglichen, musste die DNA von störenden Stoffen wie z.B. Polymerasen, nicht umgesetzte Primer, Salzen oder Farbstoffen gereinigt werden. Hierfür wurde das NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde in nukleasefreiem Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

B.8.4 Sequenzierung der PCR-Produkte

Aufgereinigte PCR-Produkte wurden mit Hilfe des BigDye Terminator (BDT) v3.1 Sequenzierkits (Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben mit einem Kapillarsequenzierautomaten ABI 3730 (Applied Biosystems) nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert. Für die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die Amplifikationsprimer verwendet, die auch für die vorangegangene PCR verwendet wurden (Tab. B.24).

Tab. B.27: Für die Sequenzierung verwendetes PCR-Programm

Zyklen	Temperatur °C	Zeit
1	96	1 min
50	96	10 sek
	50	5 sek
	60	4 min

B.8.5 Sequenzanalyse

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der FinchTV 1.4 Software (Geospiza, Seattle, USA, <http://www.geospiza.com>) korrekturgelesen. Mit der online frei zugänglichen Suchmaschine „BLAST“ (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (Altschul *et al.*, 1997)) erfolgte ein Sequenzvergleich mit den in der Datenbank GeneBank vorhandenen Sequenzen, um die nächstverwandten Sequenzen zu ermitteln.

B.9 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)

B.9.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von Bakterien auf Pflanzenteilen

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ermöglicht eine Lokalisierung und Quantifizierung von Organismen in ihrem natürlichen Habitat (Amann *et al.*, 2001). Die ribosomale RNA (16S rRNA und 23S rRNA bei Prokaryoten) diente hierbei als Zielmolekül. Diese kommt ubiquitär in allen Lebewesen vor, zeigt funktionelle Konstanz und ist durch ihre konservierten, variablen und hoch variablen Sequenzmotive, sowie einer hohen Kopienzahl in lebenden Organismen ideal geeignet. Durch den Einsatz von kurzen, an ihrem 5'-Ende mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Oligonukleotid-Sonden, die gegen die ribosomale RNA gerichtet sind, wird eine Unterscheidung von Bakterien, je nach Spezifität der Sonde, bis teilweise auf Artniveau möglich.

Um die Struktur der Proben zu konservieren wurden diese in 4% Paraformaldehyd (PFA) oder 50% EtOH fixiert. Die verwendete Fixierung richtete sich hierbei nach den zu untersuchenden Bakterien. Für Gram-negative Bakterien wie z.B. *S. enterica* wurde die Fixierung mit 4% PFA bevorzugt. Da bei dieser Art der Fixierung Quervernetzungen innerhalb der Peptidoglycan-Schicht der bakteriellen Zellwand entstehen und diese Schicht bei Gram-positiven Bakterien, wie z.B. bei *L. monocytogenes*, wesentlich dicker ist, kann dies einen negativen Effekt auf die Penetration der eingesetzten Sonden in die Bakterienzelle haben. Zur Detektion Gram-positiver Bakterien wurden daher die Proben zusätzlich mit 50% Ethanol-fixiert (Amann *et al.*, 1995).

Die in dieser Arbeit untersuchten Wurzel- und Sprossproben wurden bei der Probennahme sofort in die jeweilige Fixierungslösung gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen und bis zur Hybridisierung bei -20°C in 1 : 1 EtOH:1x PBS gelagert.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde modifiziert nach Manz *et al.* (1992) und Amann *et al.* (1992) durchgeführt. Nach einer Dehydratisierung in einer aufsteigenden EtOH-Reihe für jeweils 3 min in 50%, 80% und 100% Ethanol wurden

Wurzel- und Sprosstteile wie bei Rothballer (2004) beschrieben in einem 2 ml ERG hybridisiert. Hierfür wurden 100 µl Hybridisierungspuffer (Tab. B.29) zu den Pflanzenproben gegeben und anschließend mit jeweils 10 µl einer 20 ng/µl Lösung der verwendeten Sonden versetzt. In Tab.B.30 sind die verwendeten Oligonukleotidsonden zusammengefasst. Nach 2 Stunden Hybridisierung bei 46°C erfolgte ein stringenter Waschschrift bei 48°C in einem Waschpuffer. Anschließend wurden die Pflanzenteile mit MQ gespült, auf Objektträger (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) platziert, mit Citifluor-A F1 (Citifluor Ltd., London, Großbritannien) eingebettet und mit einem Deckglas versehen.

Tab. B.29: Zusammensetzung von Hybridisierungs- und Waschpuffer

	Hybridisierungspuffer	Waschpuffer
5 M NaCl	360 µl	9 ml
1 M Tris/HCl pH 8,0	40 µl	1 ml
10% (w/v) SDS	2 µl	50 µl
MQ	1,6 ml	ad 50 ml

Tab. B.30: Verwendete Oligonukleotidsonden

Sonde	Spezifität	Zielmolekül und Position (E. coli)	Sequenz	Referenz
EUB-338 I	<i>Bacteria</i>	16S: 338-355	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Amann <i>et al.</i> 1990
EUB-338 II	<i>Planctomycetales</i>	16S: 338-355	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Daims <i>et al.</i> 1999
EUB-338 III	<i>Verrucomicrobiales</i>	16S: 338-355	GCT GCC ACC CGT ACC TGT	Daims <i>et al.</i> 1999
Lis-1255	<i>Listeria spp.</i>	16S: 1255-1272	ACC TCG CGG CTT CGC GAC	Wagner <i>et al.</i> 1998
Salm-63	<i>Salmonella spp.</i>	23S: 1742-1760	TCG ACT GAC TTC AGC TCC	Kutter <i>et al.</i> 2006

B.9.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Für die Analyse der Proben, die einer FISH unterzogen wurden, wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) (LSM 510.meta, ZEISS, Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einem Argon und zwei Helium-Neon Lasern, sowie ein Wasserimmersionsobjektiv C-Apochromat® 63x/1,2 W Korr. mit 63facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,2 verwendet.

Tab. B.31: Verwendete Farbstoffe mit den jeweiligen Absorptions- und Emmisionsmaxima

Fluoreszenz-farbstoff	Absorptionsmaxima (nm)	Emmisionsmaxima (nm)	Laser
GFP	498	516	Argon 488
Fluos	490, 494	520, 525	Argon 488
Cy3	514, 552, 554	566, 570	Helium-Neon 543
Cy5	649	666, 670	Helium-Neon 633

Die Laser werden dazu verwendet, die eingesetzten Fluoreszenz-Farbstoffe in der jeweiligen Wellenlänge anzuregen (Tab. B.31). Mit Hilfe eines Scan-Spiegels wird die Fokusebene Punkt für Punkt abgetastet. Ein Strahlleiter lässt das kurzwellige Anregungslicht passieren und lenkt die langwelligere Fluoreszenz um. Dadurch wird das Licht auf eine konfokale Lochblende fokussiert, wodurch nur Strahlen von der Fokusebene die Blendenöffnung (Pinhole) passieren können. So sind scharfe Abbildungen des Präparates bis zu einer Tiefe von 40 µm möglich. Die Signale werden durch einen Photomultiplier detektiert und als digitale Signale an einen Rechner mit entsprechender Bildbearbeitungssoftware weitergeleitet. Dort werden die einzelnen Bildpunkte zu einem Graustufenbild zusammengefasst. Mit Hilfe der Software LSM Image Browser Version 4.2 werden dem Grautonbild entsprechend des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes Farbkanäle zugeordnet. Bei den in dieser Arbeit gezeigten Bildern wurden den Fluorochromen Fluorescein (Fluos) ein grüner Kanal, Cy3 ein roter Kanal und Cy5 ein blauer Kanal zugeordnet.

Durch die Verwendung dieses Mikroskops ist es möglich, 3-dimensionale Aufnahmen des untersuchten Präparates anzufertigen. Hierfür werden entlang der z-Achse in regelmäßigen, definierten Abständen (1µm) Bilder der jeweiligen Fokusebene

genommen. Die so angefertigten optischen Schnitte (Stapel) werden anschließend mit Hilfe des Computers zu einem Gesamtbild zusammengefügt.

Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software Zeiss LSM Image Browser Version 4.2.

B.10 Messung von Standardparametern der in Deutschland genommenen Proben von biologischen Düngern

Die Standardparameter der Hofdüngerproben wurden nach Sammlung aller Proben und folgender Lagerung bei -20 °C analysiert.

B.10.1 Bestimmung des Trockengewichts

Ein geringe Menge Mist oder Gülle wurden erst bei 60 °C und anschließend bei 105 °C bis zur Gewichtskonstante getrocknet. Mit der Differenz Feuchtgewicht - Trockengewicht lässt sich der Wassergehalt der Proben bestimmen.

B.10.2 Herstellung von Extrakten und Messung des DOC

Zur Herstellung von Extrakten wurden von jeder Probe 10 g in ein PE-Gefäß eingewogen (in Duplikaten), mit 100 ml 0,01 M CaCl₂-Lösung versetzt und 1 h über Kopf geschüttelt, um den extrahierbaren organischen Kohlenstoff und Stickstoff zu lösen. Anschließend wurden die nicht löslichen Partikel der Probe mittels Filtration durch Faltenfilter (Grade 602 h 1/2, Whatman plc., Maidstone, Großbritannien) von den Extrakten getrennt. Die Extrakte wurden bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Die Messung des DOC wurde nach dem Ansäuern der Proben mit 100 µl 2N HCl an einem Dimatoc 2000-Gerät (Fa. Dimatec, Essen, Deutschland) mittels Verbrennungsanalyse durchgeführt. Die Probe wird in einen 850 °C heißen Reaktionsraum eingespritzt. Die entstehenden Gase der Probe werden photometrisch analysiert.

B.10.3 Bestimmung des pH-Wertes der Hofdüngerproben

Anschließend an die in B 10.2 beschriebene Methode zur Herstellung von Extrakten wurde der pH-Wert der Proben mit Hilfe eines pH-Meters bestimmt.

B.10.4 Bestimmung des Gesamtstickstoffes

Die Bestimmung des Gesamtstickstoffes wurde nach Kjeldahl (1883) und mittels CHN-Analyser durchgeführt.

B.10.5 Bestimmung des Ammoniums

Die Bestimmung des Ammoniums aus den in B.10.2 beschriebenen Extrakten wurde nach Kandeler und Gerber (1988) und mit Hilfe eines „segmented flow analysis system“ (SFAS) durchgeführt.

B.10.6 Bestimmung des Nitrats

Die Bestimmung der Nitratwerte aus den in B.10.2 beschriebenen Extrakten wurde nach Scharpf und Wehrmann (1976) und mit Hilfe eines SFAS durchgeführt.

B.10.7 Bestimmung des Phosphors

Die Bestimmung des Phosphors erfolgte nach Trocknung der Proben, Homogenisierung und Druckaufschluss mittels ICP-AES (Atomemissionspektrometrie) Analyse.

C Ergebnisse

C.1 Optimierung der DNA-Extraktion

Die Optimierung der DNA-Extraktion aus den verschiedenen Proben unter Verwendung unterschiedlicher Lyse-Matrizes mit dem kommerziell erwerbbaaren Kit „Bio 101 spin kit for soil“ ergab, dass bei Benutzung der im Kit enthaltenen Lyse-Matrix E die höchste DNA-Ausbeute von 71,4 bis 74,9 ng/μl im Vergleich zu beispielsweise 45,5 bis 49,4 ng/μl für Lyse-Matrix B, erzielt werden konnte (Tab. C.1). Um die oft schwierige Isolation von hochmolekularer DNA aus Gram-positiven Bakterien zu optimieren wurde eine enzymatische Vorinkubation verwendet. Die Vorbehandlung der *L. monocytogenes* Zellen mit Mutanolysin bei 37°C für 30 min in Kombination mit der anschließenden Verwendung der Lyse-Matrix E führte zu einer zusätzlichen Steigerung der Ausbeute um ca. 71 % auf 124,9 bis 127,6 ng/μl (Tab. C.1). Ein ähnlicher Effekt konnte für die DNA-Isolierung von *Staphylococcus aureus* nach einer Vorinkubation mit Lysostaphin bei 37°C für 30 min durch die österreichischen Projektpartner festgestellt werden. Für alle weiteren Versuche wurde daher das in B.7.2 beschriebene DNA-Extraktionsprotokoll verwendet.

Tab. C.1: Ergebnisse der Optimierung der DNA-Extraktion aus *L. monocytogenes* Zellen

Verwendete Matrix	DNA-Ausbeute [ng/μl]	Hersteller	Mutanalysin-Vorinkubation	
Lyse Matrix E	71,4	MP Biomedicals	Nein	
	75,9			
Lyse Matrix D	12,7			
	11,3			
Lyse Matrix C	10,9			
	12,1			
Lyse Matrix B	49,4			
	45,5			
Lyse Matrix A	18,8			
	16,6			
0,1 mm Glas-Beads	30,4	PeqLab		
	29			
2,8 mm Keramik-Beads	11,7			
	10,7			
0,5 mm Glas-Beads	12,8			
	13,1			
2,8 mm Stahl-Beads	12,8			
	9,4			
Lyse Matrix E	127,6		MP Biomedicals	Ja
	124,9			

C.2 Analyse der Hofdüngerproben

Im Zuge der Hofdüngerprobenahme wurden in Deutschland insgesamt 9 Proben genommen (siehe Tab. B.21). Mit diesen wurden chemische Analysen (B.10) sowie der kultivierungsabhängige (B.6.1) und der molekularbiologische Nachweis (B.8) von *L. monocytogenes* durchgeführt. Diese PCR-gestützte Nachweismethode wurde zusätzlich auf die von den Projektpartnern genommenen Proben angewendet.

C.2.1 Chemische Analysen der in Deutschland genommenen Hofdüngerproben

Im Zuge der Hofdüngerprobenahme wurden in Deutschland insgesamt 9 Proben genommen und analysiert (siehe Tab. B.21). Die Ergebnisse der unter B.10 beschriebenen chemischen Analysen der Hofdüngerproben sind in Tab. C.2 und Tab. C.3 zusammengefasst. Alle angegebenen Werte der einzelnen Parameter sind bezogen auf das Trockengewicht der jeweiligen Probe.

Die pH-Werte der Proben lagen zwischen 7,46 in Probe G08SC und 8,78 in Probe G05MC. Die Messung des in den Proben enthaltenen Gesamtstickstoffs (N) ergab Werte zwischen 18,4 mg/g für Probe G06MC und jeweils 31,4 mg/g für die Proben G03SC und G09MC, welche von fermentierter Gülle bzw. von kompostiertem Stallmist stammen (Tab. C.2). Die Probe G03SC zeigte den höchste Gehalt an Ammonium (NH₄) mit 3,17 mg/g, wogegen bei kompostiertem Mist (G09MC) der niedrigste Ammoniumgehalt gemessen wurde (Tab. C.2). Für die meisten Proben wurden Nitratwerte (NO₃) um 0,95 µg/g +- 0,02 µg/g gemessen. Ausnahmen bildeten die zwischen 1-3 Monaten und 1 Jahr gelagerten Stapelmistproben G04MC und G05MC mit Werten von 40,30 und 8,86 µg/g sowie die von 3 Monate gelagertem, kompostiertem Stallmist genommene Probe G09MC mit einem stark erhöhten Nitratwert von 1100 µg/g (Tab. C.2). Bei der Messung des Phosphatgehaltes (P) wurde für die fermentierte Gülle (G03SC) der höchste Wert mit 9,69 mg/g und für den kompostierten Mist der niedrigste Wert mit 1,02 mg/g festgestellt (Tab. C.2).

Die Analyse des Gesamtkohlenstoffs (C) der Proben ergab sehr ähnliche Werte für alle Proben, welche zwischen 337 mg/g für Probe G08SC und 411 mg/g für Probe G04MC lagen (Tab. C.3). Für den gelösten organischen Kohlenstoff (DOC) wurden Werte zwischen 21,47 mg/g für Probe G02SC und 1,60 mg/g für Probe G08SC (Tab. C.3) gemessen. Der Trockengewichtsfaktor (Trockengewicht x Trockengewichtsfaktor = Frischgewicht) sowie das Verhältnis g Trockengewicht / 100 g Frischgewicht unterschieden sich stark zwischen den Proben von flüssigem und festem Hofdünger; er lag für die untersuchten Gülleproben zwischen 13,9 für Probe G02SC und 35,5 für Probe G08SC. Bei den untersuchten Mistproben dagegen lag dieser Faktor zwischen 3,2 für Probe G07MC und 5,4 für Probe G04MC (Tab. C.3). Für das Verhältnis g Trockengewicht / 100 g Frischgewicht ergibt sich dadurch für die Gülleprobe G08SC

der niedrigste Wert von 2,82 g / 100 g und für die Stapelmistprobe G07MC der höchste Wert von 31,25 g / 100 g (Tab. C.3).

Tab. C.2: Ergebnisse der chemischen Analysen; pH-Wert; N (Gesamtstickstoff); NH₄ (Ammonium); NO₃ (Nitrat); P (Phosphor); alle Angaben beziehen sich auf das Trockengewicht;

Probe	pH	N (mg/g)	NH₄ (mg/g)	NO₃ (µg/g)	P (mg/g)
G01MC	8,1	18,8	1,29	0,96	4,05
G02SC	7,69	20,3	1,73	0,94	5,73
G03SC	8,05	31,4	3,17	0,93	9,69
G04MC	8,3	20,6	0,73	40,30	4,01
G05MC	8,78	26,8	1,09	8,86	5,48
G06MC	7,75	18,4	0,96	0,93	5,95
G07MC	8,46	30,1	1,54	0,95	6,04
G08SC	7,46	27,4	0,89	0,94	9,08
G09MC	8,22	31,4	0,17	1100,00	1,02

Tab. C.3: Ergebnisse der chemischen Analysen; C (Gesamtkohlenstoff); DOC (gelöster organischer Kohlenstoff); Trockengewichtfaktor (Trockengewicht x Faktor = Frischgewicht); g Trockengewicht / 100 g Frischgewicht; alle Angaben beziehen sich auf das Trockengewicht;

Probe	C (mg/g)	DOC (mg/g)	Trockengewicht Faktor	g Trockengewicht / 100 g Frischgewicht
G01MC	410	8,08	5	20
		9,63		
G02SC	352	21,47	13,9	7,19
		21,44		
G03SC	355	8,52	14	7,14
		7,59		
G04MC	411	16,79	5,4	18,52
		8,13		
G05MC	405	11,53	4,5	22,22
		14,59		
G06MC	372	7,79	4,5	22,22
		7,53		
G07MC	399	18,27	3,2	31,25
		17,21		
G08SC	337	4,57	35,5	2,82
		1,60		
G09MC	374	16,47	4,5	22,22
		15,76		

C.2.2 Kultivierungsabhängiger Nachweis von *Listeria monocytogenes* aus den in Deutschland genommenen Hofdüngerproben

Mit Hilfe der unter B.6.1 beschriebenen selektiven Anreicherung von *Listeria* spp. und nachfolgender Subkultivierung auf Oxford- und Palcam-Selektivmedien konnten bei allen in Deutschland genommenen Proben *Listerien* nachgewiesen werden. In den 4 Proben G02SC, G07MC, G08SC und G09MC konnte zudem das Wachstum von *L. monocytogenes* Kolonien auf Rapid´L.mono Medium festgestellt werden. Die Analyse der Proben mittels spezifischer PCR (B.8) hingegen ergab nur bei den Proben G02SC und G08SC eine nachweisbare Kontamination mit *L. monocytogenes* (Tab. C.4).

Tab. C.4: Ergebnisse des Anreicherungskultur- und PCR-gestützten Nachweises von *L. monocytogenes* aus den in Deutschland genommenen Hofdüngerproben

Probe	Oxford- / Palcam-Medium	Rapid L. mono Medium	PCR
G01MC	(+)	(-)	(-)
G02SC	(+)	(+)	(+)
G03SC	(+)	(-)	(-)
G04MC	(+)	(-)	(-)
G05MC	(+)	(-)	(-)
G06MC	(+)	(-)	(-)
G07MC	(+)	(+)	(-)
G08SC	(+)	(+)	(+)
G09MC	(+)	(+)	(-)

C.2.3 Molekularbiologischer Nachweis der analysierten pathogenen Bakterien aus allen untersuchten Hofdüngerproben

Die in diesem Kapitel dargestellten Daten stammen auch von den anderen Teilnehmern des Projektverbundes und sind bisher unveröffentlicht. Sie werden zu Vergleichszwecken im Folgenden aufgeführt.

Der molekularbiologische Nachweis von *L. monocytogenes* mittels spezifischer PCR (B.8) wurde für alle im Rahmen des Projektes genommenen Proben durchgeführt. Insgesamt wurden 151 Proben analysiert. Bei 13 dieser Proben konnte eine Kontamination mit *L. monocytogenes* festgestellt werden.

Die Anreicherungen für *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus* spp. und *Campylobacter* spp., darunter auch die aus Deutschland, wurden von den entsprechenden Projektpartnern wie in B.6 dargestellt analysiert. Diese Analysen ergaben in 14 Proben das für *Campylobacter* spp. spezifische *mapA*-Gen, in 16 Proben das für *Salmonella* spp. spezifische *invA*-Gen und in 25 Proben das für *Staphylococcus* spp. spezifische *nuc*-Gen. Die für die Detektion pathogener *E. coli* Stämme verwendeten Gene *stx2* und *stx1* wurden in 86 bzw. 68 Proben nachgewiesen, das *rfbE O157*-Gen in 52 Proben und das *eae*-Gen in 105 Proben.

Eine Auftrennung der Analyseergebnisse nach der jeweilig beprobten Hofdüngerart ergab, dass in 15% aller untersuchter Gülleproben *L. monocytogenes* nachgewiesen

werden konnte. Dieser Wert lag bei Stapelmist und kompostiertem Mist dagegen bei 2% bzw. 5%. Ähnliches konnte für die anderen untersuchten Bakterien festgestellt werden. Diese konnten ebenfalls in einem vergleichsweise hohen Anteil der Gülleproben nachgewiesen werden. Stapelmistproben und vor allem Proben von kompostiertem Mist waren jedoch seltener mit den gesuchten pathogenen Bakterien belastet (Abb. C.1).

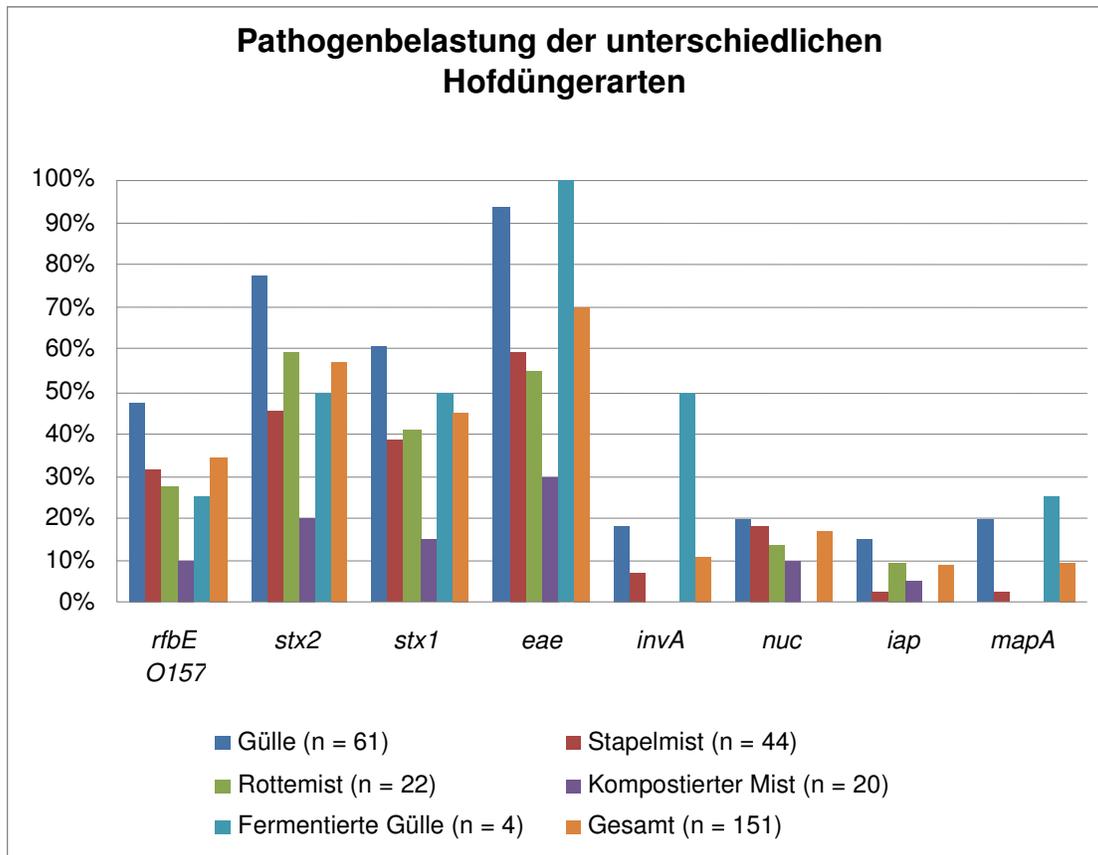


Abb. C.1: Prozentualer Anteil der mit den gesuchten pathogenen Bakterien kontaminierten Proben der jeweiligen Hofdüngerart; *rfbE O157*, *stx2*, *stx1* und *eae*: pathogene *E. coli*; *invA*: *Salmonella* spp.; *nuc*: *S. aureus*; *iap*: *L. monocytogenes*; *mapA*: *Campylobacter* spp.; n: Gesamtanzahl der jeweils genommenen Proben

Insgesamt war in DNA von nur 27 der 151 untersuchten Hofdüngerproben, keines der analysierten Gene nachweisbar; dies entspricht ca. 18%. Aufgeteilt nach der jeweiligen Hofdüngerart konnte festgestellt werden, dass in 55% aller untersuchten Proben von kompostiertem Mist, sowie in ca. 30% aller Stapelmistproben keines der gesuchten pathogenen Bakterien mit den molekularbiologischen Methoden nachgewiesen werden konnte. Nur bei ca. 3% der Gülleproben und 5% der Rottemistproben war der Nachweis von pathogenen Bakterien negativ. Alle untersuchten Proben von fermentierter Gülle dagegen waren mit zumindest einem der gesuchten Bakterien belastet.

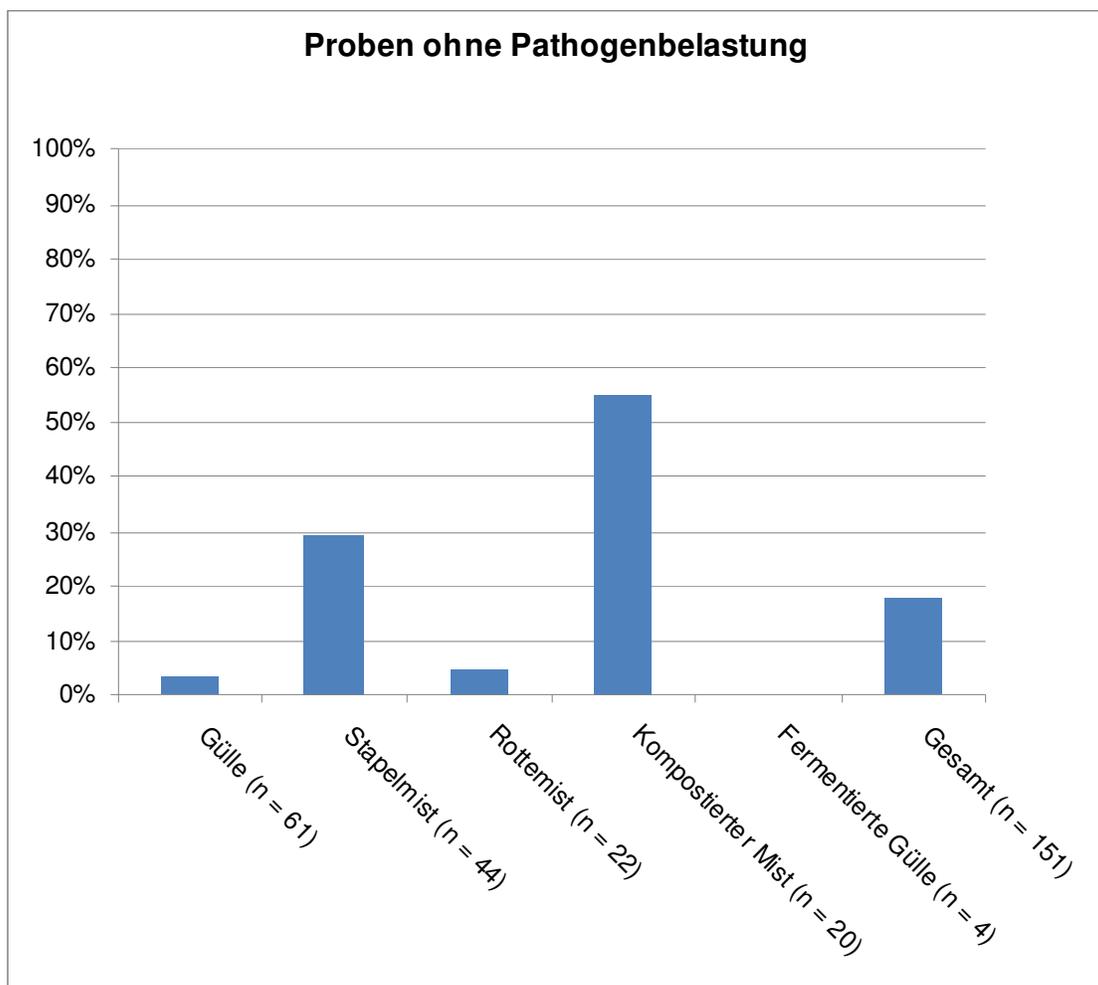


Abb. C.2: Prozentualer Anteil der mit keinen der gesuchten pathogenen Bakterien kontaminierten Proben an der Gesamtzahl (n) der genommen Proben der jeweiligen Hofdüngerart

Der Anteil von belasteten Proben von organisch bewirtschafteten Betrieben war für *stx1* (pathogene *E. coli*), *invA* (*Salmonella* spp.) und *nuc* (*S. aureus*) mit ca. 47%, 12% und 17% höher als die jeweiligen Anteile von konventionell bewirtschafteten Betrieben mit ca. 37%, 7%, und 13%. Mit Hilfe der anderen untersuchten Virulenzgenen konnte eine stärkere Belastung des konventionell produzierten Hofdüngers mit 50% bei *rfbE O157*, 63% bei *stx2*, 87% bei *eae* (alle pathogene *E. coli*), 10% bei *iap* (*L. monocytogenes*) und 13% bei *mapA* (*Campylobacter* spp.) im Vergleich zum organisch produzierten Hofdünger mit 31% bei *rfbE O157*, 55% bei *stx2*, 65% bei *eae*, 8% bei *iap* und 8% bei *mapA* festgestellt werden.

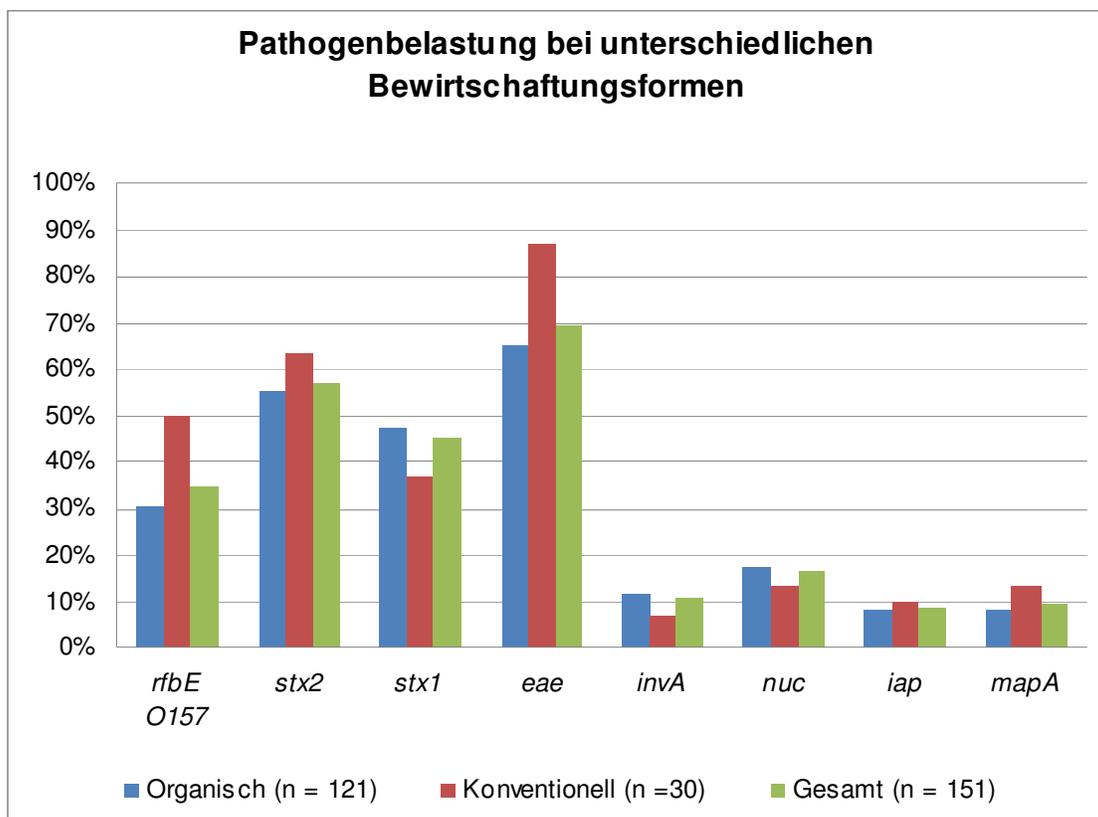


Abb. C.3: Prozentualer Anteil der mit den gesuchten pathogenen Bakterien kontaminierten Hofdüngerproben aus konventionell bzw. organisch bewirtschafteten Betrieben; *rfbE O157*, *stx2*, *stx1* und *eae*: *E. coli*; *invA*: *Salmonella* spp.; *nuc*: *S. aureus*; *iap*: *L. monocytogenes*; *mapA*: *Campylobacter* spp.; n: Gesamtanzahl der jeweils genommenen Proben

C.3 Feldproben von Salat- und Gemüsepflanzen

C.3.1 Nachweis von *Listeria monocytogenes* aus den in Deutschland genommenen Spinat- und Feldsalatproben

Insgesamt wurden in Deutschland 89 Spinat- und 50 Feldsalatproben, wie unter B.5.2 beschrieben, analysiert. Mit Hilfe der selektiven Anreicherung konnte in allen Spinatproben, sowie in 48 der 50 Feldsalatproben ein Wachstum von *Listeria* spp. auf Palcam- und Oxford-Selektivmedium festgestellt werden. Es konnte jedoch in keiner der in Deutschland genommenen Proben unter Verwendung von Rapid'L.mono Medium eine Belastung mit *L. monocytogenes* festgestellt werden. Ebenfalls ergab der molekularbiologische Nachweis von *L. monocytogenes* mittels spezifischer PCR, dass keine der analysierten Proben mit dem gesuchten Bakterium kontaminiert war.

C.3.2 Molekularbiologischer Nachweis der analysierten pathogenen Bakterien aus allen untersuchten Feldproben von Salat- und Gemüsepflanzen

Bei dem molekularbiologischen Nachweis der gesuchten Bakterien mittels spezifischer PCR (B.8) konnte nur auf zwei Feldern in Dänemark eine Belastung der dort angebauten Pflanzen mit *L. monocytogenes* festgestellt werden. Bei einem dieser zwei Felder konnte in 16 der 46 genommenen Proben das *iap*-Gen von *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Zudem konnte auf diesem Feld das für *Campylobacter* spp. spezifische *mapA*-Gen in drei, sowie die für enteropathogene *E. coli* spezifischen *rfbE O157*- und *eae*-Gene in 5 bzw. 19 Proben nachgewiesen werden.

Am häufigsten wurde das für *Salmonella* spp. spezifische *invA*-Gen in Kopfsalatproben eines Feldes in Österreich (17-mal) sowie eines Feldes in Schweden (12-mal) nachgewiesen.

Das für *S. aureus* spezifische *nuc*-Gen konnte in Proben aller untersuchten Felder, am häufigsten aber in Eisbergsalat- und Eichenblattsalatproben aus Dänemark mit jeweils 11 positiven Proben gefunden werden.

Die für Shigatoxin-bildende *E. coli* spezifischen *stx2*- und *stx1*-Gene konnten in 3 bzw. 2 Proben aus Dänemark und der Schweiz nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aller Analysen sind in Tab. C.5 zusammengefasst.

Tab. C.5: Zusammenfassung der Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises mittels PCR aller innerhalb des Projektes analysierter Proben. *rfbE O157*, *stx2*, *stx1* und *eae*: pathogene *E. coli*; *invA*: *Salmonella* spp.; *nuc*: *S. aureus*; *iap*: *L. monocytogenes*; *mapA*: *Campylobacter* spp.; n.a.: nicht analysiert

Land	Pflanze	Proben	<i>rfbE O157</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>	<i>eae</i>	<i>invA</i>	<i>nuc</i>	<i>iap</i>	<i>mapA</i>
Österreich	Kopfsalat, Endivie, Lollo Rosso Salat	50	0	0	0	1	0	9	0	0
	Kopfsalat	50	0	0	0	0	17	8	0	0
	Eisbergsalat	50	0	0	0	13	5	8	0	1
Dänemark	Eisbergsalat, Romanasalat	46	5	0	0	19	2	8	16	3
	Eisbergsalat	50	0	0	1	5	3	11	0	0
	Eichenblattsalat	50	0	2	0	16	7	11	1	0
Deutschland	Feldsalat	50	0	0	0	0	0	8	0	0
	Spinat	50	0	0	0	4	1	9	0	0
	Spinat	39	0	0	0	0	0	4	0	0
Schweden	Kopfsalat	50	0	0	0	0	5	4	0	0
	Kopfsalat	50	0	0	0	4	6	2	0	0
	Kopfsalat	50	0	0	0	1	12	1	0	0
Schweiz	Spinat	50	0	0	0	4	3	8	0	0
	Spinat	50	0	1	1	1	4	3	n.a.	0

Aufgeschlüsselt nach den verschiedenen verwendeten Düngerarten ergaben sich folgende Ergebnisse:

Der für pathogene *E. coli* spezifische Nachweis der Gene *rfbE O157*, *stx2* und *stx1* sowie der für *L. monocytogenes* spezifische Nachweis des *iap*-Gens war ausschließlich für Pflanzenproben die mit Gülle gedüngt worden waren, positiv. Das *eae*-Gen pathogener *E. coli* Bakterien konnte in ca. 13,6% der mit Gülle gedüngten, in 8% der mit Stapelmist gedüngten, in 5% der mit Rottemist gedüngten und in keiner der mit kompostiertem Mist gedüngten Pflanzenproben nachgewiesen werden. Bei 18% der mit Rottemist, ca. 13% der mit Stapelmist, 10% der mit kompostiertem Mist und ca. 5% der mit Gülle gedüngten Pflanzenproben wurde eine Belastung mit *Salmonella* spp. festgestellt. Der für *S. aureus* spezifische Nachweis des *nuc*-Gens war in ca. 16,5% der mit Stapelmist gedüngten, ca. 16% der mit Gülle gedüngten, 8% der mit kompostiertem Mist gedüngten und 3% der mit Rottemist gedüngten

Pflanzenproben positiv. Eine Belastung mit *Campylobacter* spp. konnte in ca. 0,8% der mit Gülle und ca. 0,6% der mit Stapelmist gedüngten Pflanzenproben festgestellt werden (Abb. C.4).

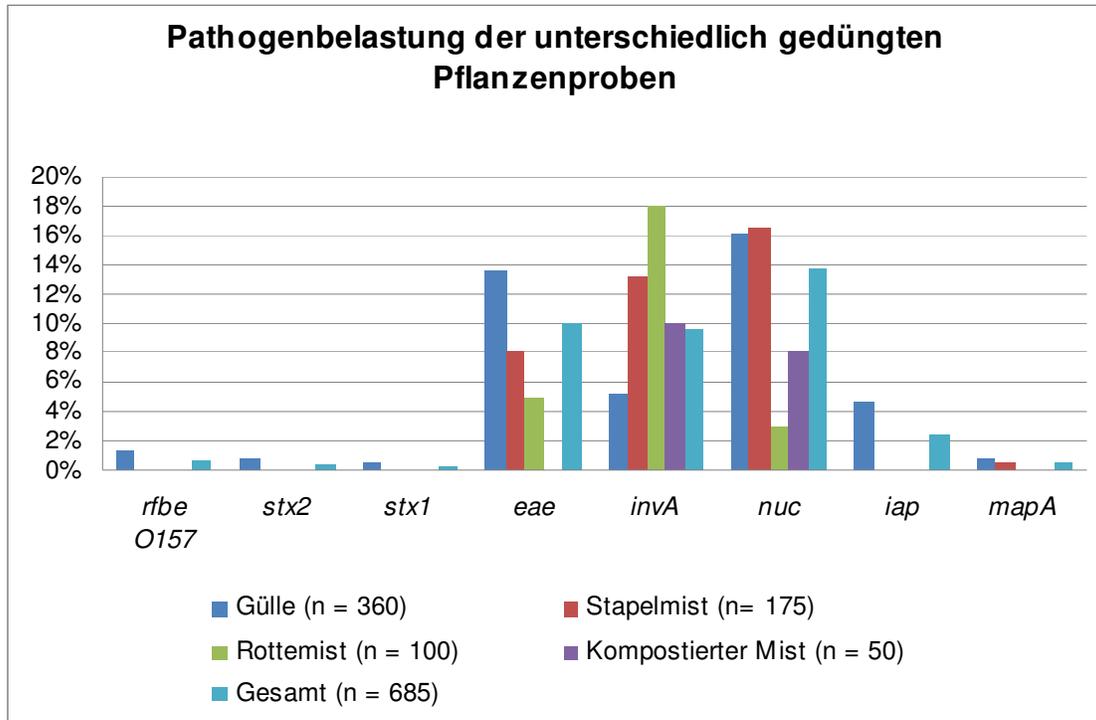


Abb. C.4: Prozentualer Anteil der mit den gesuchten pathogenen Bakterien belasteten Pflanzenproben aufgeteilt nach der jeweilig verwendeten Hofdüngerart; *rbe O157*, *stx2*, *stx1* und *eae*: pathogene *E. coli*; *invA*: *Salmonella* spp.; *nuc*: *S. aureus*; *iap*: *L. monocytogenes*; *mapA*: *Campylobacter* spp.

Insgesamt waren 82% der untersuchten Pflanzenproben, die mit kompostiertem Mist gedüngt wurden, frei von den gesuchten pathogenen Bakterien. Bei mit Rottemist gedüngten Pflanzen konnte dies für 74% der Proben, bei mit Stapelmist gedüngten Pflanzen für ca. 67% der Proben und bei mit Gülle gedüngten Pflanzen nur für ca. 66% der Proben festgestellt werden.

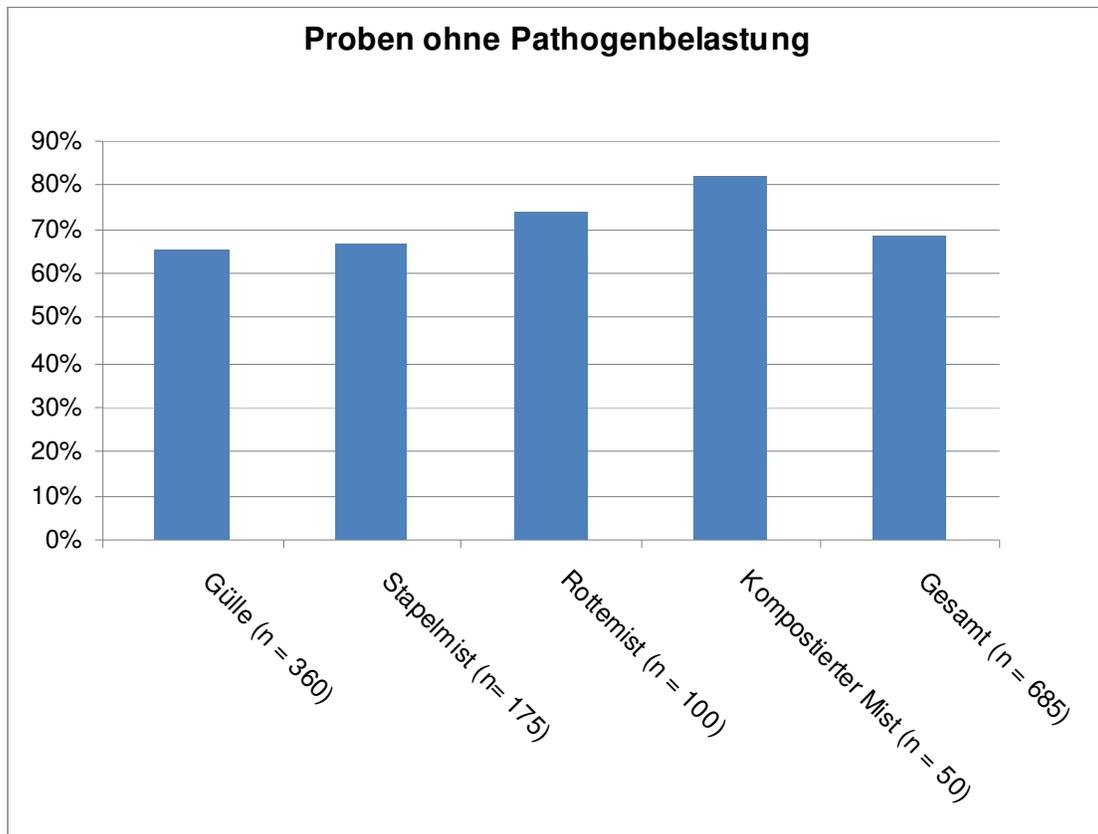


Abb. C.5: Prozentualer Anteil der analysierten Pflanzenproben, die mit keinem der gesuchten pathogenen Bakterien belastet waren, aufgeteilt nach der jeweils verwendeten Hofdüngerart

Bezüglich der getesteten Salat- und Spinatpflanzen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Der für *L. monocytogenes* spezifische Nachweis einer diagnostischen Region des *iap*-Gens, der für *Campylobacter* sp. spezifische Nachweis des *mapA*-Gens, sowie der für pathogene *E. coli* spezifische Nachweis des *rfbE* O157-Gens waren ausschließlich in den Salatproben positiv (ca. 3,5% für das *iap*-Gen, ca.1% für das *mapA*-Gen und ca. 1% für das *rfbE*-Gen). Zudem wurde bei ca. 11,5% der Salat- und ca. 4% der Spinatproben eine Belastung mit *Salmonella* spp. (Nachweis *invA*-Gen) festgestellt. Das für *S. aureus* spezifische *nuc*-Gen konnte in ca. 14% der Salat- und 13% der Spinatproben nachgewiesen werden. In 0,4% bzw. 0,2% der Salat- und 0,5% der Spinatproben konnten die für Shigatoxin bildende *E. coli* - Bakterien spezifischen Gene *stx2* und *stx1* nachgewiesen werden, das *eae*-Gen pathogener *E. coli* hingegen in ca. 12% der Salat und ca. 5% der Spinatproben (Abb. C.6).

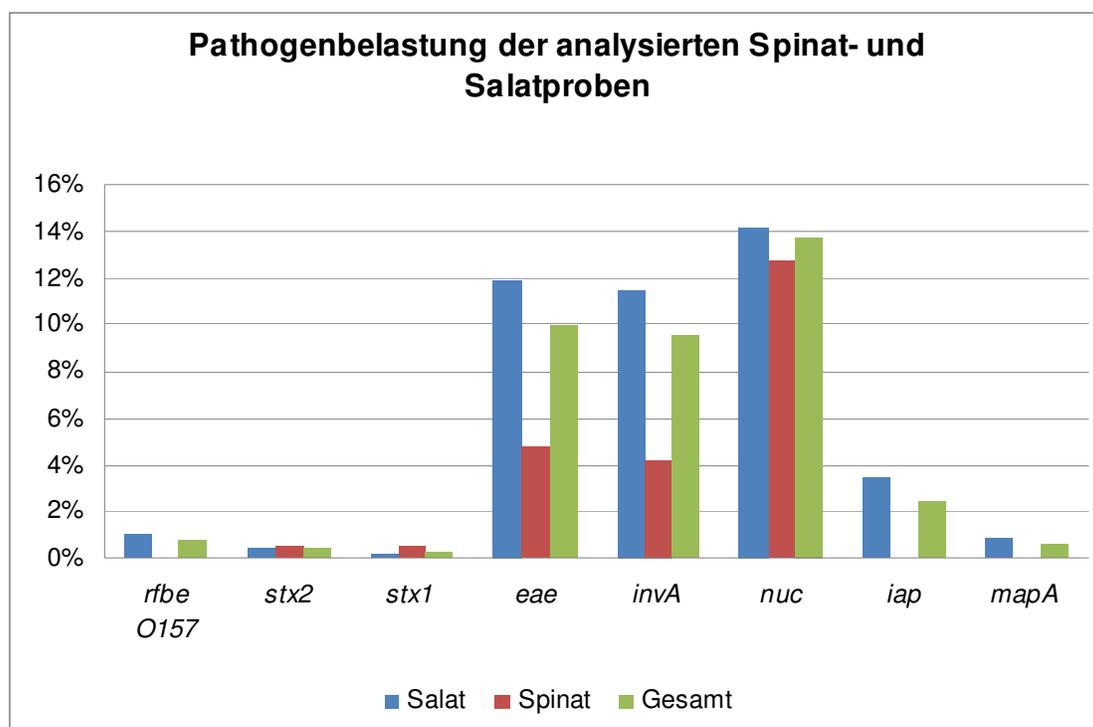


Abb. C.6: Prozentualer Anteil der mit den gesuchten pathogenen Bakterien Salat- bzw. Spinatproben; *rfbE* O157, *stx2*, *stx1* und *eae*: pathogene *E. coli*; *invA*: *Salmonella* spp.; *nuc*: *S. aureus*; *iap*: *L. monocytogenes*; *mapA*: *Campylobacter* spp.

Insgesamt konnte in ca. 79% aller Spinatproben und ca. 64% aller Salatproben keines der gesuchten pathogenen Bakterien nachgewiesen werden (Abb. C.7).

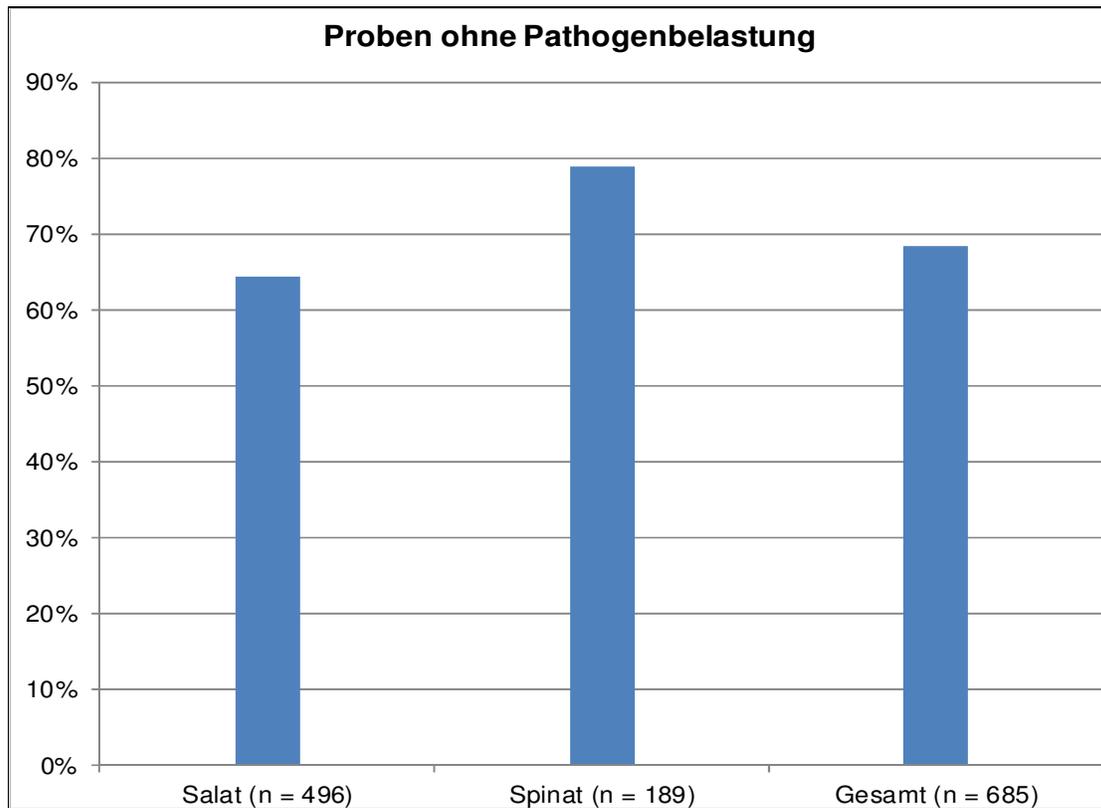


Abb. C.7: Prozentualer Anteil von Salat- bzw. Spinatproben die mit keinem der gesuchten pathogenen Bakterien belastet waren

C.4 Inokulationsansätze im axenischen (monoxenischen) System

Diese Versuche wurden durchgeführt, um zum Einen die minimale Inokulationsdosis zu finden, bei der eine die jeweiligen Pflanzen durch die eingesetzten Bakterien besiedelt werden (Infektionsdosis) und zum Anderen um Bakterienstamm- oder Pflanzenvarietät-spezifische Unterschiede bei der Besiedlung nachzuweisen.

C.4.1 Nachweis einer Besiedlung der inokulierten Pflanzen mittels selektiver Anreicherung sowie spezifischer PCR

Der Nachweis der inokulierten Bakterien erfolgte mittels selektiver Anreicherung (B.6.1 bzw. B.6.3) und spezifischer PCR (B.8). Bei den im Folgenden als positiv bezeichneten Proben konnte das jeweilig inokulierte Bakterium mit mindestens einer der verwendeten Methoden nachgewiesen werden.

C.4.1.1 Inokulation mit *S. enterica* ssp. Weltevreden

Bei den Inokulationsansätzen von Spinat und Feldsalat mit *S. enterica* ssp. Weltevreden konnten die eingesetzten Bakterien sowohl in allen untersuchten Wurzelproben als auch in allen untersuchten Waschflüssigkeitsproben (Abb. B.2) der Wurzeln nachgewiesen werden (Abb. C.8 und Abb. C.9). In 2 der 3 untersuchten, mit 4×10^6 CFU/ml inokulierten, sowie in allen weiteren Sprossproben von Spinat konnte eine Belastung mit *S. enterica* festgestellt werden. Der Nachweis der Bakterien war zudem in jeweils einer der 3 untersuchten Waschflüssigkeitsproben des Sprosses sowohl bei den geringsten Inokulationsdichten, als auch bei allen Proben höherer Inokulationsdichten erfolgreich (Abb. C.8).

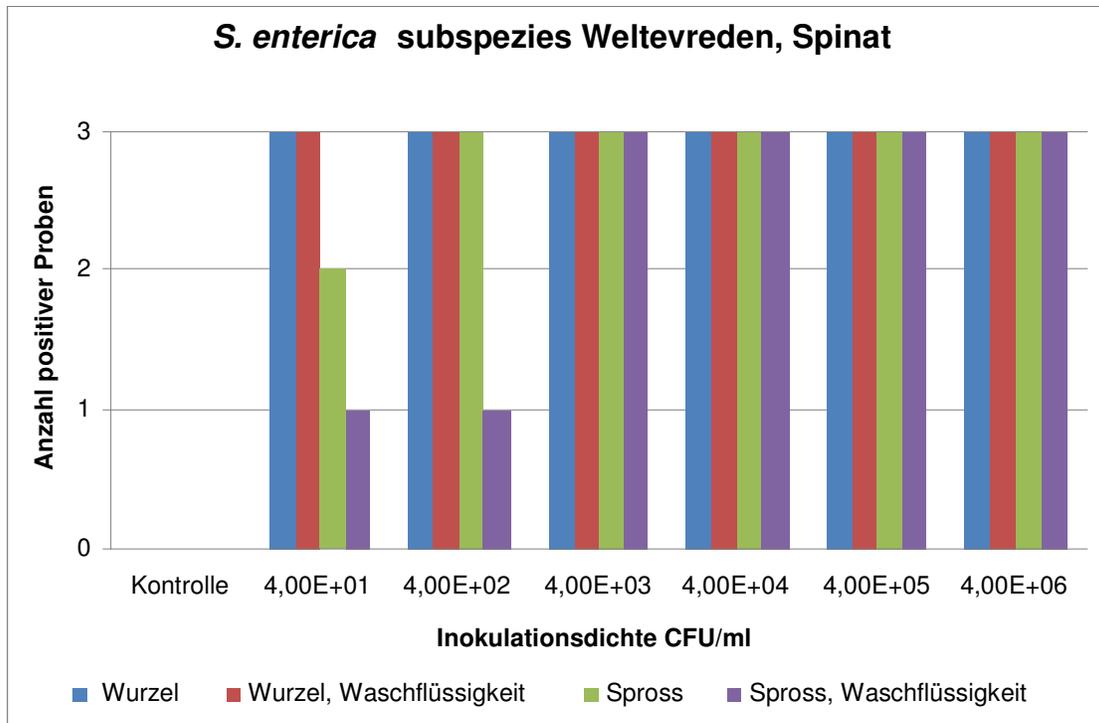


Abb. C.8: Besiedlung von Spinatpflanzen durch *S. enterica* ssp. Weltevreden im axenischen System: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf *S. enterica* getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig verwendete Inokulationsdichte (X-Achse)

Bei inokulierten Feldsalatpflanzen konnte *S. enterica* bei Inokulationsdichten von 4×10^3 und 4×10^5 CFU/ml in allen, sowie bei Inokulationsdichten von 4×10^4 und 4×10^6 CFU/ml in 2 der 3 untersuchten Sprossproben nachgewiesen werden. Bei einer Inokulationsdichte von 4×10^2 CFU/ml konnte in 1 der 3 untersuchten Waschflüssigkeitsproben eine Kontamination mit *S. enterica* festgestellt werden. Bei allen höheren Inokulationsdichten wurde das verwendete Bakterium in mindestens 2 der 3 Waschflüssigkeitsproben nachgewiesen (Abb. C.9).

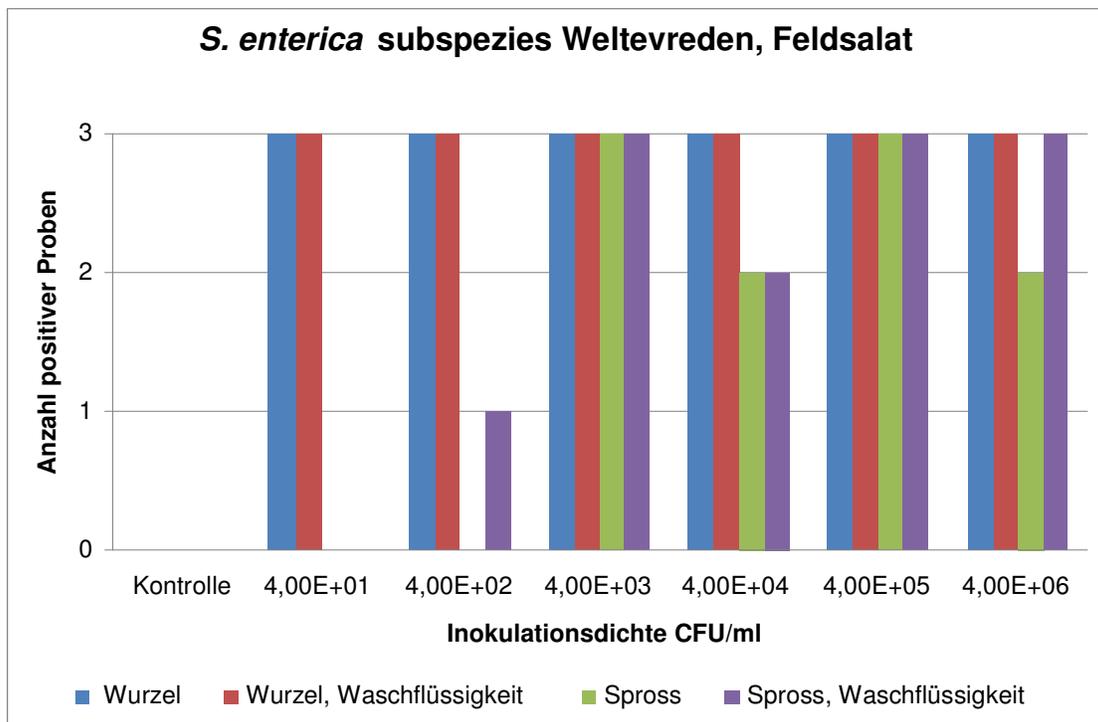


Abb. C.9: Besiedlung von Feldsalatpflanzen mit *S. enterica* ssp. Weltevreden im axenischen System: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf *S. enterica* getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig verwendete Inokulationsdichte (X-Achse)

C.4.1.2 Inokulation mit *L. monocytogenes* sv. 4b

Bei den Inokulationsansätzen von Spinat mit *L. monocytogenes* sv. 4b konnte das Bakterium sowohl bei 2 der 3 untersuchten Proben, die mit 4×10^1 CFU/ml inokuliert worden waren, als auch bei allen Proben höherer Inokulationsstufen in Waschflüssigkeitsproben der Wurzel sowie in Wurzelproben nachgewiesen werden. Ebenfalls für 2 von 3 Sprossproben der Inokulationsdichten 4×10^2 und 4×10^3 CFU/ml sowie für alle Proben höherer Inokulationsdichten konnte eine Besiedlung durch *L. monocytogenes* festgestellt werden. Zudem wurde das eingesetzte Bakterium in allen Waschflüssigkeitsproben der Inokulationsdichten 4×10^3 , 4×10^4 und 4×10^6 sowie in 2 der 3 Proben der Inokulationsdichte 4×10^5 CFU/ml nachgewiesen (Abb. C.10).

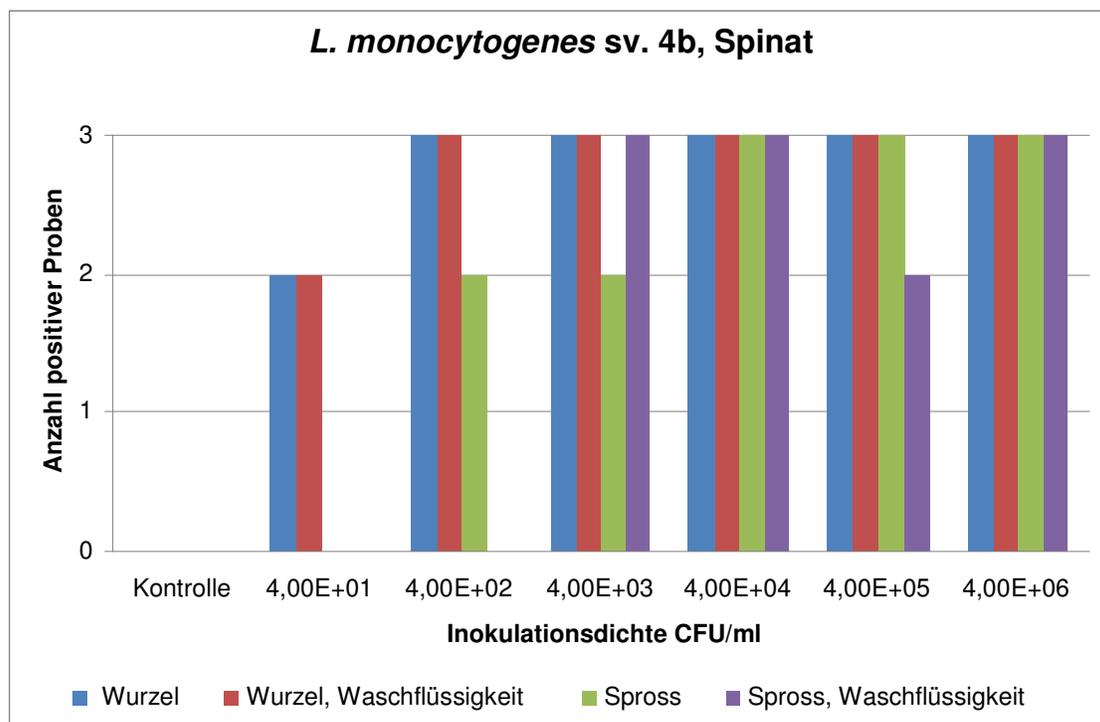


Abb. C.10: Besiedlung von Spinatpflanzen durch *L. monocytogenes* sv. 4b im axenischen System: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf *L. monocytogenes* getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig verwendete Inokulationsdichte (X-Achse)

Bei den Inokulationsansätzen von Feldsalat mit *L. monocytogenes* sv. 4b konnte das zu untersuchende Bakterium in 1 von 3 Wurzelproben der Inokulationsdichte 4×10^1 CFU/ml, 2 der 3 Wurzelproben der Inokulationsdichten 4×10^3 und 4×10^4 CFU/ml sowie in allen Proben höherer Inokulationsdichten nachgewiesen werden. Sowohl für eine der drei untersuchten Wurzel-Waschflüssigkeitsproben der Inokulationsstufe 4×10^1 CFU/ml als auch für alle Proben der Inokulationsstufen 4×10^3 , 4×10^4 , 4×10^5 und 4×10^6 CFU/ml konnte eine Kontamination mit *L. monocytogenes* festgestellt werden. Das eingesetzte Bakterium wurde in 1 der 3 untersuchten Sprossproben der Inokulationsdichte 4×10^3 CFU/ml sowie in 2 Proben der Inokulationsdichte 4×10^6 CFU/ml nachgewiesen. Zudem konnte eine Kontamination mit dem eingesetzten Bakterium in 1 von 3 Waschflüssigkeitsproben der Inokulationsdichten 4×10^3 und 4×10^4 CFU/ml sowie in 2 von 3 Proben der Inokulationsdichte 4×10^6 CFU/ml festgestellt werden (Abb. C.11).

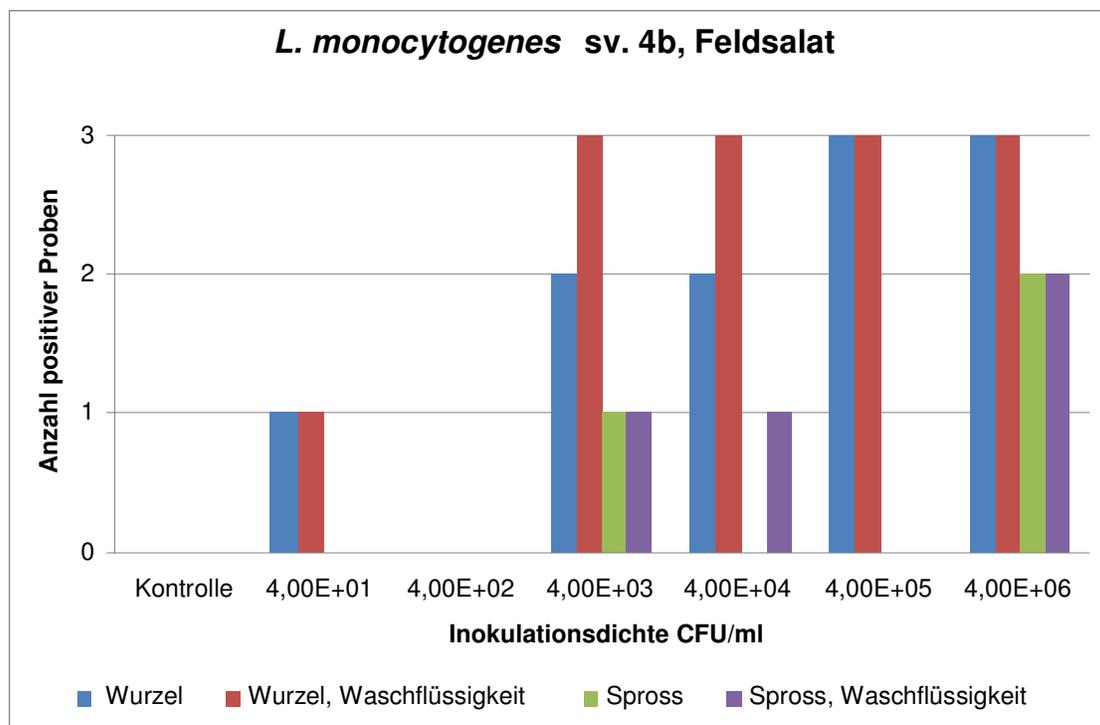


Abb. C.11: Besiedlung von Feldsalatpflanzen mit *L. monocytogenes* sv. 4b im axenischen System: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf *L. monocytogenes* getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig verwendete Inokulationsdichte (X-Achse)

C.4.1.3 Inokulation mit *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E

Die Inokulationsversuche mit *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E wurden durchgeführt um mögliche Unterschiede bei der Besiedlung der untersuchten Pflanzen im Vergleich zu *L. monocytogenes* sv. 4b aufzuklären.

Bei den Inokulationsansätzen mit *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E konnte das eingesetzte Bakterium bei allen untersuchten Wurzelproben sowie bei allen Waschflüssigkeitsproben der Wurzeln mit Ausnahme der Inokulationsdichte 4×10^4 CFU/ml nachgewiesen werden. Die Analyse der Sprossproben ergab für jeweils 2 von 3 Pflanzen der Inokulationsstufen 4×10^2 und 4×10^3 CFU/ml sowie für alle Proben höherer Inokulationsstufen eine Kontamination mit *L. monocytogenes*. Zudem konnte in allen Spross-Waschflüssigkeitsproben der Inokulationsdichten 4×10^2 , 4×10^4 , 4×10^5 und 4×10^6 CFU/ml sowie in 2 von 3 Proben der Inokulationsdichte 4×10^3 CFU/ml das verwendete Bakterium nachgewiesen werden (Abb. C.12).

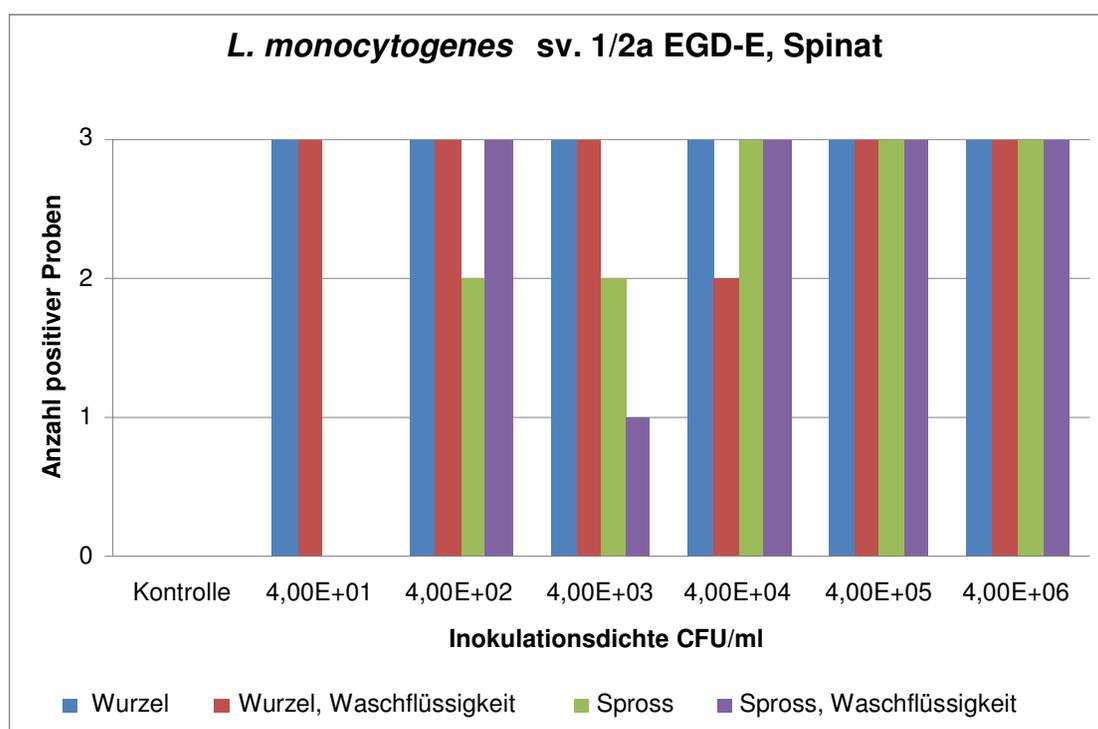


Abb. C.12: Besiedlung von Spinatpflanzen mit *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E im axenischen System: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf *L. monocytogenes* getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig verwendete Inokulationsdichte (X-Achse)

Bei den Inokulationsansätzen mit *L. monocytogenes* sv.1/2a EGD-E und Feldsalat konnte eine Kontamination der Wurzel sowohl in 2 von 3 Proben der Inokulationsdichten 4×10^2 und 4×10^3 CFU/ml als auch in allen Proben höherer Inokulationsdichten nachgewiesen werden. In Proben der niedrigsten Inokulationsdichte wurden dagegen keine Bakterien detektiert. In den Waschflüssigkeitsproben der Wurzeln waren die eingesetzten Bakterien in 1 von 3 Proben der Inokulationsdichte 4×10^3 CFU/ml, in 2 von 3 Proben der Inokulationsdichten 4×10^2 und 4×10^4 CFU/ml sowie in allen Proben höherer Inokulationsdichten nachweisbar. Bei den Sprossproben konnte eine Kontamination mit *L. monocytogenes* sowohl bei jeweils 1 von 3 analysierten Proben der Inokulationsdichten 4×10^3 und 4×10^4 CFU/ml als auch in 2 von 3 Proben der Inokulationsdichte 4×10^6 CFU/ml festgestellt werden. Zudem wurde das verwendete Bakterium in jeweils 1 der 3 untersuchten Waschflüssigkeitsproben des Sprosses der Inokulationsdichten 4×10^4 und 4×10^6 CFU/ml detektiert (Abb. C.13).

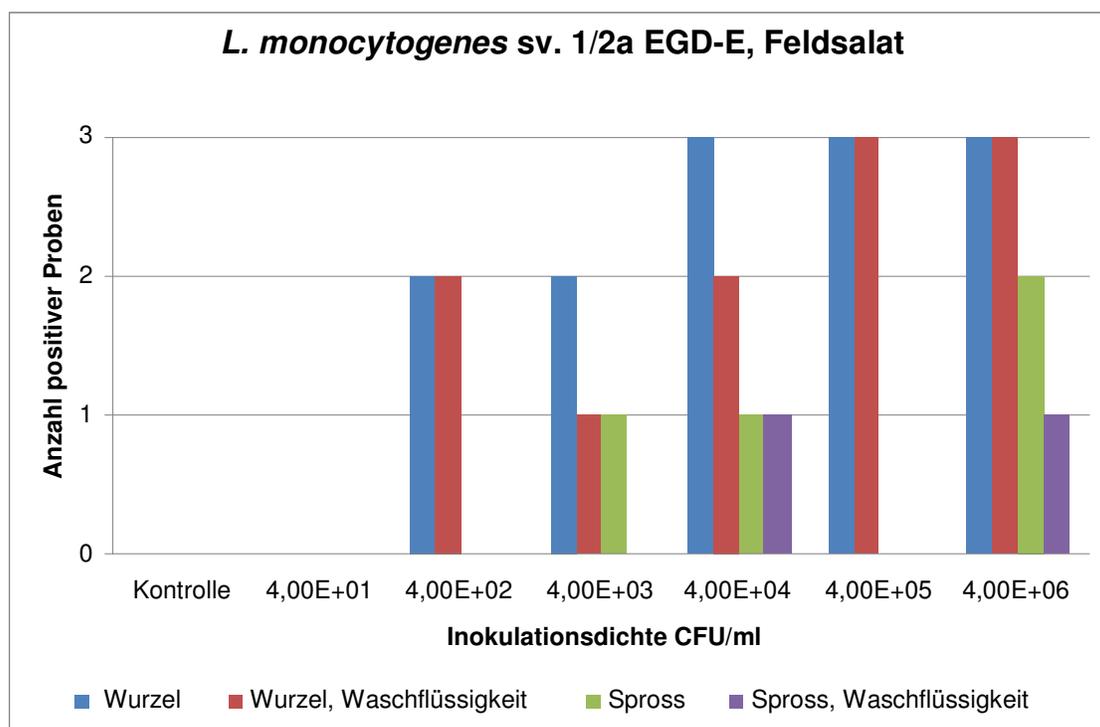


Abb. C.13: Besiedlung von Feldsalatpflanzen mit *L. monocytogenes* sv.1/2a EGD-E im axenischen System: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf *L. monocytogenes* getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig verwendete Inokulationsdichte (X-Achse)

C.4.2 FISH-Analyse der inokulierten Pflanzen

Die Fixative der zu untersuchenden Pflanzenteile wurden wie in B.9.1 beschrieben angelegt und einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) unterzogen. Mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (CLSM) wurden Aufnahmen der Präparate angefertigt (B.9.2). Bei allen untersuchten Ansätzen konnten ausschließlich Fluoreszenzsignale des Cy3 (rot) markierten EUB-338 Sondenmixes detektiert werden. Fluoreszenzsignale der für *Salmonella* spp. spezifische Sonde Salm-63-Cy5 sowie der für *Listeria* spp. spezifischen Sonde Lis-1255-Cy5 konnten dagegen nicht nachgewiesen werden. Da jedoch im axenischen/monoxenischen System davon ausgegangen werden kann, dass ausschließlich die inokulierten Bakterien in diesem System vorhanden sind, ist eine Lokalisierung der Bakterien mit Hilfe des EUB-338 Sondenmixes in diesem Fall eindeutig und ausreichend (für detaillierte Methodendiskussion siehe D.1.4).

C.4.2.1 Kolonisierung durch *S. enterica* ssp. Weltevreden

Bei Spinatpflanzen, die mit *S. enterica* ssp. Weltevreden inokuliert worden waren, konnte eine Besiedlung der Wurzeln hauptsächlich auf Wurzelhaaren (Abb.C.14) sowie in der Wurzelhaarzone (Abb.C.15) nachgewiesen werden. Hierbei wurden die Bakterien in großer Anzahl auf der Oberfläche der Wurzelhaare detektiert (Abb. C.14).

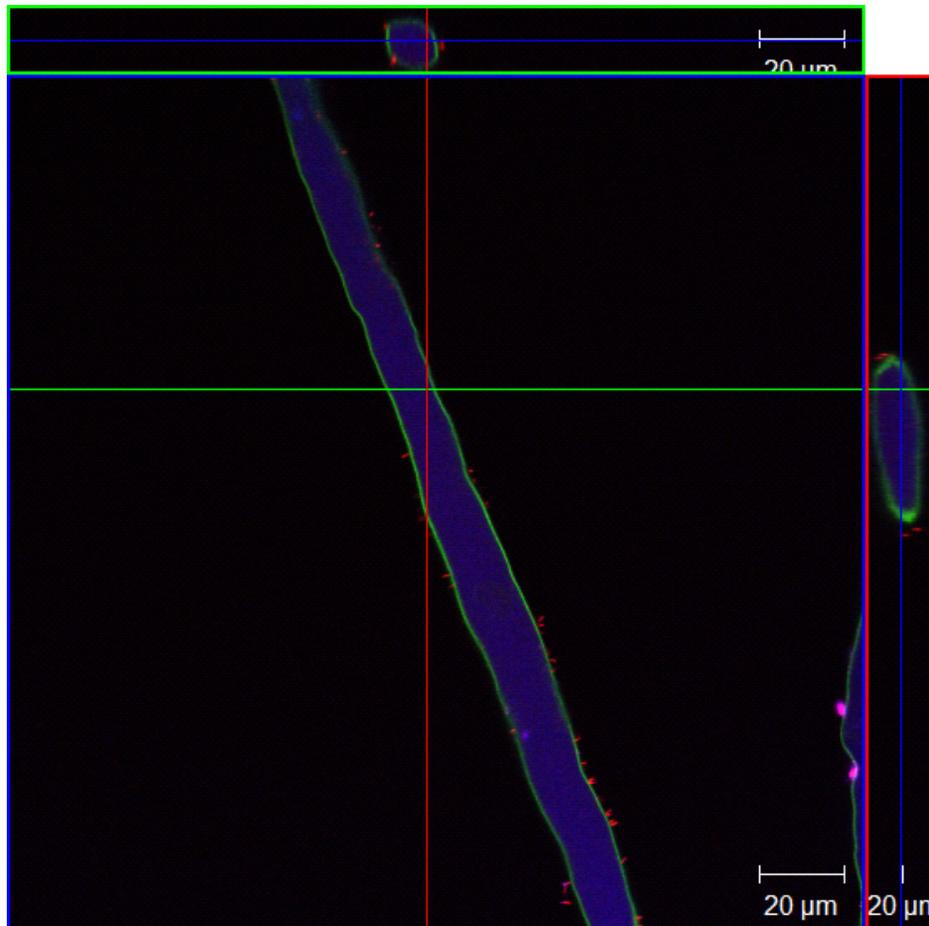


Abb. C.14: CLSM-Aufnahme eines Spinat-Wurzelhaares; Die Pflanze war mit *S. enterica* ssp. Weltevreden inokuliert; Inokulationsdichte: 4×10^6 CFU/ml; Verwendete Sonden: Eub-Mix Cy3 (rot), Salm-63 Cy5(blau)

Bei Spinatwurzeln konnte sowohl eine Besiedlung der Wurzelhaaroberfläche als auch der Basis der Wurzelhaare erkannt werden. Zudem wurde eine Besiedlung der Wurzel selbst nachgewiesen (Abb. C.15). Die Bakterien wurden hierbei in Zellzwischenräumen der Wurzeloberflächen detektiert (Abb. C.15.B)

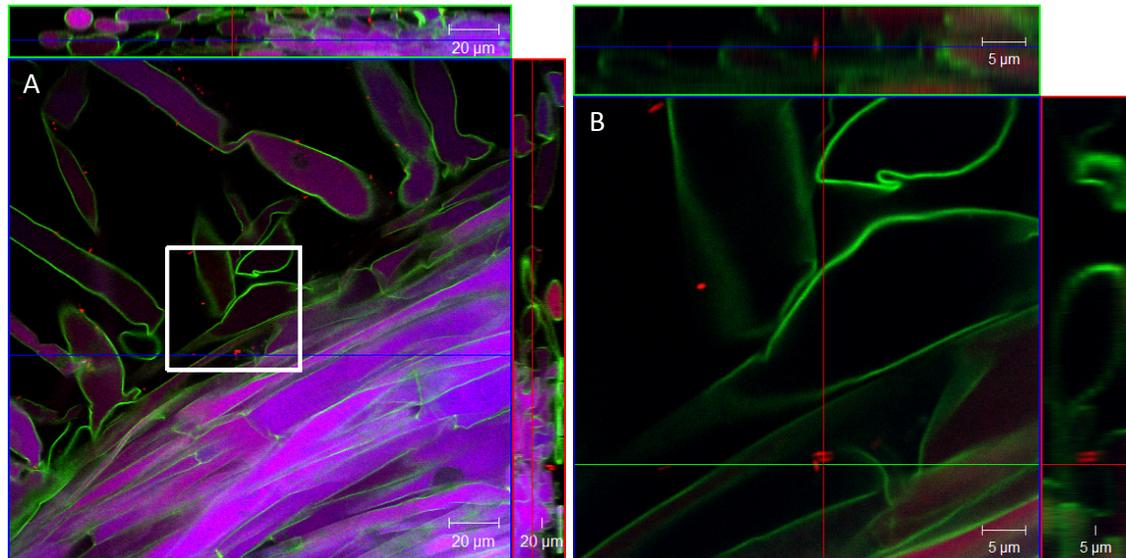


Abb. C.15: CLSM-Aufnahme einer Spinatwurzel; Die Pflanze war mit *S. enterica* ssp. *Weltevreden* inokuliert worden; Inokulationsdichte: 4×10^6 CFU/ml; Verwendete Sonden: EUB-Mix Cy3 (rot), Salm-63 Cy5 (blau); Bild B ist eine vergrößerte Aufnahme des in Bild A markierten Ausschnitts

Bei Feldsalatpflanzen, die mit *S. enterica* ssp. Weltevreden inokuliert worden waren, konnte eine Besiedlung der Wurzel an der Oberfläche der Wurzelspitze nachgewiesen werden (Abb. C.16). In der Wurzelhaarzone dagegen konnten nur wenige Bakterien detektiert werden (nicht gezeigt).

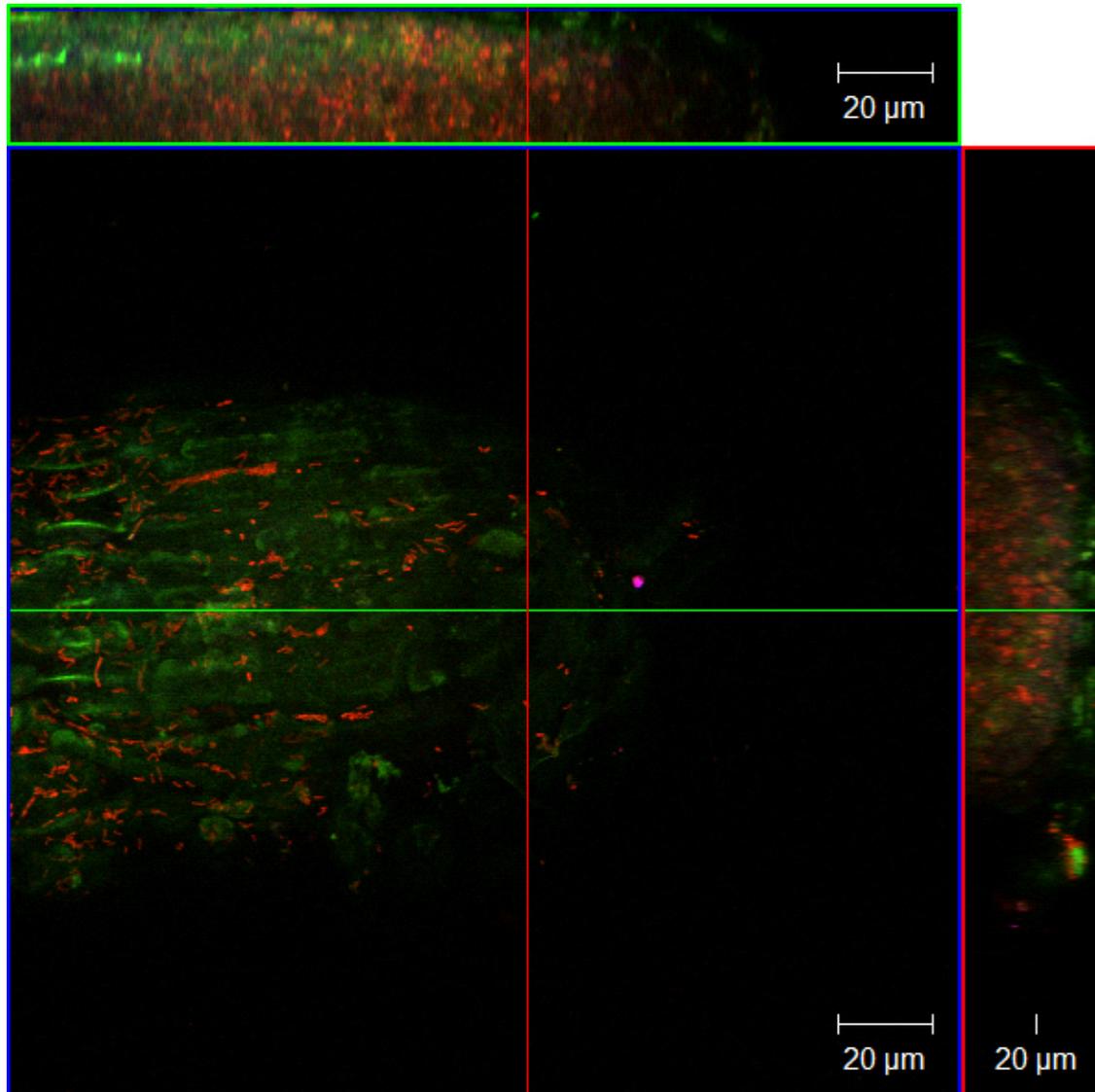


Abb. C.16: CLSM-Aufnahme einer Feldsalat-Wurzelspitze; Die Pflanze wurde mit *S. enterica* ssp. Weltevreden inokuliert; Inokulationsdichte: 4×10^6 CFU/ml; Verwendete Sonden: EUB-Mix Cy3 (rot), Salm-63 Cy5 (blau)

Die Bakterien wurden ebenfalls in der Wurzelhaube (Glycocalyx) und auf den Oberflächen der Pflanzenzellen nachgewiesen (Abb. C.17). Es wurden wiederum hauptsächlich Zellzwischenräume kolonisiert.

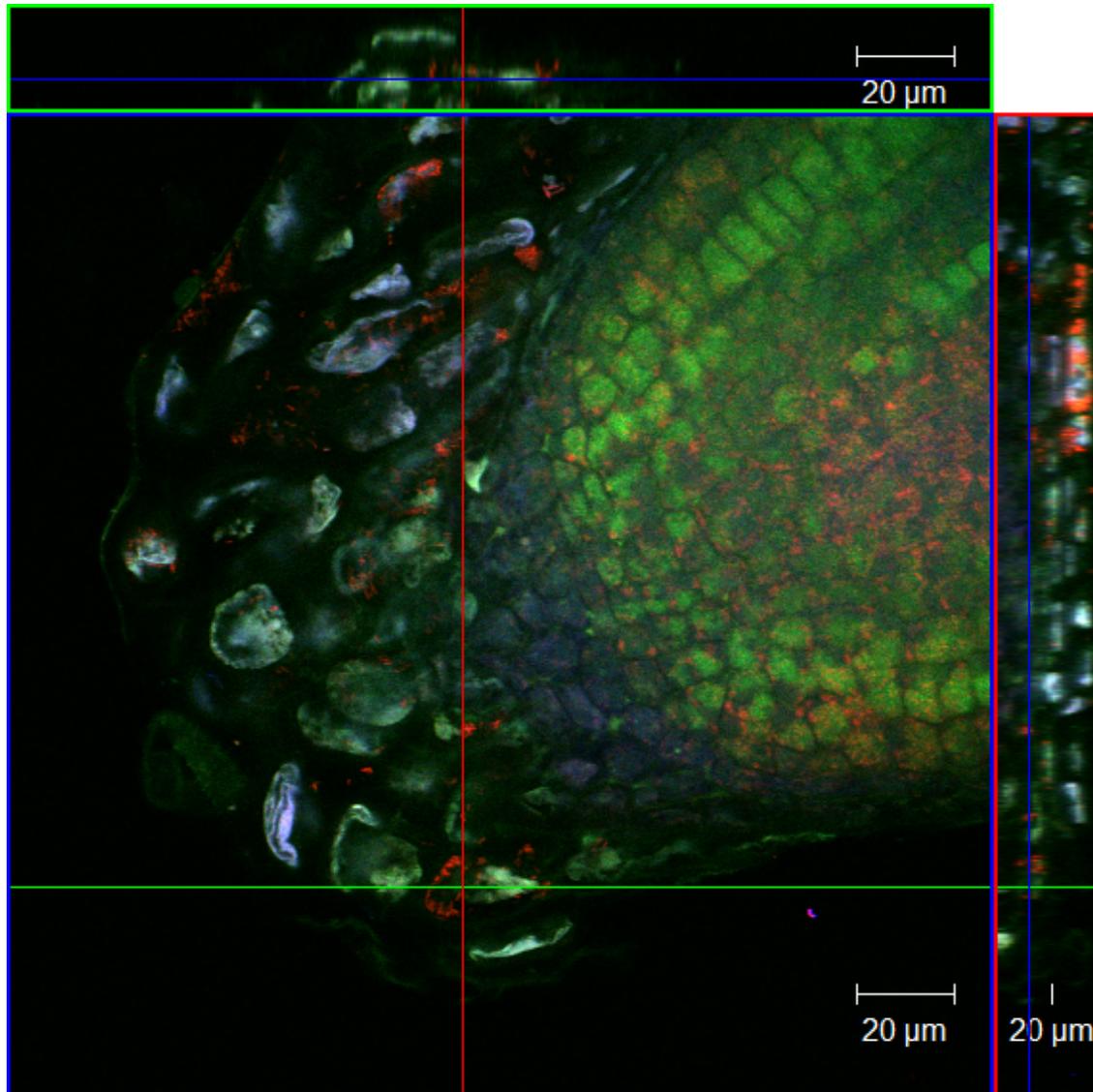


Abb. C.17: CLSM-Aufnahme einer Wurzelspitze von Feldsalat; Die Pflanze war mit *S. enterica* ssp. Weltevreden inokuliert worden; Inokulationsdichte: 4×10^6 CFU/ml; Verwendete Sonden: EUB-Mix Cy3 (rot), Salm-63 Cy5 (blau);

C.4.2.2 Kolonisierung durch *L. monocytogenes* sv. 4b

Bei Spinatpflanzen, die mit *L. monocytogenes* sv. 4b inokuliert worden waren, konnte regelmäßig eine Besiedlung der Wurzel in der Wurzelhaarzone nachgewiesen werden. Hierbei wurden die Bakterien in Zellzwischenräumen der Oberfläche der Wurzel detektiert (Abb. C.18). Dagegen konnten die Bakterien weder auf Wurzelhaaren noch auf Wurzelspitzen von Spinat nachgewiesen werden.

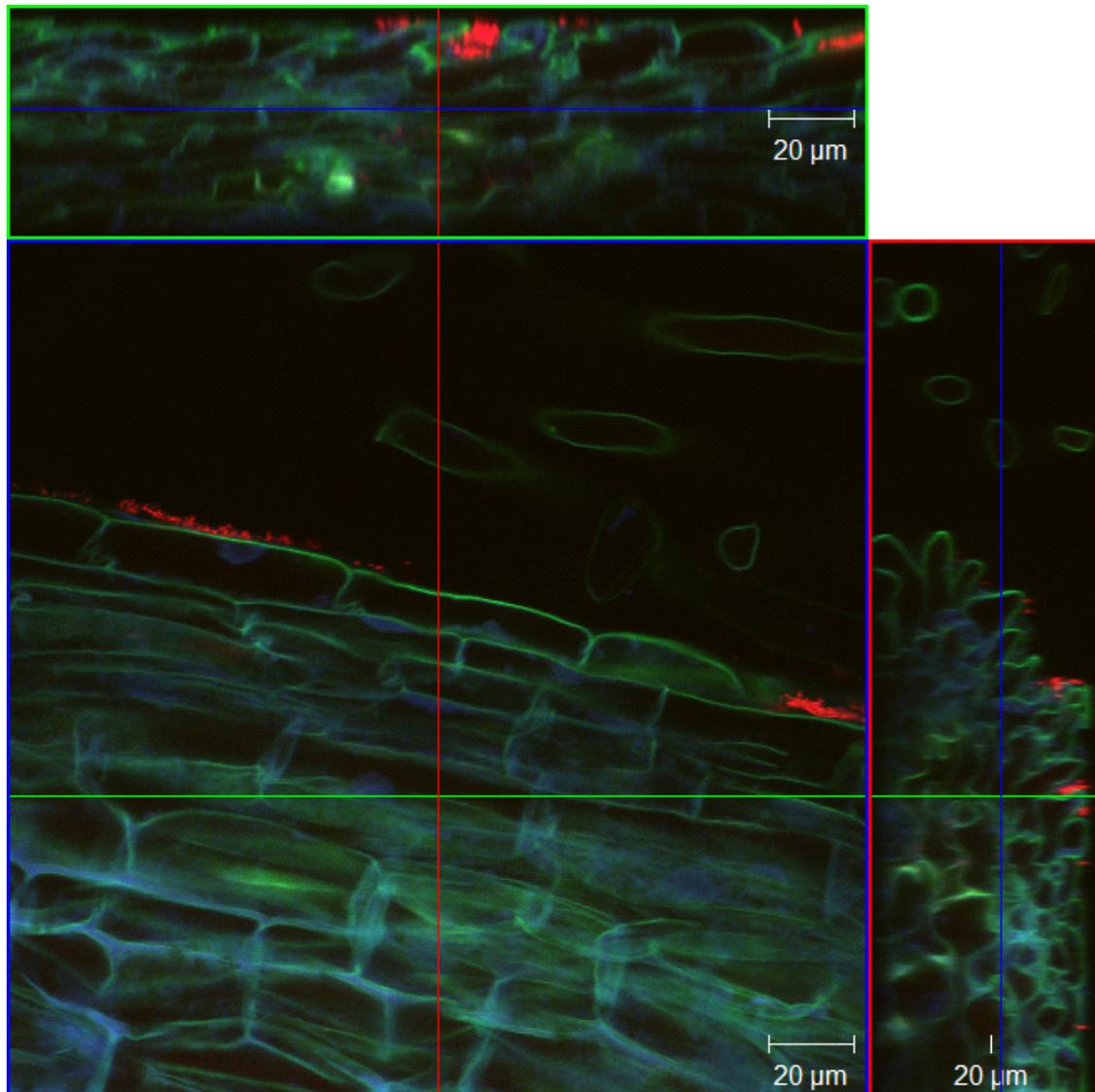


Abb. C.18: CLSM-Aufnahme einer Spinatwurzel; Die Pflanze war mit *L. monocytogenes* sv. 4b inokuliert worden; Inokulationsdichte: 4×10^6 CFU/ml; Verwendete Sonden: EUB-Mix Cy3 (rot)

Bei Feldsalatpflanzen die mit *L. monocytogenes* sv. 4b inokuliert worden waren konnte eine Besiedlung der Wurzel hauptsächlich kurz hinter der Wurzelspitze festgestellt werden, wohingegen die Wurzelspitze selbst nicht kolonisiert wurde (Abb. C.19).

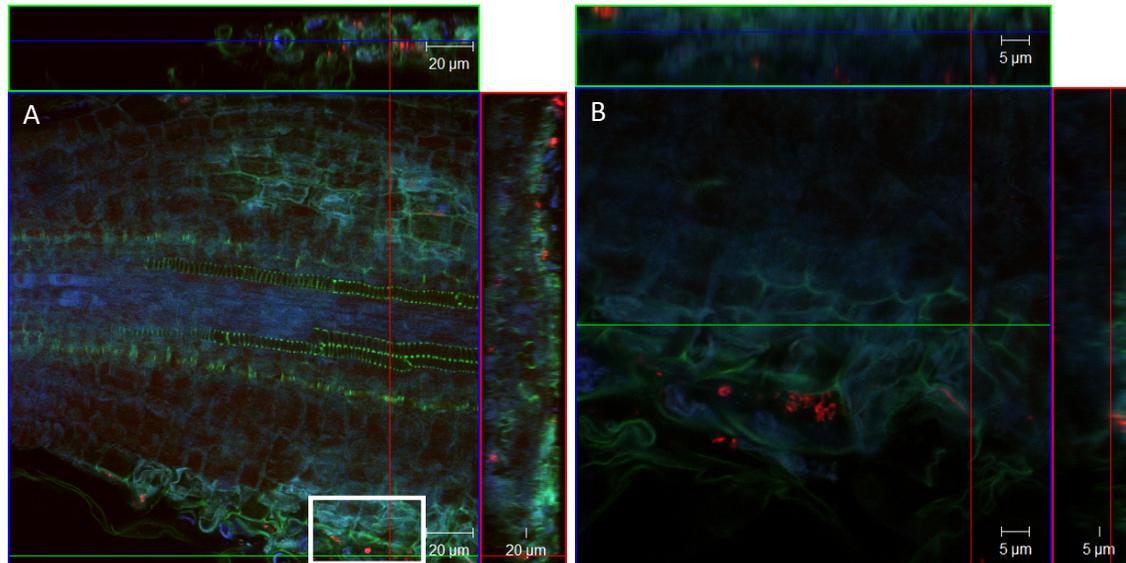


Abb. C.19: CLSM-Aufnahme einer Feldsalat-Wurzelspitze; Die Pflanze war mit *L. monocytogenes* sv. 4b inokuliert worden; Inokulationsdichte: 4×10^6 CFU/ml; Verwendete Sonden: EUB-Mix Cy3 (rot), Lis-1255 Cy5 (blau); Bild B ist eine Vergrößerung des in Bild A markierten Ausschnitts

Auf älteren Wurzelteilen konnten nur wenige Bakterien nachgewiesen werden (Abb. C.20.A). Die Bakterienkolonien wurden bei diesem Inokulationsansatz wiederum in Zellzwischenräumen der Wurzeloberfläche detektiert (Abb. C.19.B und Abb. C.20.B).

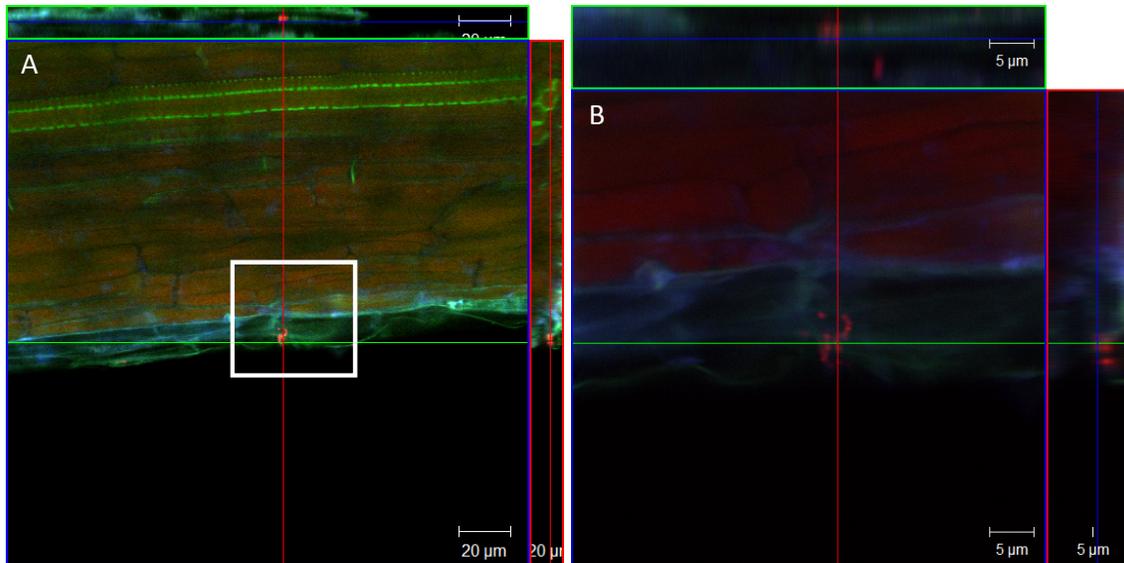


Abb. C.20: CLSM-Aufnahme einer Feldsalat-Wurzel; Die Pflanze war mit *L. monocytogenes* sv. 4b inokuliert worden; Inokulationsdichte: 4×10^6 CFU/ml; Verwendete Sonden: EUB-Mix Cy3 (rot), Lis-1255 Cy5 (blau); Bild B ist eine Vergrößerung des in Bild A markierten Ausschnitts

Bei allen FISH-Analysen der hier beschriebenen Inokulationsversuche mit *S. enterica* ssp. Weltevreden und *L. monocytogenes* sv. 4b konnte eine Besiedlung des Sprosses nicht eindeutig nachgewiesen werden.

C.4.3 Inokulationsversuche mit GFP-markierten *L. monocytogenes* Stämmen

Die Verwendung von Green-Fluorescent-Protein (GFP) markierten *L. monocytogenes* Stämmen ermöglichte die direkte Detektion der Bakterien mittels CLSM.

Bei Spinat, der mit *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E pSOD-GFP inokuliert worden war, konnten bei der CLSM-Analyse der Basis des Sprosses Fluoreszenzsignale im entsprechenden Kanal (grün) nachgewiesen werden. Diese waren hauptsächlich in Zellzwischenräumen des Pflanzengewebes zu lokalisieren (Abb. C.21).

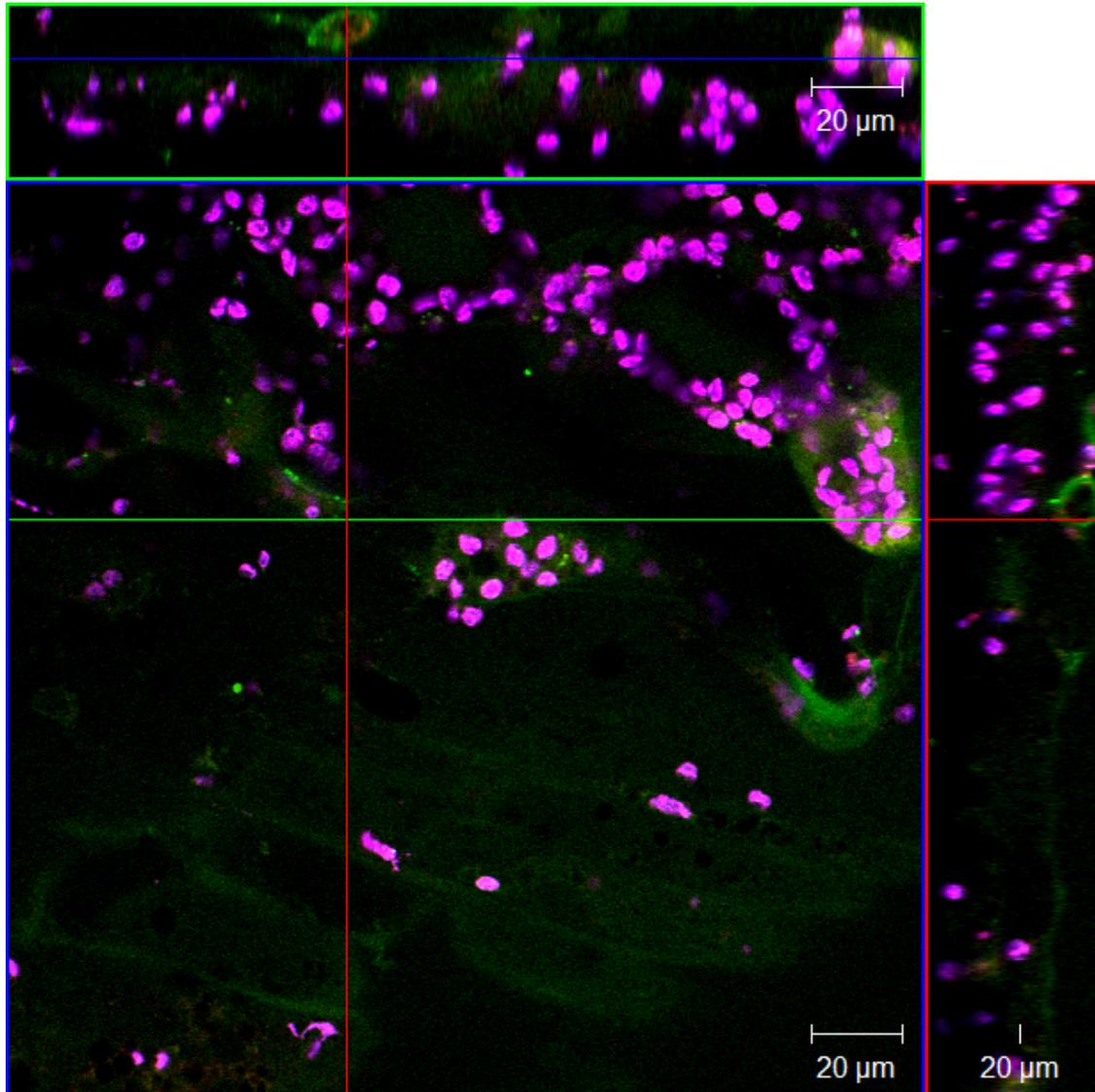


Abb. C.21: CLSM Aufnahme der Basis eines Spinatsprosses; Die Pflanze wurde mit *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E pSOD-GFP inokuliert

Bei mit *L. monocytogenes* sv. 4b pSOD-GFP inokuliertem Feldsalat konnte jedoch eine Besiedlung des Sprosses nicht eindeutig nachgewiesen werden. In Abb.C.22 wird eine CLSM-Aufnahme der Blattoberfläche gezeigt. Die Bilder A-C stellen die einzelnen Fluoreszenzkanäle und Bild D eine Überlagerung der Fluoreszenzkanäle dar. Bei den Abbildungen C.22.C und C.22.D sind Fluoreszenzsignale im Fluorescein-Kanal zu erkennen, die in Größe und Form an Bakterien erinnern. Da allerdings ebenfalls in Abb.C.22.B an den selben Stellen Fluoreszenzsignale im Cy3-Kanal detektiert wurden, muss hier von autofluoreszierenden Partikeln ausgegangen werden.

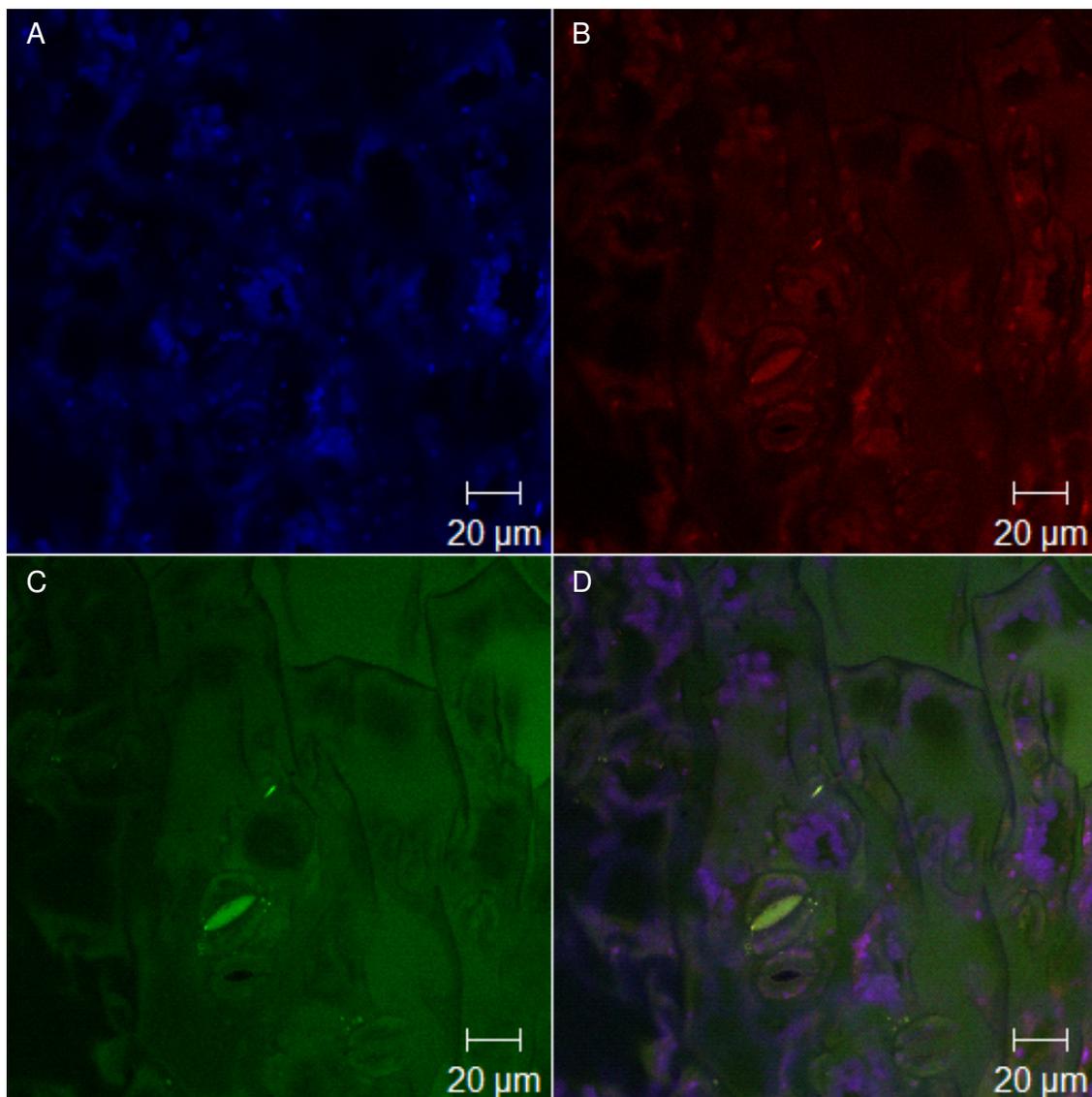


Abb. C.22: CLSM-Aufnahme eines Feldsalatblatts; Die Pflanze wurde mit *L. monocytogenes* sv. 4b pSOD-GFP inokuliert; Bilder A-C zeigen die einzelnen Fluoreszenzkanäle; Bild D ist eine Überlagerung der Fluoreszenzkanäle

C.5 Inokulationsansätze im Bodensystem

Diese Versuche wurden durchgeführt, um in einem der Natur angenäherten System einerseits die minimale im Hofdünger benötigte Bakteriendosis zu finden, bei der eine Übertragung dieser auf die eingesetzten Pflanzen stattfindet. Andererseits sollten mögliche Einflüsse von eingesetzter Bakterien-, Pflanzen- sowie Hofdüngerart auf die Besiedlung der Pflanze analysiert werden.

C.5.1 Nachweis einer Besiedlung der inokulierten Pflanzen mittels selektiver Anreicherung sowie spezifischer PCR

Der Nachweis von *S. enterica* ssp. Weltevreden erfolgte ausschließlich mittels spezifischer PCR (B.8). Für den Nachweis der eingesetzten *L. monocytogenes* Serovaren wurde sowohl die PCR als auch die selektive Anreicherung (B.6.1) verwendet. Die erhaltenen PCR-Amplifikate wurden zusätzlich sequenziert (B.8.3), um mögliche falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Bei den im Folgenden als positiv bezeichneten Proben wurde das jeweilig eingesetzte Bakterium mit zumindest einer der verwendeten Methoden nachgewiesen.

C.5.1.1 Kolonisierung durch *S. enterica* ssp. Weltevreden

Bei Spinatpflanzen, die mit *S. enterica* ssp. Weltevreden versetzter Gülle kontaminiert worden waren, konnte das eingesetzte Bakterium in 4 von 5 Wurzelproben der Inokulationsdichte 4×10^5 CFU/ml sowie in allen Proben höherer Inokulationsdichten nachgewiesen werden. Sowohl in 4 von 5 Waschflüssigkeitsproben der Wurzel bei einer Inokulationsdichte von 4×10^5 CFU/ml als auch in allen Proben der Inokulationsdichten 4×10^6 und 4×10^7 CFU/ml und in 3 von 5 Proben der Inokulationsdichte 4×10^8 CFU/ml wurde eine Kontamination mit *S. enterica* festgestellt. Eine Besiedlung des Sprosses mit den eingesetzten Bakterien konnte in 1 von 5 Proben der Inokulationsdichten 4×10^5 und 4×10^6 CFU/ml sowie in 2 von 5 Proben der Inokulationsdichten 4×10^6 und 4×10^8 CFU/ml nachgewiesen werden. Bei zwei der untersuchten Waschflüssigkeitsproben des Sprosses (Inokulationsdichte 4×10^7 und 4×10^8 CFU/ml) konnte eine Kontamination mit dem verwendeten Bakterium festgestellt werden (Abb. C.23).

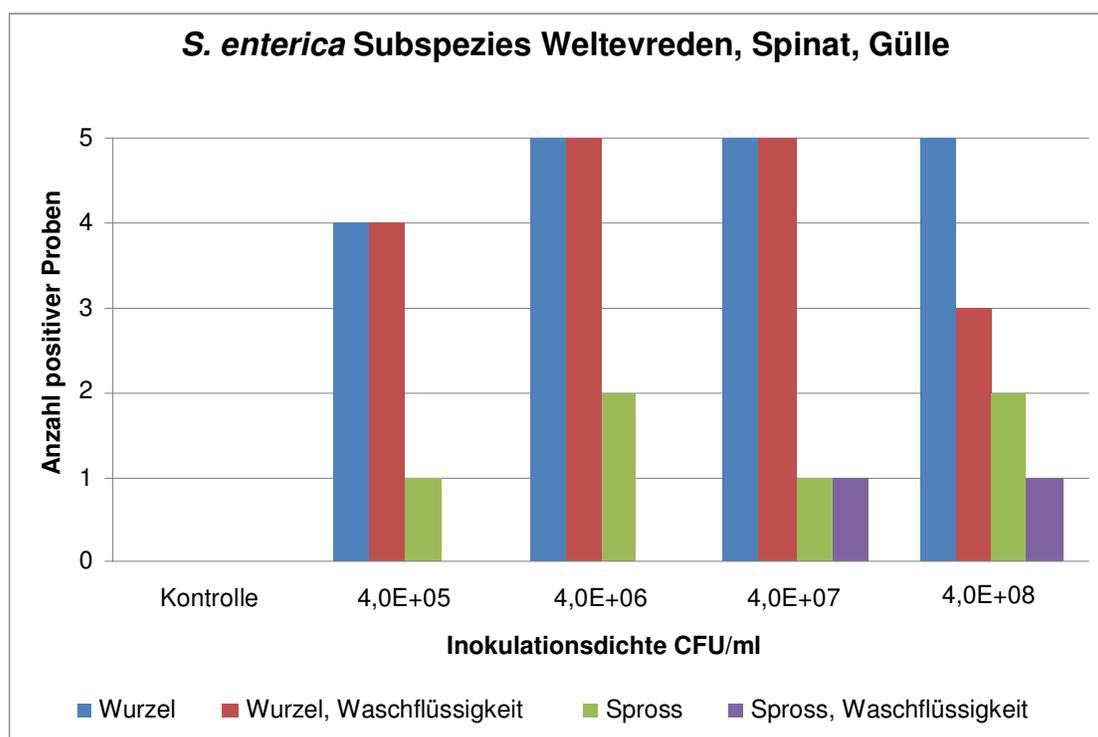


Abb. C.23: Kolonisierung von Spinatpflanzen im Bodensystem nach Düngung mit *S. enterica* ssp. Weltevreden versetzter Gülle: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf das verwendete Bakterium getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig eingesetzte Inokulationsdichte in CFU/ml Gülle (X-Achse)

Bei Verwendung von Stallmist, der mit *S. enterica* ssp. Weltevreden versetzt worden war, konnte das eingesetzte Bakterium in 2 von 5 Proben von Spinat bei der Inokulationsdichte 4×10^5 CFU/mg und in allen Proben höherer Inokulationsdichten nachgewiesen werden. In 4 von 5 Waschflüssigkeitsproben der Wurzel bei der Inokulationsdichte von 4×10^5 CFU/mg und bei allen Proben höherer Inokulationsdichten konnte eine Belastung mit *S. enterica* festgestellt werden. Zudem wurde in 1 von 5 Waschflüssigkeitsproben des Sprosses bei der Inokulationsdichte 4×10^7 CFU/mg und in 2 von 5 Proben der Inokulationsdichte 4×10^8 CFU/mg das eingesetzte Bakterium nachgewiesen. Bei keiner der analysierten Sprossproben jedoch konnte eine Kontamination mit *S. enterica* festgestellt werden (Abb. C.24).

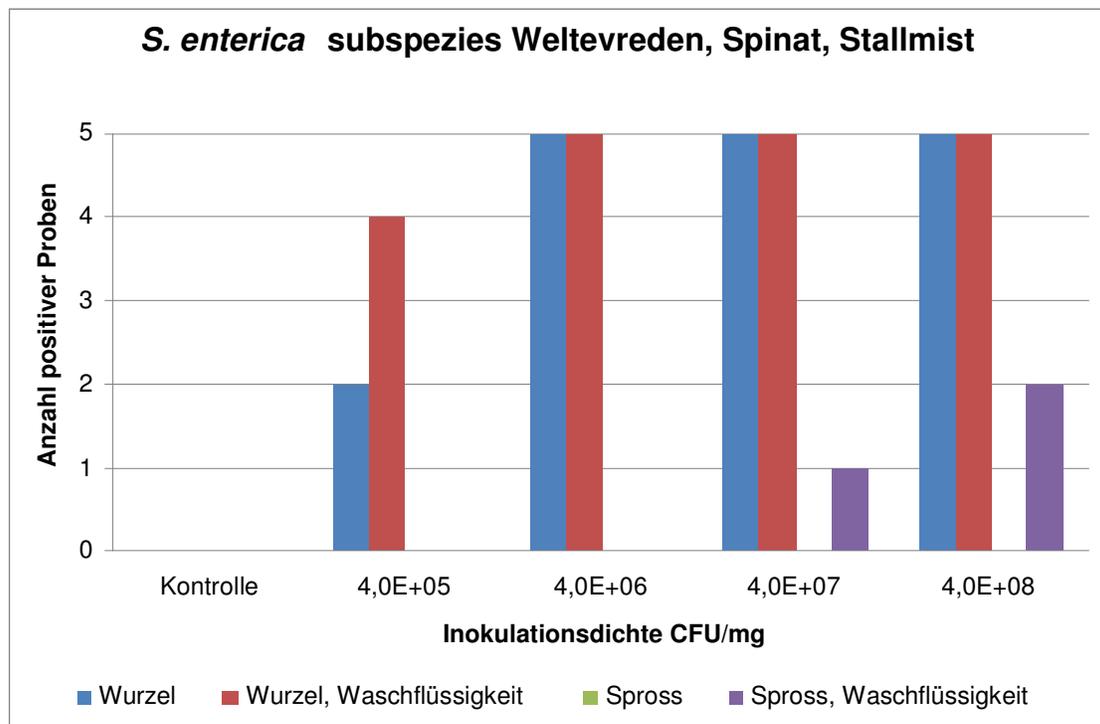


Abb. C.24: Kolonisierung von Spinatpflanzen im Bodensystem nach Düngung mit *S. enterica* ssp. Weltevreden versetztem Stallmist: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf das verwendete Bakterium getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig eingesetzte Inokulationsdichte in CFU/mg Stallmist (X-Achse)

Bei Feldsalatpflanzen, die mit *S. enterica* ssp. Weltevreden versetzter Gülle kontaminiert worden war, konnte in den Wurzelproben das verwendete Bakterium in 1 von 5 Proben der Inokulationsdichte 4×10^5 CFU/ml, in 2 von 5 Proben der Inokulationsdichte 4×10^6 CFU/ml, in 3 von 5 Proben der Inokulationsdichte 4×10^7 CFU/ml und in allen Proben der Inokulationsdichte 4×10^8 CFU/ml nachgewiesen werden. Zudem wurde eine Belastung mit *S. enterica* in jeweils 4 der 5 Waschflüssigkeitsproben der Wurzel bei Inokulationsdichten von 4×10^5 , 4×10^6 und 4×10^7 CFU/ml sowie in allen Proben der Inokulationsdichte 4×10^8 festgestellt. Eine Besiedlung des Sprosses durch das eingesetzte Bakterium konnte in 1 von 5 Proben der Inokulationsdichte 4×10^6 CFU/ml, in 2 von 5 Proben der Inokulationsdichte 4×10^7 CFU/ml nachgewiesen werden. In ausschließlich einer Probe der Waschflüssigkeit des Sprosses konnte bei einer Inokulationsdichte von 4×10^7 CFU/ml eine Kontamination mit *S. enterica* festgestellt werden (Abb. C.25).

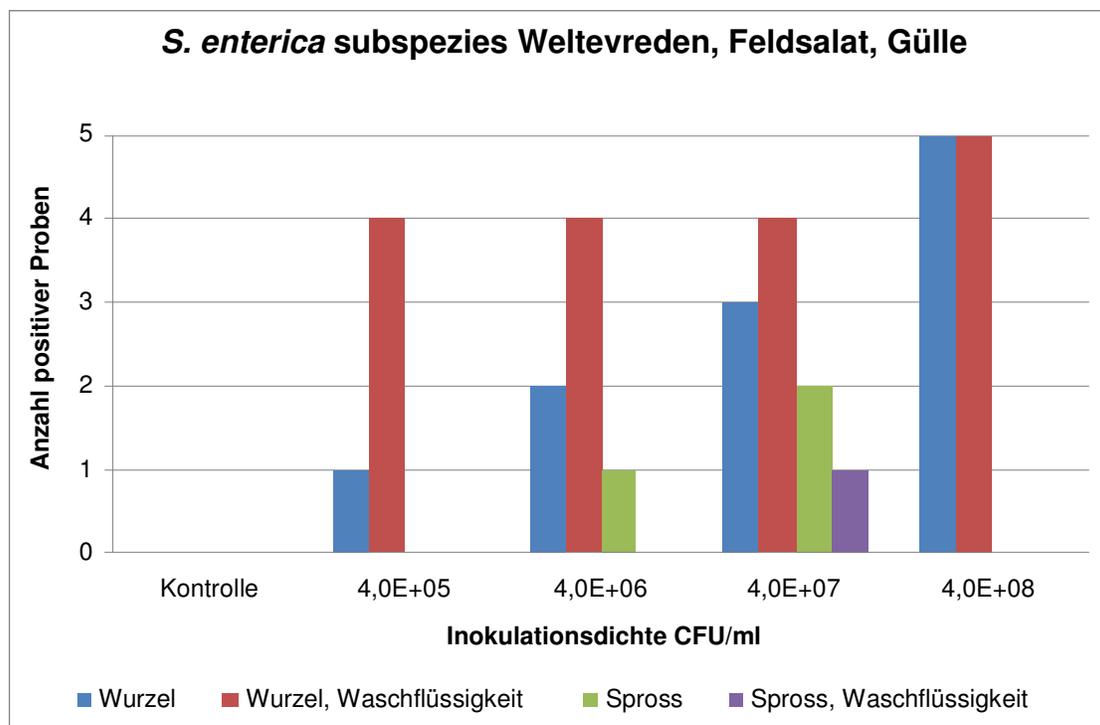


Abb. C.25: Kolonisierung von Feldsalat im Bodensystem nach Düngung mit *S. enterica* ssp. Weltevreden versetzter Gülle: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf das verwendete Bakterium getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig eingesetzte Inokulationsdichte in CFU/ml Gülle (X-Achse)

In dem entsprechenden Ansatz, in dem mit *S. enterica* ssp. Weltevreden versetzter Mist für die Düngung von Feldsalat eingesetzt wurde, konnte das verwendete Bakterium nur in 1 von 5 Wurzelproben der Inokulationsdichte 4×10^6 CFU/mg sowie in jeweils 4 von 5 Proben der Inokulationsdichten 4×10^7 und 4×10^8 CFU/mg nachgewiesen werden. In 2 von 5 Waschflüssigkeitsproben der Wurzel bei einer Inokulationsdichte von 4×10^5 CFU/mg und in allen Proben höherer Inokulationsdichten wurde eine Belastung mit *S. enterica* festgestellt. Zudem konnte das eingesetzte Bakterium lediglich in 1 von 5 Sprossproben sowie in 3 von 5 Waschflüssigkeitsproben des Sprosses bei einer Inokulationsdichte von 4×10^8 CFU/mg nachgewiesen werden (Abb. C.26).

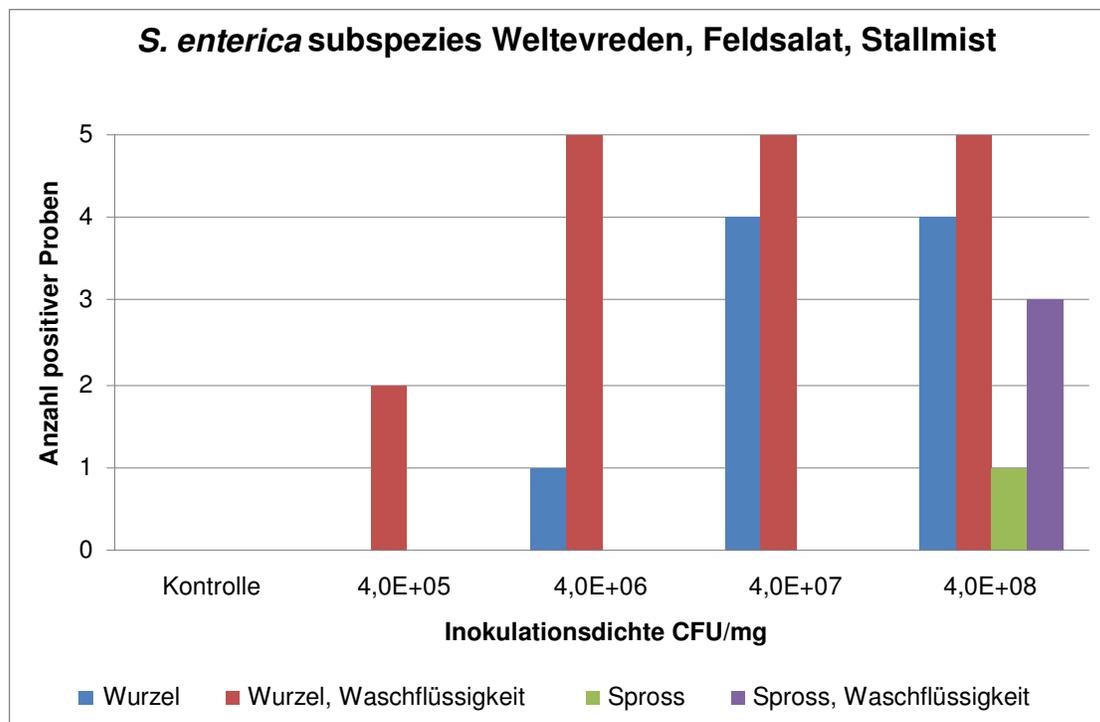


Abb. C.26: Kolonisierung von Feldsalat im Bodensystem nach Düngung mit *S. enterica* ssp. Weltevreden versetztem Stallmist: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf das verwendete Bakterium getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig eingesetzte Inokulationsdichte in CFU/mg Stallmist (X-Achse)

C.5.1.2 Kolonisierung durch *L. monocytogenes* sv. 4b

Sowohl bei den Ansätzen mit Spinat als auch mit Feldsalat, in denen Pflanzen im Bodensystem mit Gülle die mit *L. monocytogenes* sv. 4b pSOD-GFP versetzt worden war, gedüngt wurden, konnte *L. monocytogenes* in keiner der analysierten Proben nachgewiesen werden. Ergebnisse dieser Versuche werden daher hier nicht in Abbildungen gezeigt.

In den Versuchen, in denen Spinat mit *L. monocytogenes* sv. 4b versetztem Stallmist gedüngt worden war, konnte in 2 von 5 Wurzelproben der Inokulationsdichte 4×10^7 CFU/mg sowie in 1 von 5 Proben der Inokulationsdichte 4×10^8 CFU/mg das eingesetzte Bakterium nachgewiesen werden. Zudem wurde eine Belastung der Waschflüssigkeit der Wurzel mit *L. monocytogenes* in 1 von 5 Proben bei der Inokulationsdichte von 4×10^8 CFU/mg festgestellt. In keiner der untersuchten Spross- sowie Waschflüssigkeitsproben des Sprosses konnte das eingesetzte Bakterium nachgewiesen werden (Abb. C.27).

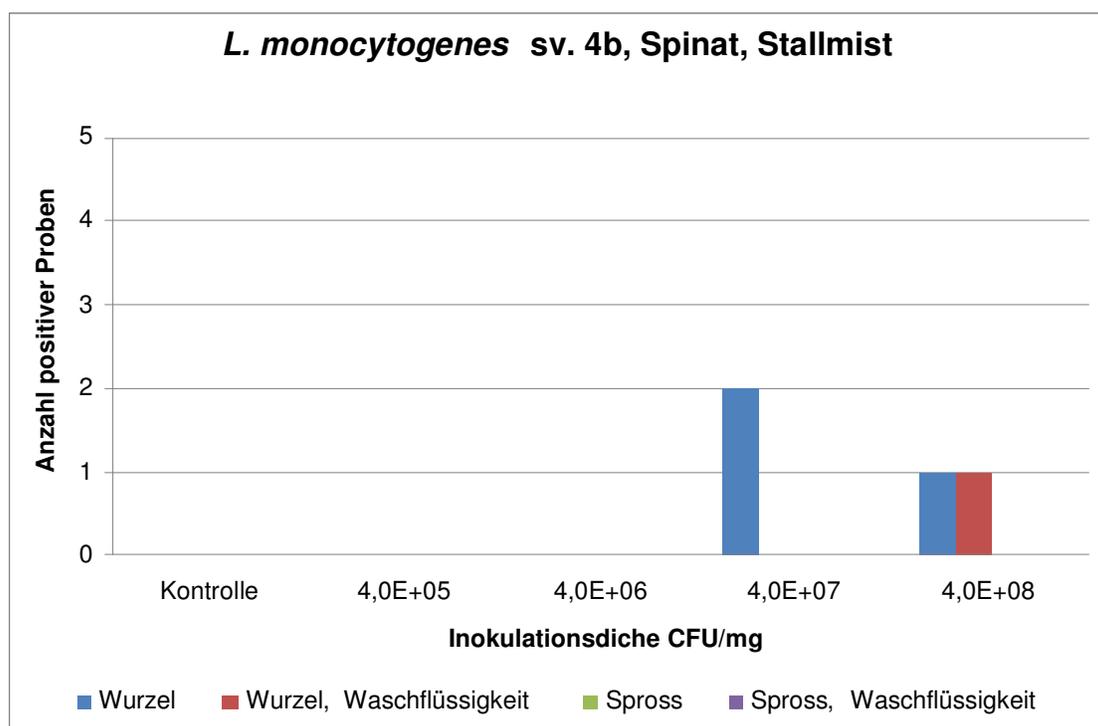


Abb. C.27: Kolonisierung von Spinat im Bodensystem nach Düngung mit *L. monocytogenes* sv. 4b versetztem Stallmist: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf das verwendete Bakterium getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig eingesetzte Inokulationsdichte in CFU/mg Stallmist (X-Achse)

Bei den Versuchen mit Feldsalat, der mit *L. monocytogenes* sv. 4b versetztem Stallmist gedüngt wurde, konnte in jeweils einer Wurzelprobe der Inokulationsdichten 4×10^6 und 4×10^7 CFU/mg das eingesetzte Bakterium nachgewiesen werden. In 1 von 5 Waschflüssigkeitsproben der Wurzel wurde eine Belastung mit *L. monocytogenes* bei einer Inokulationsdichte von 4×10^8 CFU/mg festgestellt. Das verwendete Bakterium konnte zudem in jeweils 1 von 5 Waschflüssigkeitsproben des Sprosses bei den Inokulationsdichten 4×10^6 und 4×10^8 CFU/mg nachgewiesen werden. Außerdem wurde in einer der Kontrollpflanzen eine Kontamination einer Sprossprobe mit *L. monocytogenes* sowohl durch selektive Anreicherung als auch durch spezifische PCR festgestellt (Abb. C.28).

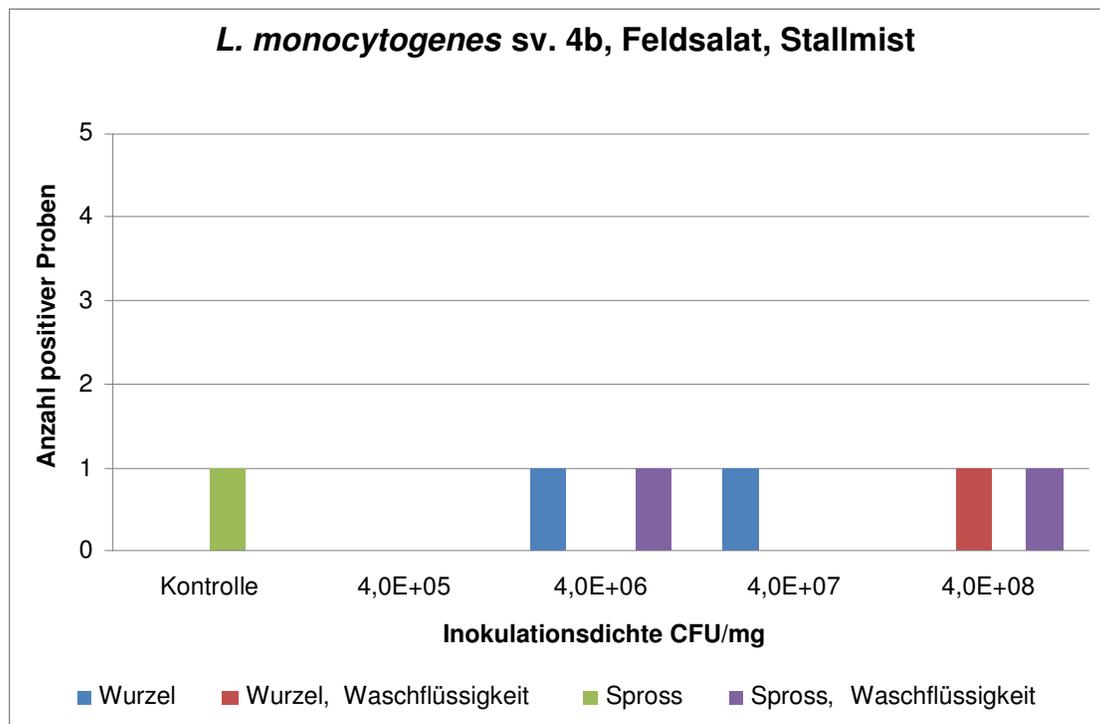


Abb. C.28: Kolonisierung von Feldsalat im Bodensystem nach Düngung mit *L. monocytogenes* sv. 4b versetztem Stallmist: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf das verwendete Bakterium getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig eingesetzte Inokulationsdichte in CFU/mg Stallmist (X-Achse)

C.5.1.3 Kolonisierung durch *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E

In keiner Probe der Inokulationsansätze von Feldsalat im Bodensystem mit *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E versetzter Gülle bzw. Stallmist konnte das eingesetzte Bakterium nachgewiesen werden. Ergebnisse dieser Versuche werden daher hier nicht in Abbildungen gezeigt.

In den Ansätzen mit Spinat der mit *L. monocytogenes* sv.1/2a EGD-E versetzter Gülle gedüngt worden war, konnte das eingesetzte Bakterium in jeweils 1 von 5 Wurzelproben der Inokulationsdichten 4×10^6 und 4×10^8 CFU/ml nachgewiesen werden. Ebenfalls in 1 von 5 Waschflüssigkeitsproben der Wurzel bei der Inokulationsdichte 4×10^8 CFU/ml wurde eine Belastung mit *L. monocytogenes* festgestellt. Ausschließlich in einer Sprossprobe konnte das eingesetzte Bakterium bei der Inokulationsdichte 4×10^6 CFU/ml nachgewiesen werden. In jeweils 1 von 5 Waschflüssigkeitsproben des Sprosses wurde eine Kontamination mit *L. monocytogenes* bei den Inokulationsdichten 4×10^7 und 4×10^8 CFU/ml festgestellt (Abb. C.29).

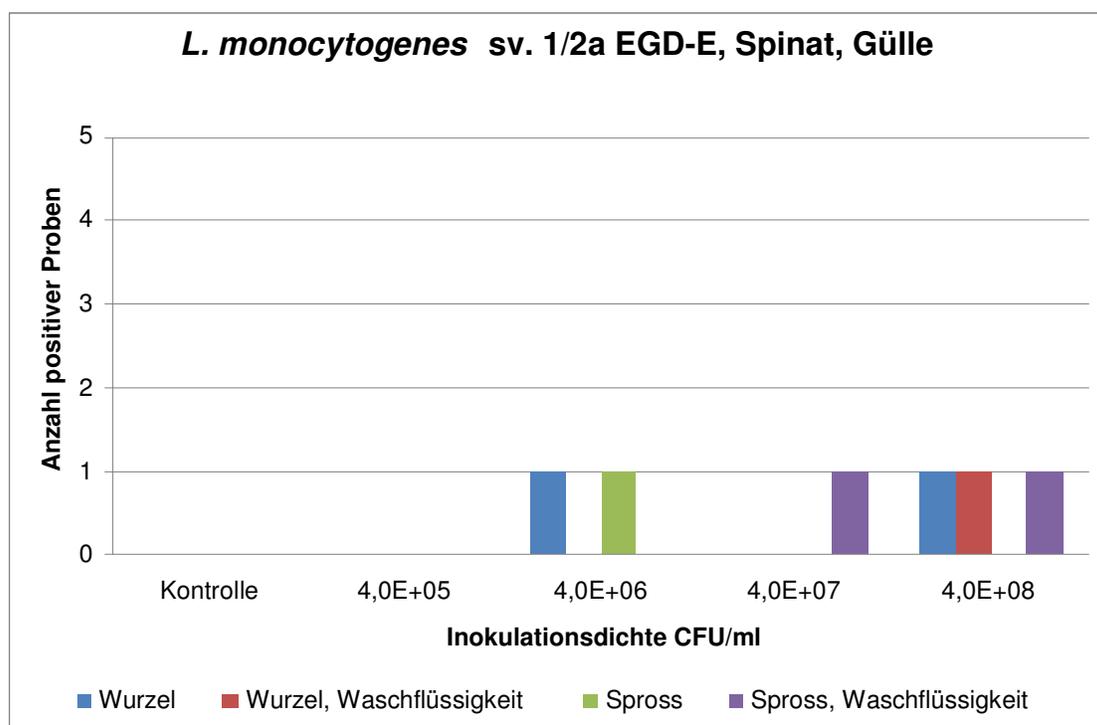


Abb. C.29: Kolonisierung von Spinat im Bodensystem nach Düngung mit *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E versetzter Gülle: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf das verwendete Bakterium getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig eingesetzte Inokulationsdichte in CFU/ml Gülle (X-Achse)

Das eingesetzte Bakterium konnte nach Düngung von Spinat mit *L. monocytogenes* sv.1/2a EGD-E versetztem Stallmist nur in einer Wurzelprobe bei der Inokulationsdichte 4×10^5 CFU/mg nachgewiesen werden. Bei keiner der übrigen Proben wurde eine Kontamination der Pflanze oder der Waschflüssigkeit mit *L. monocytogenes* festgestellt (Abb. C.30).

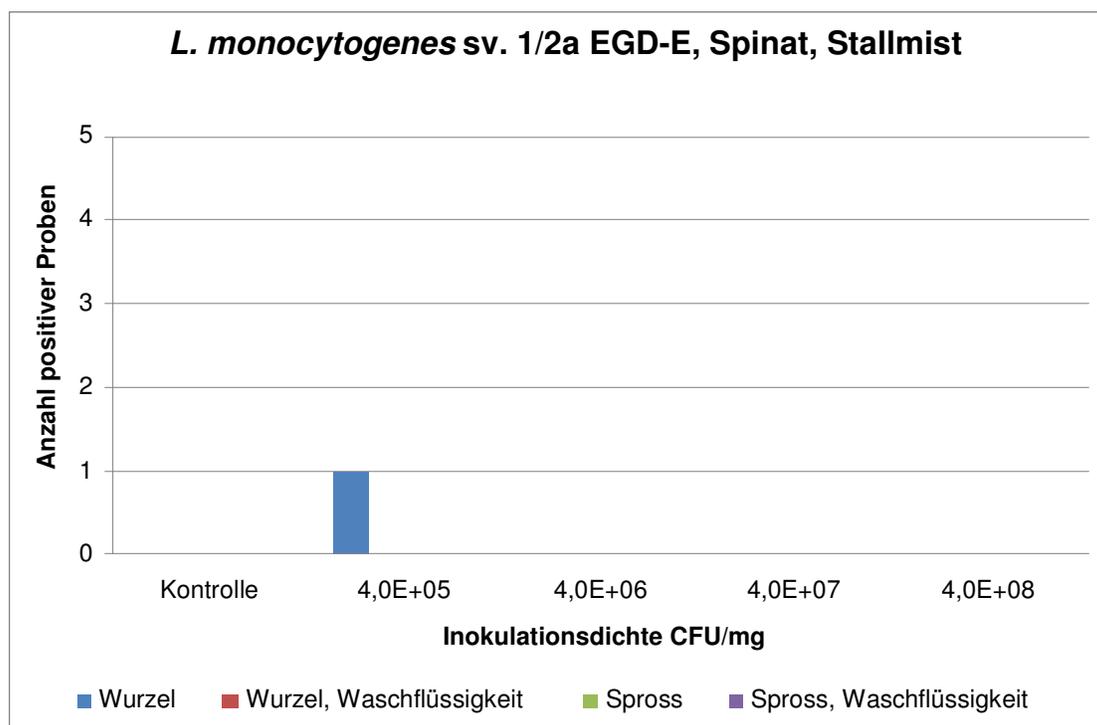


Abb. C.30: Kolonisierung von Spinat im Bodensystem nach Düngung mit *L. monocytogenes* sv.1/2a EGD-E versetztem Stallmist: Die Abbildung zeigt die Anzahl positiv auf das verwendete Bakterium getesteter Proben (Y-Achse) für die jeweilig eingesetzte Inokulationsdichte in CFU/mg Stallmist (X-Achse)

C.5.2 CLSM-Analysen der Inokulationsansätze im Bodensystem

Eine eindeutige Detektion der inokulierten Bakterien mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung war nicht möglich. Bei keiner der untersuchten Proben der Ansätze im Bodensystem konnte *S. enterica* oder *L. monocytogenes* auf der Oberfläche oder im Gewebe von Wurzel und Spross nachgewiesen werden. Der Einsatz von *L. monocytogenes* sv. 4b pSOD-GFP blieb ebenfalls erfolglos. Weder mit den eingesetzten Anreicherungskultur- und PCR-gestützten Nachweismethoden (C.5.1) noch mittels CLSM-Analyse konnten die Bakterien detektiert werden.

D Diskussion

D.1 Methoden

D.1.1 Selektive Anreicherung

Vor dem molekularbiologischen (PCR-gestützten) sowie dem kultivierungsbasierten Nachweis der jeweiligen Bakterien wurde zur Erhöhung der Zellzahl bei allen verwendeten Proben eine selektive Anreicherung durchgeführt. Dadurch sollte zum Einen das Detektionslimit gesenkt werden und zum Anderen konnte aufgrund dieser Methodik davon ausgegangen werden, dass lebende Bakterien detektiert werden. Quantitative Nachweismethoden waren nach den Anreicherungsritten jedoch nicht mehr möglich. Für den Nachweis von *S. enterica* ssp. Weltevreden mittels quantitativer PCR gaben Arthurson *et al.* (2011) ein Detektionslimit von 10^4 CFU/g Boden oder Pflanzenmaterial an. Ein ähnliches Detektionslimit von ca. 4×10^4 CFU/ml konnte für den PCR-gestützten Nachweis von *L. monocytogenes* aus unterschiedlichen Nahrungsmittelproben, unter anderem Alfalfa Sprossen, festgestellt werden. Mittels eines Anreicherungsrittes von 48 h in BLEB konnte in derselben Arbeit dieses jedoch auf ca. 3 CFU/25 g Pflanzenmaterial gesenkt werden (Chen *et al.*, 2011). Durch den Anreicherungsritt wird also ein sehr sensibler Nachweis lebensfähiger Bakterien ermöglicht.

In einem von Danyluk und Schaffner (2011) veröffentlichten Model versuchten die Autoren festzustellen, welche Zellzahlen von *E. coli* O157:H7 auf Spinatpflanzen vorhanden sein müssen, damit diese beim Verzehr ein Gefährdungspotenzial aufweisen, falls während der Weiterverarbeitung die Kühlkette nicht eingehalten wird. Sie kommen dabei zu dem Ergebnis, dass Zellzahlen von 10^{-1} CFU/g Pflanzenmaterial bei 0,1% der Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte ausreichend sind, um einen Ausbruch unter den Konsumenten auszulösen. Diese Studie stützt sich dabei auf Veröffentlichungen, bei denen zum Teil ein sehr starkes Wachstum von *E. coli* O157:H7 und auch von anderen pathogenen Bakterien auf verschiedenen Salat-

und Gemüsepflanzen nachgewiesen wurde, wenn diese nicht gekühlt gelagert wurden (Abdul-Raouf *et al.*, 1993; Lee & Baek, 2008; Chang & Fang, 2007). *Listeria monocytogenes* ist zudem in der Lage bei sehr geringen Temperaturen und geringem Nährstoffangebot zu wachsen (Seeliger & Jones, 1986), wodurch eine Vermehrung sogar auf gekühlten Lebensmitteln möglich ist. Daher ist es notwendig, pathogene Bakterien, wie in der hier vorgestellten Arbeit durchgeführt, aus Pflanzenproben auch in sehr geringen Zellzahlen nachzuweisen.

Während des kulturellen Nachweises von *Listeria* spp. wurden Halb-FRASER-Bouillon und anschließender Subkultivierung auf Oxford- und Palcam-Agarplatten verwendet. Bei dem Anreicherungsschritt in halb FRASER Bouillon kann ein Überwachsen der eventuell in den Proben vorhandenen *L. monocytogenes* Zellen durch nicht pathogene *L. innocua*, wie von Cornu *et al.* (2002) und Besse *et al.* (2010) nachgewiesen, stattfinden. Einige Studien befassten sich mit der Verwendung und dem Vergleich unterschiedlicher chromogener Medien zur Identifizierung von *L. monocytogenes* (Garrec, 2003; Pangloli *et al.*, 2007; Stessl *et al.*, 2009). Diese basieren auf zwei Reaktionen. Zum einen auf 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranosid, welches von allen *Listeria* spp. mittels der β -D Glucosidase gespalten werden kann. Zudem werden die pathogenen *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* durch ihre Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C-Aktivität von den nicht pathogenen *Listeria* spp. unterschieden (Notermans *et al.*, 1991). *Listeria* spp. zeigen auf diesen Agarplatten typischerweise ein türkis-blaues Koloniewachstum, wobei die Kolonien pathogener *Listeria*-Arten zusätzlich von einem durchscheinenden Ring umgeben sind (Ottaviani *et al.*, 1997). Hierbei erwies sich das in dieser Arbeit verwendete Rapid´L.mono Medium als sehr sensitiv und sehr spezifisch (Pangloli *et al.*, 2007). Allerdings wurde in einer weiteren Studie festgestellt, dass unterschiedliche *L. monocytogenes* Stämme auf Oxford- und/oder Palcam-Platten sowie Rapid´L.mono Medium nur sehr langsam wachsen und teilweise untypische Kolonien bilden (Leclercq, 2004), was den Nachweis dieser Bakterien erschwert. Der kombinierte Einsatz mehrerer Nachweismedien und ein zusätzlicher Nachweis mit molekularbiologischen Methoden, wie in dieser Arbeit durchgeführt, sind daher unerlässlich.

D.1.2 DNA-Extraktion

Um eine möglichst qualitativ und quantitativ hochwertige Ausbeute bei der Extraktion von hochmolekularer DNA aus *L. monocytogenes* zu erzielen, wurden unterschiedliche Lyse-Matrizes sowie eine Vorbehandlung der Bakterienzellen mit Mutanolysin unter Verwendung des „Bio 101 FastDNA® SPIN Kit for Soil“, getestet. Dieses Kit wurde in mehreren aktuellen Studien an Bodenproben mit anderen Kits sowie klassischen Extraktionsmethoden verglichen (Dineen *et al.*, 2010; Töwe und Wallisch *et al.*, 2011; Mahmoudi *et al.*, 2011). Dabei konnte mit dem „Bio 101 FastDNA® SPIN Kit for Soil“ bei diesen Vergleichen stets die größte DNA-Menge isoliert werden. Zusätzlich wurde allerdings auch der höchste Gehalt an PCR-inhibierenden Stoffen wie z.B. Huminsäuren festgestellt. Da in dieser Arbeit aber die DNA aus Pflanzenmaterial und erst nach Anreicherung isoliert wurde, sollten einerseits die PCR-inhibierenden Stoffe stark verdünnt und andererseits die DNA angereichert sein. Die Anwesenheit PCR-inhibierender Stoffe konnte jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Mit der im Kit enthaltenen „Lyse Matrix E“, die für Bodenproben empfohlen wird, konnte der höchste DNA-Gehalt bei den durchgeführten Extraktionen erhalten werden (Tab. C.1). Die unter B.7.1 beschriebene Wirkung von Mutanolysin auf die Zellwand Gram-positiver Bakterien führte zu einer zusätzlichen Steigerung des DNA-Gehaltes. Somit konnte eine, für die in dieser Arbeit durchzuführenden Analysen, sehr gut geeignete Methodik zur Extraktion von DNA etabliert werden.

D.1.3 PCR-Nachweis

Für den PCR-Nachweis von *L. monocytogenes* wurde das Primerpaar monoA/monoB (Bubert *et al.*, 1992), und für den Nachweis von *S. enterica* ssp. Weltevreden das Primerpaar invAf/invAr (Rahn *et al.*, 1992) verwendet. Um einen eindeutigen Nachweis der jeweiligen Gene, die spezifisch für die jeweiligen Bakterien sind, zu ermöglichen, wurden die PCR-Bedingungen in Vorversuchen optimiert. Aufgrund der Verwendung des „TopTaq Polymerase“ PCR Systems, bei dem laut Herstellerangaben eine Annealing-Temperatur von 60°C obligat für die meisten Primer-Template-Systeme ist, konnten optimale PCR-Bedingungen nicht ausschließlich über die Anpassung der Annealing-Temperatur eingestellt werden. Dies

wurde durch Optimierung der jeweiligen Primerkonzentration sowie der jeweiligen MgCl₂-Konzentration für beide Nachweissysteme erreicht. Zudem wurde festgestellt, dass die Verwendung eines „Touch-Down“ PCR-Programmes nach Don *et al.* (1991) notwendig war, um die Spezifität der PCR weiter zu erhöhen (Ergebnisse der Vorversuche hier nicht gezeigt). Abschließend wurden die PCR-Fragmente sequenziert, um falsch-positive Ergebnisse endgültig ausschließen zu können.

Bei zwei Hofdüngerproben (Tab. C.4) sowie einer Waschflüssigkeitsprobe eines Sprosses und einer Wurzelprobe der Inokulationsversuche im Bodensystem konnte *L. monocytogenes* mittels Anreicherung, jedoch nicht mittels PCR, nachgewiesen werden. Wie in D.1.3 beschrieben, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Huminsäuren nach der DNA-Extraktion in den Proben befanden. Diese hätten die Amplifikation von DNA unterbinden können und somit zu einem falsch negativen Nachweisreaktion führen können (Tsai & Olson, 1992; Tebbe & Vahjen, 1993). Allerdings konnten auch in zwei Wurzel- sowie einer Sprossprobe der Inokulationsversuche im Bodensystem *L. monocytogenes* mittels PCR nachgewiesen werden, obwohl der Nachweis mit „Rapid´L.mono Medium“ negativ war. Einerseits könnten hierbei nicht lebensfähige Bakterien nachgewiesen worden sein, deren DNA noch in den Proben vorhanden war. Andererseits wurde möglicherweise in diesen Fällen *L. monocytogenes*, wie in Punkt D.1.2 beschrieben, von anderen im Boden oder dem verwendeten Hofdünger vorhandenen *Listeria* spp. überwachsen. Letztere Annahme konnte vor allem für die zwei Wurzelproben bestätigt werden, da hier ein starkes Wachstum von *Listeria* spp. mittels Halb-FRASER-Bouillon, Oxford- und Palcam-Medium detektiert wurde. Insgesamt kann auch hier festgestellt werden, dass es für den eindeutigen und sicheren Nachweis von *L. monocytogenes* unerlässlich ist, sowohl Anreicherungskultur- als auch PCR-gestützte Methoden zu verwenden.

D.1.4 FISH und CLSM Analyse

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung sowie der Einsatz von GFP-markierten Bakterien mit anschließender Analyse durch konfokale Mikroskopie wurden verwendet, um die jeweiligen Bakterien mit den in Punkt B.9 angegebenen

Oligonukleotidsonden nachzuweisen und zu lokalisieren und somit die jeweiligen Besiedlungsstellen auf Wurzel und Spross zu identifizieren.

Bei fixierten Wurzelproben der Inokulationsversuche im axenischen System konnte mit Hilfe des bakterienspezifischen Sondenmix EUB-338, I, II, III eine Besiedlung in allen Ansätzen nachgewiesen werden. Der gleichzeitige Einsatz der *Salmonella* spp. spezifischen Sonde Salm-63 sowie der *Listeria* spp. spezifischen Sonde Lis-1255 war jedoch nicht erfolgreich. In keinem der Ansätze konnten Signale dieser Sonden detektiert werden (Abb. C.14 - C.17, C.19, C.20). Bei Vorversuchen mit Reinkulturen der jeweiligen Bakterien konnten dagegen mit den spezifischen Sonden Signale detektiert werden (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Diese waren jedoch deutlich schwächer als die entsprechenden Signale des Sondenmixes EUB-338, I, II, III. In diesen Vorversuchen befanden sich die Bakterien der Reinkulturen zum Zeitpunkt der Fixierung in der exponentiellen Wachsumsphase. Es kann davon ausgegangen werden, dass daher eine größere Kopienzahl von 16S rRNA molekülen in den jeweiligen Bakterienzellen vorhanden war, als dies für die Bakterien im axenischen System der Fall war. Aufgrund der geringeren Anzahl von Zielsequenzen war die Anzahl der spezifisch gebundenen Sonden zu gering um ein detektierbares Signal zu ergeben, wogegen die Menge des gebundenen EUB-338, I, II, III, Sondenmixes dafür ausreichend war. Da bei diesen Ansätzen jedoch davon ausgegangen werden kann, dass ausschließlich die inokulierten Bakterien im System vorhanden sind, ist der Nachweis von Bakterien im Allgemeinen hier ausreichend. Des Weiteren konnten in keiner der untersuchten Sprossproben dieser Ansätze Bakterien eindeutig detektiert werden. Zwar konnten mittels GFP-markierter Bakterien Signale an der Basis eines Spinatsprosses nachgewiesen werden (Abb. C.21), von einem eindeutigen Nachweis kann aufgrund von stark autofluoreszenten Strukturen des Pflanzengewebes, wie in Abb. C.22 gezeigt, nicht ausgegangen werden. Ähnliches konnte für Wurzel und Sprossproben von Pflanzen der Inokulationsversuche mit *S. enterica* ssp. Weltevreden im Bodensystem festgestellt werden. Hier konnten ebenfalls aufgrund stark autofluoreszierender Partikel keine Signale eindeutig den gesuchten Bakterien zugeordnet werden. Autofluoreszenz wurde bei Pflanzen schon häufiger beobachtet und konnte sowohl dem Pflanzengewebe, hier vor allem Blättern, als auch anhaftenden Bodenpartikeln zugeordnet werden (Amann *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 2001, Fischer *et al.*, 2011). Bei den Ansätzen im Bodensystem mit den *L. monocytogenes* Serovariationen wurde keine FISH-Analyse durchgeführt,

da die zur Hybridisierung verwendete Sonde Lis-1255, wie von Wagner *et al.* (1998) beschrieben, sowie auch weitere 16S rRNA gerichtete *Listeria*-Sonden (Brehm-Stecher *et al.*, 2005) nur für *Listeria* spp. spezifisch sind. In den zu untersuchenden Proben konnten mittels Halb-FRASER-Bouillon sowie Oxford-, Palcam- und Rapid`L.mono Medium andere *Listeria* spp. als *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Ein eindeutiger Nachweis der eingesetzten Bakterien wäre daher mit diesen Sonden nicht möglich gewesen.

D.2 Pathogenbelastung der untersuchten Hofdüngerproben

Die chemischen Analysen der in Deutschland genommenen Hofdüngerproben ergaben Werte, die sich nur wenig von den Hofdüngerproben der Kooperationspartner innerhalb des PathOrganic Projektes unterschieden (persönliche Kommunikation). Erwartungsgemäß zeigten sich die größten Unterschiede bei den gemessenen Parametern im Vergleich zwischen Gülle und festem Mist (Tab. C2 und Tab C.3). Eine eindeutige Korrelation zwischen einem der untersuchten Parameter und der Belastung der Hofdüngerproben mit *L. monocytogenes* konnte für die in Deutschland genommenen Proben jedoch aufgrund der in D.1.1 genannten geringen Probenanzahl nicht festgestellt werden.

Der Nachweis pathogener Bakterien aus allen analysierten Hofdüngerproben ergab, dass in etwa 15% aller Gülleproben *L. monocytogenes* molekularbiologisch nachgewiesen werden konnte. Die Proben der anderen Arten biologischen Düngers waren dagegen mit unter 10% deutlich weniger häufig belastet. Ähnliches konnte für die weiteren untersuchten pathogenen Bakterien beobachtet werden (Abb. C.1). Hierbei spielt der Feuchtigkeitsgehalt des jeweiligen Hofdüngers eine wichtige Rolle. Die Anzahl belasteter Proben sowie die jeweilige Bakteriendichte erhöhen sich hierbei mit steigendem Feuchtigkeitsgehalt (Hutchison *et al.*, 2004a). Der Gesamtanteil der mit *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. kontaminierten Proben unterschied sich mit ca. 11% bzw. ca. 10% nur gering von dem, der bei Hutchison *et al.* (2005) für eine ähnlich angelegte Probenahme beschrieben wurde. Für *L. monocytogenes* und enterohämorrhagische *E. coli* sind die Zahlen dieser Veröffentlichung aufgrund methodischer Unterschiede nicht vergleichbar. Erhöhte

Temperaturen während der Lagerung und Verarbeitung (z.B. Kompostieren oder Fermentieren) der anderen Hofdüngerarten können ebenfalls zur Verringerung der Pathogenbelastung beitragen. Wang *et al.* (1996) sowie Kudva *et al.* (1998) haben in Laborversuchen nachgewiesen, dass sich die Anzahl inokulierter *E. coli* O157:H7 in Gülle und Mist bei Temperaturen über 23°C schneller verringert, als bei niedrigeren Temperaturen. Zudem wurde von Platz (1977) beschrieben, dass eine Kompostierung von Hühner-Mist mit einer Temperaturerhöhung zu einer Eliminierung aller untersuchten pathogenen Bakterien mit Ausnahme von *L. monocytogenes* führte. Eine mit der Temperatursteigerung einhergehende Erhöhung des pH-Wertes wurde als zusätzlicher Grund hierfür angeführt.

Bei ca. 18% der insgesamt 151 analysierten Hofdüngerproben konnte keines der untersuchten pathogenen Bakterien nachgewiesen werden. Dabei wurde festgestellt, dass 55% der Proben von kompostiertem Mist sowie 30% der Stapelmistproben frei von Pathogenbelastung waren (Abb. C.2). Wiederum können der niedrige Flüssigkeitsgehalt in Verbindung mit hohen Temperaturen bei Lagerung und Weiterverarbeitung sowie ein daraus resultierender erhöhter pH-Wert Gründe für diese Ergebnisse sein. Diese Annahmen werden auch durch Vinnerås (2007) gestützt. Hier werden Kompostieren sowie eine herbeigeführte Erhöhung des pH-Wertes auf über 9 als effektive Methoden zur Kontrolle humanpathogener Bakterien wie *Salmonella* spp. beschrieben. Zudem konnten aus kompostiertem Mist Bakterien isoliert werden, die Bakteriozin-ähnliche Substanzen produzieren, welche das Wachstum verschiedener pathogener Bakterien wirksam einschränkten (Abdel-Mohsein *et al.*, 2010). Im Vergleich hierzu waren 97% der Gülleproben mit mindestens einem der untersuchten Bakterien kontaminiert (Abb. C.2).

Der Vergleich der unterschiedlichen Bewirtschaftungsformen ergab eine höhere Belastung von konventionell produziertem Hofdünger mit pathogenen *E. coli*, *L. monocytogenes* und *Campylobacter* spp.. Organisch produzierter Hofdünger dagegen war häufiger mit *Salmonella* spp. und *S. aureus* belastet. Insgesamt ergaben sich jedoch nur geringe Unterschiede bei dem Vergleich der unterschiedlichen Bewirtschaftungsformen (Abb. C.3).

Im Gegensatz zur jeweiligen Bewirtschaftungsform der Betriebe sind Flüssigkeitsgehalt, Art der Lagerung und Art der Verarbeitung entscheidend für die Belastung des Hofdüngers mit pathogenen Bakterien. Hierbei konnte festgestellt

werden, dass vor allem bei kompostiertem Mist eine vergleichsweise geringe Belastung mit den untersuchten Bakterien nachgewiesen wurde.

D.3 Pathogenbelastung der untersuchten Feldproben von Salat- und Gemüsepflanzen

Für die Düngung der in Deutschland beprobten Pflanzen wurde Gülle verwendet, bei der zuvor eine Belastung mit *L. monocytogenes* festgestellt worden war (G02SC und G08SC, siehe Tab. C.4) sowie nicht kontaminierter Stapelmist (G01MC). Dennoch konnte bei keiner der in Deutschland genommenen Pflanzenproben eine Belastung mit *L. monocytogenes* festgestellt werden. Hinweise auf eine mögliche Übertragung der Bakterien von dem verwendeten Hofdünger auf die Pflanzen konnten somit nicht gefunden werden. Obwohl in einigen Veröffentlichungen nachgewiesen wurde, dass *L. monocytogenes* in der Lage ist, längere Zeit in Boden (Botzler *et al.*, 1974; Gorski *et al.*, 2011) und in mit Stallmist gedüngtem Boden (Jiang *et al.*, 2004) zu überleben, zeigten McLaughlin *et al.* (2011) dass die Bodenmikrobiota einen inhibierenden Effekt auf *L. monocytogenes* hat und somit zu einer Reduktion der Zellzahl dieser Bakterien führen kann. Möglicherweise war daher die für eine Übertragung erforderliche Konzentration an Bakterien im Boden nicht vorhanden.

Eine FISH-Analyse wurde bei den Feldproben nicht durchgeführt, da in keiner der genommenen Proben eine Belastung mit *L. monocytogenes* mit Hilfe von selektiver Anreicherung sowie PCR festgestellt werden konnte.

Weitere Analysen der in Deutschland genommenen Proben ergab, dass in einer der untersuchten Spinatproben *Salmonella* spp. sowie in insgesamt 21 Proben *S. aureus* nachgewiesen werden konnten (Tab. C.5), obwohl diese Bakterien in den zur Düngung der Pflanzen verwendeten Hofdüngern nicht präsent waren. Ein möglicher Ursprung der Kontaminationen sind natürlich im Boden vorkommende Populationen der entsprechenden Bakterien. Ein Eintrag der Bakterien durch Wildtiere kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. *Salmonella* spp. konnten in verschiedenen Arbeiten in wildlebenden Vögeln (Refsum *et al.*, 2002; Millan *et al.*, 2004) und

Säugetieren (Handeland *et al.*, 2002; Millan *et al.*, 2004; Renter *et al.*, 2006; Vieira-Pinto *et al.*, 2011) wie auch *S. aureus* (Doyle *et al.*, 2011) nachgewiesen werden.

Ähnliches konnte für die Pflanzenproben festgestellt werden, in denen *L. monocytogenes* nachgewiesen wurde (Tab. C.5). In keinem der zur Düngung der untersuchten Pflanzen verwendeten Hofdünger konnte eine Belastung mit *L. monocytogenes* festgestellt werden. Diese Hofdüngerproben wurden allerdings erst einige Zeit nach dem Ausbringen des jeweiligen Düngers genommen. In dem ausgebrachten Hofdünger könnte daher eine Belastung mit *L. monocytogenes* vorhanden gewesen sein, die in den später genommenen Proben nicht mehr nachzuweisen war. Zudem kann auch für dieses pathogene Bakterium (Hellström *et al.*, 2008; Wacheck *et al.*, 2010) sowie für pathogene *E. coli* O157:H7 (Makino *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2010) und *Campylobacter* spp, (Palmgren *et al.*, 1997) ein Eintrag durch Wildtiere sowie eine natürlich im Boden vorkommende Population nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt wurde *S. aureus* am häufigsten, gefolgt von *S. enterica*, in den Pflanzenproben nachgewiesen (Abb. C.4 und Abb. C.6). Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Analyse von Erdbeeren gemacht werden (Yoon *et al.*, 2010). Diese Bakterien scheinen daher Pflanzen wesentlich besser besiedeln zu können, als die anderen untersuchten Spezies.

Bei Pflanzen, die mit kompostiertem Mist gedüngt wurden, konnten ausschließlich *Salmonella* spp. und *S. aureus* festgestellt werden. Dagegen waren bei Proben von Gülle gedüngten Feldern alle gesuchten Bakterien nachzuweisen (Abb. C.4). Zudem war bei Proben dieser Felder der geringste Anteil (66%) unbelasteter Pflanzen festzustellen. Bei Pflanzen, die mit kompostiertem Mist gedüngt wurden, lag der Anteil unbelasteter Pflanzen mit 82% deutlich höher (Abb. C.5). Dies lässt sich mit den bei Hofdüngerproben festgestellten häufigeren Belastungen von Gülleproben begründen. Proben von kompostiertem Mist waren hier ebenfalls seltener mit den untersuchten pathogenen Bakterien belastet. Somit war auch zu erwarten, dass auf diesen Feldern weniger Kontaminationen nachzuweisen sind.

Des Weiteren konnten alle untersuchten Bakterien deutlich häufiger in Salat- als in Spinatproben nachgewiesen werden (Abb. C.6). Insgesamt waren nur 64% aller Salatproben ohne Pathogenbelastung im Vergleich zu 79% aller Spinatproben.

D.4 Inokulationsversuche

Die Inokulationsversuche wurden durchgeführt, um die minimale Dosis der jeweiligen pathogenen Bakterien zu finden, die benötigt wird, damit Feldsalat- und Spinatpflanzen über die Wurzeln besiedelt werden können. Dabei wurde der Einfluss unterschiedlicher Faktoren wie Bakterienspezies bzw. Serovar, Pflanzenart oder Art des eingesetzten Düngers auf die Besiedlung von Wurzel und Spross untersucht. Zudem wurden Wurzel und Spross nach der Ernte und vor der Weiterverarbeitung gewaschen und anschließend die Waschflüssigkeit ebenfalls analysiert. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die auf Wurzel oder Spross befindlichen Bakterien durch diesen Schritt in ihrer Zahl reduziert oder sogar vollständig von der Pflanze entfernt werden können.

D.4.1 Inokulationsversuche im axenischen System

D.4.1.1 *Salmonella enterica* ssp. Weltevreden

In allen untersuchten Wurzel- und Sprossproben der Inokulationsversuche mit *S. enterica* ssp. Weltevreden konnte das Bakterium nachgewiesen werden. Waschflüssigkeitsproben von Wurzel und Spross waren dagegen bei niedrigen Inokulationsdichten, bei Feldsalat zum Teil auch bei höheren Inokulationsdichten weniger häufig belastet (Abb. C.8 und Abb. C.9). Gründe hierfür könnten unterschiedliche bevorzugte Besiedlungsstellen auf Feldsalat gegenüber Spinat sein.

Für die Wurzeln dieser Pflanzen konnte dies mittels FISH nachgewiesen werden. Auf Spinatwurzeln wurden *S. enterica* ssp. Weltevreden hauptsächlich auf Wurzelhaaren detektiert (Abb. C.14). Da sie dort wenig geschützt sind, können sie leicht und in hoher Zahl von der Wurzel abgewaschen werden. Einige Zellen wurden jedoch auch in Zellzwischenräumen der Wurzelrinde nachgewiesen (Abb. C.15). Diese waren geschützt, konnten nicht abgewaschen werden und führten somit zu positiven Nachweisreaktionen der Wurzelproben.

Auf Feldsalatwurzeln hingegen wurde *S. enterica* ssp. Weltevreden in großer Zahl in Zellzwischenräumen der Wurzelspitze (Abb. C.16) und in der Kalyptra (Abb. C.17) detektiert. In der Wurzelhaarzone sowie auf älteren Wurzelteilen hingegen waren die Bakterien kaum nachzuweisen. Bei dem durchgeführten Waschschrift konnten die bakteriellen Zellen dadurch ebenfalls nicht vollständig von den Wurzeln entfernt werden.

Die FISH-Analyse der Sprossproben war aus den unter Punkt D.1.5 beschriebenen Gründen nicht erfolgreich. Es konnte zwar festgestellt werden, dass auch in den Waschflüssigkeitsproben des Spinatsprosses häufiger *S. enterica* ssp. Weltevreden nachgewiesen wurde, allerdings nur bei jeweils einer Waschflüssigkeitsprobe bei den Inokulationsdichten 4×10^3 CFU/ml und 4×10^4 CFU/ml. Hier kann somit von einer ähnlichen Besiedlung ausgegangen werden.

D.4.1.2 *Listeria monocytogenes*

Bei den beiden eingesetzten *L. monocytogenes* Serovariationen konnte festgestellt werden, dass sie die inokulierten Pflanzen in ähnlicher Häufigkeit besiedelt haben. In Proben von Spinatpflanzen konnten hierbei wesentlich häufiger Kontaminationen von Wurzel und Spross bei niedrigen Inokulationsdichten nachgewiesen werden (Abb. C.10 und Abb. C.12) als bei Feldsalatpflanzen (Abb. C.11 und Abb. C.13). Somit wurde ein Pflanzenart-Effekt aufgezeigt, wobei Spinatpflanzen von beiden *L. monocytogenes* Serovariationen besser besiedelt werden als Feldsalatpflanzen.

Bei den Analysen wurde festgestellt, dass es bei allen Ansätzen mit *L. monocytogenes*, selten möglich war, die Kontamination vollständig abzuwaschen. Die durchgeführte FISH-Analyse von Wurzelproben ergab, dass *L. monocytogenes* sv. 4b auf Spinatwurzeln zwar hauptsächlich in der Wurzelhaarzone, dort jedoch nicht auf den Wurzelhaaren, sondern in Zellzwischenräumen der Rhizodermis nachgewiesen wurde (Abb. C.18). Feldsalatwurzeln wurden von diesen Bakterien bevorzugt kurz hinter der Wurzelspitze in der Wachstumszone, in Zellzwischenräumen der Rhizodermis (Abb. C.19) und in geringen Zellzahlen auch in Zellzwischenräumen der Rhizodermis älterer Wurzelteile (Abb. C.20) besiedelt. Da dies schwer zugängliche Habitate sind, konnten die Bakterien nur selten in vollständig von den Wurzeln abgewaschen werden.

Eine FISH-Analyse der Sprossproben war aus den in Punkt D.1.5 genannten Gründen auch hier nicht erfolgreich. Bei der CLSM-Analyse von Spinatpflanzen die mit *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E pSOD GFP inokuliert wurden, konnten zwar Fluoreszenzsignale in Zellzwischenräumen der Sprossbasis detektiert werden (Abb. C.21), aber aus den ebenfalls in Punkt D.1.5 genannten Gründen kann dennoch nicht von einem eindeutigen Nachweis der Bakterien ausgegangen werden. Da allerdings Waschflüssigkeitsproben des Sprosses im Vergleich zu den dazugehörigen Sprossproben vor allem bei niedrigen Inokulationsdichten wesentlich seltener mit den eingesetzten Bakterien belastet waren (Abb. C.10 – Abb. C.13), kann davon ausgegangen werden, dass auch der Spross beider Pflanzenarten bevorzugt an geschützten Habitaten von den *L. monocytogenes* Serovariationen besiedelt wurde.

D.4.1.3 Zusammenfassung und Vergleich der Inokulationsansätze im axenischen System

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass alle eingesetzten Bakterien in der Lage waren, die untersuchten Pflanzen in dem hier verwendeten System bei sehr niedrigen Inokulationsdichten zu besiedeln. Dabei konnten Bakterienart- und Pflanzenart-spezifische Unterschiede nachgewiesen werden. *S. enterica* ssp. Weltevreden wurde bei niedrigeren Inokulationsdichten in Feldsalat nachgewiesen als die verwendeten *L. monocytogenes* Serovariationen. Zudem wurde Spinat bei niedrigeren Inokulationsdichten als Feldsalat von *L. monocytogenes* besiedelt. Weitere Unterschiede ergaben sich bei der Lokalisierung der Bakterien in Wurzelproben mittels FISH. Es konnte keine Besiedlung des Pflanzeninneren, wie sie z.B. für *S. enterica* und *E. coli* von Jablason *et al.* (2005) beschrieben wurde, nachgewiesen werden. Allerdings wurde festgestellt, dass je nach eingesetzter Bakterien- und Pflanzenart unterschiedliche Habitats der jeweiligen Wurzeln besiedelt wurden.

Verschiedene Faktoren, die eine Besiedlung von Pflanzen im axenischen System beeinflussen können, müssen jedoch noch berücksichtigt werden. Zum einen konnte in dem geschlossenen axenischen System eine sehr hohe Luftfeuchtigkeit beobachtet werden. Diese hatte zur Folge, dass die verwendeten Pflanzen unter

Stress standen und bei längerer Inkubation als 3 Wochen kein Wachstum mehr zeigten. Dies könnte die Besiedlung der Pflanze durch die pathogenen Bakterien begünstigt haben. Die in diesem System fehlende Konkurrenz durch die natürliche Bodenmikroflora hat, wie von Klerks *et al.* (2007) beschrieben, denselben Effekt. Um diese Einflüsse in einem den Gegebenheiten in der Natur angenäherten System zu minimieren, wurden daher zusätzlich die Inokulationsversuche im Bodensystem durchgeführt.

D.4.2 Inokulationsversuche im Bodensystem

Die Inokulationsversuche im Bodensystem wurden durchgeführt, um einerseits die minimale Zellzahl der eingesetzten pathogenen Bakterien in Gülle und Stallmist zu bestimmen, die notwendig ist um eine Kontamination der verwendeten Pflanzen zu verursachen. Andererseits sollten in einem den Freilandbedingungen angenäherten System Hofdünger-, Pflanzenart- und Bakterienart- bzw. Serovariations-spezifische Unterschiede bei der Besiedlung der Pflanzen durch die Bakterien nachgewiesen werden.

D.4.2.1 *Salmonella enterica* ssp. Weltevreden

Bei allen Ansätzen mit *S. enterica* ssp. Weltevreden konnten die eingesetzten Bakterien auch bei niedrigen ursprünglichen Zelldichten im verwendeten Hofdünger häufig in Wurzelproben nachgewiesen werden (Abb. C.23 – Abb. C.25). Die Analyse der Waschflüssigkeitsproben zeigte zudem, dass es meist möglich war, die Bakterien durch den Waschschrift teilweise, in einigen Proben sogar komplett, von der Wurzel zu entfernen. Dies lässt darauf schließen, dass *S. enterica* ssp. Weltevreden im Bodensystem, anders als im axenischen System, nicht im selben Maße der Lage war, Habitate an den Wurzeln zu besiedeln, an denen die Bakterien vor dem Abwaschen geschützt sind. Dies kann an der, im Gegensatz zum axenischen System vorhandenen Bodenmikroflora liegen, die in der Lage ist, die geschützten Stellen zu besiedeln und somit eine Besiedlung durch humanpathogene Bakterien zu verhindern (Klerks *et al.*, 2007). Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass nur

die Wurzel umgebende Bodenpartikel, welche bei dem Waschschrift entfernt wurden, durch die Bakterien besiedelt waren und nicht die Wurzel selbst.

Bei den Sprossproben und den Waschflüssigkeitsproben des Sprosses der Ansätze mit *S. enterica* ssp. Weltevreden und Stallmist konnten die Bakterien nur in wenigen Proben und bei hohen Inokulationsdichten nachgewiesen werden (Abb. C.24 und Abb. C.26). Zudem war es in nahezu allen Proben möglich, die eingesetzten Bakterien durch den Waschschrift vom Spross zu entfernen. Daher scheint es auch hier den Bakterien nicht möglich gewesen zu sein, den Spross an geschützten Habitaten und/oder in hoher Zahl zu besiedeln. Bei Sprossproben von Pflanzen, die mit *S. enterica* ssp. Weltevreden versetzter Gülle gedüngt wurden, konnten die Bakterien dagegen auch bei relativ niedrigen Inokulationsdichten nachgewiesen werden (Abb. C.23 und Abb. C.25). Hier war es auch vergleichsweise selten möglich, die eingesetzten Bakterien in den Waschflüssigkeitsproben zu detektieren. Somit waren die Bakterien hier in der Lage, den Spross wesentlich häufiger und auch an geschützten Habitaten zu besiedeln. Womöglich könnte es sich hier zudem um eine endophytische Besiedlung der Pflanzen handeln bei der die Bakterien größtenteils aus der Wurzel in den Spross gelangt sind.

D.4.2.2 *Listeria monocytogenes*

Bei allen Ansätzen mit den *L. monocytogenes* Serovariationen konnten unabhängig von der Düngerart und der Pflanzenart wesentlich seltener Kontaminationen von Pflanze und Waschflüssigkeit nachgewiesen werden.

Alle analysierten Proben der Ansätze mit *L. monocytogenes* sv. 4b pSOD GFP inokulierter Gülle waren frei von dem inokulierten Bakterium. Ma *et al.* (2011) konnten zwar nachweisen, dass eine Plasmid-codierte GFP-Markierung bei einigen pathogenen Bakterien wie *S. enterica* und *E. coli* O157:H7 keinen Einfluss auf das Wachstum hat, für *L. monocytogenes* wurde jedoch eine verringerte Wachstumsrate nachgewiesen. Ein möglicher negativer Einfluss der GFP-Markierung dieses Stammes auf das Überleben der Bakterien im Boden kann daher nicht ausgeschlossen werden. Da aber auch bei den Ansätzen mit *L. monocytogenes* sv. 4b und Stallmist nur in wenigen Proben ein Nachweis der eingesetzten Bakterien gelungen ist, kann davon ausgegangen werden, dass diese Bakterien nur bedingt in

dem gedüngten Boden überleben und die Pflanzen besiedeln können. Der Nachweis der Bakterien gelang hierbei bei Wurzel, Waschflüssigkeit der Wurzel sowie Waschflüssigkeit des Sprosses in wenigen Proben unterschiedlicher Inokulationsdichten (Abb. C.27 und Abb. C.28). Hutchison *et al.* (2004b) konnten zeigen, dass ein Rückgang der Zellzahl von *L. monocytogenes* in biologisch gedüngtem Boden stattfindet und dieser stärker ist wenn Stallmist und nicht Gülle für die Düngung verwendet wurde. Daher ist es möglich, dass die eingesetzten Bakterien zum Zeitpunkt des Einpflanzens in zu geringer Zahl im Boden vorhanden waren, um die Pflanzen effektiv zu besiedeln. Aufgrund der geringen Anzahl positiver Proben können hier zudem keine Aussagen über Pflanzenart- oder Düngerart-spezifische Einflüsse auf die Besiedlung der Pflanzen getroffen werden. Bei dem Ansatz mit *L. monocytogenes* sv. 4b inokuliertem Stallmist und Feldsalat konnte eine Kontamination des Sprosses einer Kontrollpflanze nachgewiesen werden. Obwohl der verwendete Stallmist sowie der verwendete Boden überprüft und keine Kontamination mit *L. monocytogenes* detektiert wurde, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass das Bakterium nicht doch im Boden bzw. Dünger enthalten war. Zudem besteht die Möglichkeit, dass aufgrund des limitierten Platzes im verwendeten Minigewächshaus eine Übertragung der Bakterien von benachbarten inokulierten Töpfen stattgefunden hat. Eine Übertragung mittels Kondenswasser kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da *L. monocytogenes* - wie unter A.2.2 beschrieben - auch in Wasser überleben kann.

Bei den Inokulationsansätzen mit *L. monocytogenes* sv. 1/2a EGD-E und Feldsalat konnte in keiner der untersuchten Proben das eingesetzte Bakterium nachgewiesen werden. Zudem wurde bei den weiteren Ansätzen mit diesen Bakterien nur vereinzelt eine Belastung der Proben bei unterschiedlichen Inokulationsdichten (Abb. C.28 und Abb. C.29) festgestellt. Ein Zusammenhang zwischen der inokulierten Zellzahl und der Besiedlung der Pflanzen konnte daher nicht festgestellt werden.

L. monocytogenes sv. 1/2a EGD-E konnte hauptsächlich in den Waschflüssigkeitsproben von Wurzel oder Spross nachgewiesen werden, allerdings auch in einer Wurzel- und einer Sprossprobe ohne Kontamination der entsprechenden Waschflüssigkeitsprobe (Abb. C.28). Dies lässt darauf schließen, dass die Bakterien meist an nicht geschützten Habitaten der Pflanzen lokalisiert sind, aber durchaus auch geschützte Habitate besiedeln können.

Ein Lokalisierung der Bakterien mittels FISH-Analyse war bei keinem Inokulationsansatz im Bodensystem aus den in Punkt D.1.5 genannten Gründen möglich. Der Einsatz GFP markierter Bakterien war ebenfalls nicht erfolgreich, da in keiner der analysierten Proben das eingesetzte Bakterium nachzuweisen war.

D.4.2.3 Zusammenfassung und Vergleich der Inokulationsansätze im Bodensystem

Insgesamt konnte bei den Inokulationsansätzen mit *S. enterica* ssp. Weltevreden im Bodensystem festgestellt werden, dass die Bakterien häufiger in Proben von Spinatpflanzen (Abb. C.23 und Abb. C.24) nachgewiesen werden konnten als in Proben von Feldsalatpflanzen (Abb. C.25 und Abb. C.26). Somit konnte hier ein schwacher Pflanzenart-spezifischer Effekt nachgewiesen werden. Zudem wurden die eingesetzten Bakterien häufiger in mit Gülle gedüngten Pflanzen (Abb. C.23 und Abb. C.25) nachgewiesen, als in mit Stallmist gedüngten Pflanzen (Abb. C.24 und Abb. C.26). Des Weiteren konnten die Bakterien seltener von Sprossproben abgewaschen werden, wenn die Pflanzen mit inokulierter Gülle gedüngt wurden. Daher kann hier auch von einem düngerartabhängigen Effekt auf die Besiedlung von Feldsalat- und Spinatpflanzen durch *S. enterica* ssp. Weltevreden gesprochen werden. Dies kann, wie in Punkt D.2 beschrieben, wiederum mit dem erhöhten Flüssigkeitsgehalt der Gülle im Gegensatz zum Stallmist begründet werden. Die Bakterien scheinen dadurch im Boden überlebensfähiger und mobiler zu sein und aufgrund dessen die Pflanzen besser besiedeln zu können.

Bei allen Ansätzen, bei denen Pflanzen mit einem Hofdünger gedüngt wurden, der mit einer der *L. monocytogenes* Serovariationen inokuliert war, konnten nur wenige bzw. keine Kontaminationen von Pflanze oder Waschflüssigkeit nachgewiesen werden. Einerseits sind dadurch keine eindeutigen Aussagen bezüglich Pflanzen- oder Hofdüngerart spezifischer Einflüsse auf eine Besiedlung durch diese Bakterien möglich, andererseits wird aber ein Bakterienart-spezifischer Einfluss deutlich. Hierbei kann festgestellt werden, dass die eingesetzten *L. monocytogenes* Serovariationen im Bodensystem die Pflanzen wesentlich seltener besiedeln als *S. enterica* ssp. Weltevreden. Dieser *S. enterica* Stamm wurde bei einem Ausbruch im Jahr 2007, der auf kontaminierte Alfalfa-Sprossen zurückzuführen war, isoliert

(Emberland *et al.*, 2007). Es war erwartet worden, dass die Bakterien in der Lage sind, Pflanzen sehr gut zu besiedeln.

D.5 Faktoren, die eine Besiedlung von Salat- und Gemüsepflanzen durch humanpathogene Bakterien beeinflussen können

D.5.1 Bakterienart

Die zu untersuchende Bakterienart bzw. -serovar ist erwartungsgemäß ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Besiedlung der Pflanze. Hinweise, dass *S. enterica* häufiger von kontaminiertem Hofdünger auf die produzierten Pflanzen übertragen wird als *L. monocytogenes* zeigten sich bereits bei den Analysen der Hofdünger-, sowie der Feldproben von Salat und Gemüsepflanzen. So konnten *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes* ungefähr gleich häufig in Hofdüngerproben nachgewiesen werden (Abb. C.1), wogegen die Pflanzenproben wesentlich häufiger mit *Salmonella* spp. belastet waren als mit *L. monocytogenes* (Abb. C.4). Bei den hier vorgestellten Inokulationsversuchen im axenischen- sowie im Bodensystem konnte zudem *S. enterica* ssp. Weltevreden wesentlich häufiger und bei geringeren ursprünglichen Inokulationsdichten in den untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden als die beiden verwendeten *L. monocytogenes* Serovariationen (siehe D.4). Bestätigt wird dies durch verschiedene Publikationen, in denen eine Übertragung von *S. enterica* von kontaminiertem Hofdünger über den Boden auf Pflanzen nachgewiesen werden konnte (Klerks *et al.*, 2007; Arthurson *et al.*, 2011; Barak *et al.*, 2011). Zudem wurde auch eine endophytische Besiedlung von Pflanzen durch *S. enterica* nachgewiesen, wogegen *L. monocytogenes* im gleichen Versuchsaufbau nur auf Pflanzenoberflächen lokalisiert werden konnte (Jablasone *et al.*, 2005; Kutter *et al.*, 2006). Das generelle Potential Pflanzen zu besiedeln scheint daher für *S. enterica* weitaus größer zu sein.

D.5.2 Pflanzenart

Die eingesetzte Pflanzenart ist ein weiterer wichtiger Faktor für eine Besiedlung von Salat- und Gemüsepflanzen. Wie unter D.4.1.3 und D.4.2.3 beschrieben, konnte nachgewiesen werden, dass die eingesetzten Bakterien häufiger und bei niedrigeren Inokulationsdichten in Proben von Spinatpflanzen detektiert wurden, als in Proben von Feldsalatpflanzen. In früheren Forschungsarbeiten konnten auch Pflanzenart-abhängige Einflüsse auf die Kolonisierung durch Bakterien festgestellt werden. Yadav *et al.* (2005) konnten nachweisen, dass die Besiedlung von Blattoberflächen unterschiedlicher Pflanzenspezies z.B. Zitronen-Melisse oder Bergminze durch Bakterien abhängig von einigen Blatteigenschaften wie unter anderem Wassergehalt der Blätter, Phosphorgehalt der Blätter oder Blatt- und Mesophylldicke sind. Zhang *et al.* (2010) zeigten, dass sich die Bakteriengemeinschaften auf den Blättern verschiedener Gemüsepflanzenarten signifikant unterschieden. Klerks *et al.* (2007) wiesen sogar einen Pflanzenkultivar-abhängigen Unterschied bei der Besiedlung von Kopfsalat durch *S. enterica* nach. Genauere Untersuchungen müssen jedoch noch durchgeführt werden, um die Gründe für die beobachteten Effekte aufzuklären.

D.5.3 Art des verwendeten Hofdüngers

Die Art des verwendeten Hofdüngers hat ebenfalls einen Einfluss auf die Besiedlung der Pflanzen durch Bakterien. Wie unter D.2 beschrieben, konnte bei Gülleproben wesentlich häufiger eine Belastung mit den untersuchten pathogenen Bakterien festgestellt werden, als bei Proben der anderen unterschiedlichen Mist-Arten. Zudem konnte, wie unter D.4.3.2 beschrieben, gezeigt werden, dass eine Übertragung der Bakterien vom Hofdünger auf die produzierte Pflanze wesentlich häufiger und bei geringeren Inokulationsdichten stattfindet, wenn für die Düngung kontaminierte Gülle verwendet wurde. Auch das Abwaschen der Bakterien war bei diesen Proben seltener möglich. Semenov *et al.* konnten bereits 2009 nachweisen, dass *S. enterica* und *E. coli* im Boden besser überleben können, wenn sie mit inokulierter Gülle anstatt mit inokuliertem Mist eingebracht wurden. Eine Übertragung auf Pflanzen wurde jedoch in deren Arbeit nicht untersucht.

D.5.4 Schlussfolgerungen

De Roever formulierte 1998 entscheidende Forschungsziele und Fragen die geklärt werden müssen, um die Sicherheit von Salat- und Gemüsepflanzen bezüglich der Belastung mit humanpathogenen Bakterien für den Endkonsumenten zu erhöhen. Folgende Unklarheiten bestehen:

„Welchen Einfluss haben Anbau- und Erntemethoden auf die Sicherheit des Produktes?“

„Wie sollte Hofdünger bei der Produktion von Obst-, Salat- und Gemüsepflanzen prozessiert und ausgebracht werden?“

„Können Bedingungen und Arbeitsabläufe beeinflusst werden, so dass die Wahrscheinlichkeit von Oberflächenkontaminationen erhöht oder verringert wird?“

Diese Fragen entsprechen zum Teil den Zielsetzungen der hier vorgestellten Arbeit. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche lassen daher einige Vorschläge für die Risikominimierung beim Anbau von Salat- und Gemüsepflanzen zu. Es sollte zunächst darauf geachtet werden, welche Pflanzenart angebaut wird. Die Ergebnisse der Inokulationsversuche zeigten, dass manche Pflanzen leichter (hier: Spinat) durch pathogene Bakterien besiedelt werden als andere (hier: Feldsalat). Eine größere Sorgfalt ist daher beim Anbau dieser sogenannten „Hoch-Risiko-Pflanzen“ nötig. Es sollte nach Möglichkeit fester biologischer Dünger, idealer Weise kompostierten Mist, für die Düngung eingesetzt werden, da dieser wesentlich seltener mit pathogenen Bakterien belastet ist als Gülle. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung der Bakterien auf Pflanzen häufiger und bei geringerer Inokulationsdichte stattfand, wenn diese mit Gülle gedüngt wurden. Bei der Ernte sollte darauf geachtet werden, Wurzelteile komplett zu entfernen, da hier in den Inokulationsversuchen wesentlich häufiger eine Besiedlung durch die eingesetzten Bakterien nachgewiesen werden konnte, als im Sprosstteil der Pflanzen. Zum Beispiel können durch einen Waschschrift Teile, in manchen Fällen sogar alle pathogenen Bakterien von der Pflanzenoberfläche entfernt werden, wie durch die Analysen der Waschflüssigkeitsproben gezeigt wurde. Durch diese Maßnahmen kann schon im landwirtschaftlichen Betrieb, also zu Beginn der Produktionskette von Salat- und Gemüsepflanzen, das Risiko einer Kontamination des Produktes mit

humanpathogenen Bakterien reduziert und somit die Lebensmittelsicherheit für den Endverbraucher wesentlich erhöht werden.

E Zusammenfassung

Der Verzehr von Salat und Gemüsepflanzen ist unerlässlich für eine gesunde Ernährung des Menschen und wird unter anderem auch zur Prävention von Krebs und Herz- Kreislauferkrankungen empfohlen. In den letzten Jahren konnte jedoch ein Anstieg von Erkrankungen festgestellt werden, die auf den Verzehr von mit humanpathogenen Bakterien kontaminierten Pflanzen zurückzuführen waren. Aktuelle Beispiele für derartige Ausbrüche sind zum einen ein Ausbruch von *Escherichia coli* Infektionen in Deutschland 2011, welcher durch den Verzehr kontaminierter Bockshornklee-Sprossen ausgelöst wurde, und zum anderen ein Ausbruch in den USA im selben Jahr, verursacht durch den Verzehr von, mit *Listeria monocytogenes* kontaminierten Wassermelonen. Um für Verbraucher ein größtmögliches Maß an Sicherheit zu gewährleisten, müssen daher Prozesse innerhalb der Produktionskette besonders von Salat- und Gemüseprodukten so optimiert werden, dass eine Kontamination des Lebensmittels durch Krankheitserreger ausgeschlossen oder zumindest wesentlich minimiert werden kann.

Ein möglicher Ursprung der Kontaminationen von Salat- und Gemüsepflanzen ist die Applikation von organischen Düngern während der Produktion. Diese können mit einer Reihe von pathogenen Keimen belastet sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden, in Kooperation mit mehreren Forschergruppen aus verschiedenen europäischen Ländern, großangelegte Untersuchungen zu dieser Thematik durchgeführt. Dabei wurden Proben von unterschiedlichen biologischen Düngern und von Gemüse genommen und mit klassischen mikrobiologischen aber auch molekularbiologischen Methoden auf eine Kontamination mit pathogenen Mikroorganismen hin untersucht. Die Pflanzenproben wurden hierbei auf Feldern genommen, bei deren Dünger zuvor eine Belastung mit pathogenen Bakterien festgestellt worden war. Analysen zum Nachweis von *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* sowie enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC) wurden von den Kooperationspartnern innerhalb des Projekts „PathOrganic“ durchgeführt. Der Fokus dieser Doktorarbeit lag dabei auf der Detektion einer Belastung von biologischem Dünger und von Biogemüse mit *Listeria monocytogenes*. Zudem wurden Inokulationsexperimente in

axenischen Systemen sowie in natürlichen Verhältnissen angenäherten Bodensystemen durchgeführt. Ziel war, sowohl die minimale Bakterienkonzentration zu finden, bei der eine Besiedlung der Pflanzen stattfindet, als auch weitere Faktoren zu identifizieren, die Einfluss auf eine Kolonisierung der Pflanzen haben können, wie zum Beispiel die eingesetzte Bakterienart oder Serovariation, die eingesetzte Pflanzenart oder die Form des verwendeten Hofdüngers. Hierbei wurden Spinat- und Feldsalatpflanzen verwendet, die entweder direkt (axenisches System) oder durch mit pathogenen Bakterien versetztem Hofdünger (Bodensystem) beimpft worden waren. Dabei wurden *S. enterica* ssp. Weltevreden, *L. monocytogenes* sv. 4b oder *L. monocytogenes* EGD-E sv. 1/2a in unterschiedlichen Konzentrationen inokuliert. Zusätzlich zu PCR- sowie zu Bakterienkultur- gestützten Nachweismethoden wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit anschließender konfokaler Laser Scanning Mikroskopie eingesetzt, um eine Lokalisierung der Bakterien auf oder in den untersuchten Pflanzen zu ermöglichen.

Eine Belastung mit den nachzuweisenden pathogenen Bakterien konnte sowohl für viele Biodüngerproben als auch für einige Feldproben von Salat- und Gemüsepflanzen festgestellt werden. Auffällig war hierbei, dass in Pflanzenproben eines Salat-Feldes in Dänemark alle gesuchten pathogenen Bakterien nachgewiesen werden konnten. Mit Hilfe der durchgeführten Laborversuche konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Pflanzen schon bei sehr niedrigen Inokulationsdichten wie zum Beispiel 4×10 CFU/ml im axenischen oder 4×10^5 CFU/ml im Bodensystem besiedelt wurden. Pflanzenvarietätsabhängige Effekte auf die Belastung mit pathogenen Bakterien konnten ebenfalls festgestellt werden. Spinatpflanzen wurden sowohl im axenischen als auch im Bodensystem häufiger und bei niedrigeren Inokulationsdichten von den eingesetzten Bakterien besiedelt als Feldsalatpflanzen. Mit Hilfe der FISH- und CLSM-Analysen konnte zudem gezeigt werden, dass die Bakterien in Abhängigkeit von der Pflanzenart unterschiedliche Abschnitte der jeweiligen Wurzeln besiedeln. So fanden sich zum Beispiel die eingesetzten *S. enterica* ssp. Weltevreden Bakterien hauptsächlich in der Wurzelhaarzone inokulierter Spinatpflanzen, wohingegen sie bei inokulierten Feldsalatpflanzen fast ausschließlich an der Wurzelspitze detektiert werden konnten. Die Art des verwendeten biologischen Düngers hat ebenfalls einen Einfluss auf die Kolonisierung der Pflanzen. So konnten bei den groß angelegten Probenahmen die untersuchten pathogenen Bakterien häufiger in Proben von flüssiger Gülle nachgewiesen werden,

als in Proben von festem Stallmist. Eine Übertragung der Bakterien auf die Pflanzen wurde bei den Inokulationsversuchen im Bodensystem zudem häufiger und bei niedrigeren Inokulationsdichten festgestellt, wenn diese mit kontaminierter Gülle gedüngt wurden. Der Wurzelteil der untersuchten Pflanzen war außerdem wesentlich häufiger mit den eingesetzten Bakterien belastet, als der Sprossenteil. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass durch einen Waschschrift die Bakterien in manchen Fällen von den Pflanzen entfernt, meist aber zumindest ihre Anzahl verringert werden konnte. Eine Besiedlung von inneren Bereichen der Pflanzen ist möglich, obwohl diese Besiedlung nicht sicher nachgewiesen werden konnte.

Basierend auf diesen Ergebnissen können nun Maßnahmen vorgeschlagen werden, mit denen die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination von Salat- und Gemüsepflanzen schon im landwirtschaftlichen Betrieb reduziert werden kann. Zum einen ist die Verwendung von festem, optimaler Weise kompostiertem Hofdünger empfehlenswert. Außerdem sollte, wenn möglich, darauf geachtet werden, ausschließlich den Sprossenteil der Pflanzen zu ernten. Das Waschen der Pflanzen nach der Ernte kann das Risiko einer Kontamination ebenfalls verringern, jedoch nicht vollständig eliminieren.

F Summary

Vegetables are an essential part of a healthy human nutrition. They are recommended for example for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. In recent years, an increasing number of outbreaks caused by the consumption of produce, contaminated with human pathogenic bacteria, were reported. Most recent examples for these outbreaks are on the one hand an outbreak of *E. coli* infections 2011 in Germany, caused by the consumption of contaminated fenugreek-seedlings and on the other hand, also in 2011, an outbreak of listeriosis in the USA, caused by the consumption of contaminated watermelon. In order to provide a high degree of safety for the consumers, it is essential to optimize the processes within the vegetable production chain (from “field to fork”) to prevent, or at least minimize the probability of a contamination of produce with human pathogenic bacteria.

The application of contaminated organic fertilizer during vegetable production is one of the possible reasons causing contamination of produce. These organic fertilizers can be contaminated with various human pathogenic bacteria. In the presented work large scale analyses concerning this topic were conducted in cooperation with several working groups from different European countries. Samples of different organic fertilizers and produce were analyzed for the presence of human pathogenic bacteria using classical microbiological as well as molecular biological methods. Plants were sampled from fields to which different organic fertilizers have been applied, that were previously tested positive for the contamination with human pathogenic bacteria. Analyses concerning *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejunii* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* were conducted by the cooperating partners within the PathOrganic EU-project. The focus of the presented work was the analysis of biological fertilizer as well as produce for the presence of *Listeria monocytogenes*. Additionally, laboratory experiments in axenic systems and soil systems that were close to farming practices were conducted in order to find the minimal bacterial dose needed for colonization of the plants and to identify factors like bacterial species or serovariation, plant species or fertilizer type used, that might influence the colonization behavior of the human pathogenic bacteria. Therefore, spinach or cornsalad plants were inoculated with

different cell numbers of *S. enterica* ssp. Weltevreden, *L. monocytogenes* sv. 4b or *L. monocytogenes* EGD-E sv. 1/2a either directly (axenic system) or via spiked organic fertilizer (soil system). In addition to PCR- and bacterial culture based detection methods, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was used in order to localize the bacterial cells on or within the analysed plants.

The pathogenic bacteria of interest were detectable in many samples of organic fertilizers as well as in some field samples of organically fertilized vegetable plants. In the course of the analysis an exceptionally high number of contaminated plants were found in samples of a salad field from Denmark, where all pathogenic bacteria of interest were detected. The results of the laboratory experiments showed that plants were colonized by the used bacterial species at inoculation numbers as low as 4×10 cfu/ml in an axenic system or 4×10^5 cfu/ml in a soil system. In addition, plant species dependent effects on the contamination of plants with pathogenic bacteria were observed. Spinach plants were colonized more often and at lower inoculation doses in axenic as well as soil systems compared to cornsalad plants. Differential colonization sites on roots, depending on the plant species could be observed using FISH- and CLSM-analysis. *S. enterica* ssp. Weltevreden for example was found to mainly colonize the root hair zone of spinach roots, whereas the root tip was the preferred colonization site on cornsalad roots. The type of organic fertilizer used also had an influence on plant contamination. In the large scale sampling campaign of organic fertilizers, the pathogenic bacteria of interest were detected more often in samples of liquid slurry compared to solid manure. The transfer of pathogenic bacteria from organic fertilizer to the plants was observed more often and at lower initial inoculation doses when fertilization was conducted with inoculated slurry compared to inoculated manure. In general, the root part of the analysed plants was contaminated more intensively than the shoot part. Finally, it could be shown that by introducing a washing step, the bacterial contamination was reduced in most cases or even was removed in some cases. A colonization of the plant interior is possible, although it was not explicitly proved.

Based on these findings measures can be proposed, that may help minimizing the risk of contamination of produce directly on the farm. First of all, solid manure, if possible composted one, should be preferably used for fertilization instead of liquid manure. Furthermore only the shoot part of the plant should be harvested. Finally, by

introducing a washing step after harvest the risk of a produce contamination with human pathogenic bacteria can be minimized, but not completely eliminated.

G Literatur

- Abdel-Mohsein H, Yamamoto N, Otawa K, Tada C & Nakai Y (2010) Isolation of bacteriocin-like substances producing bacteria from finished cattle-manure compost and activity evaluation against some food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *The Journal of General Applied Microbiology* 56: 151–161.
- Abdul-Raouf UM, Beuchat LR & Ammar MS (1993) Survival and growth of *Escherichia coli* O157: H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1999–2003.
- Allerberger F & Wagner M (2010) Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16: 16–23.
- Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA & Miller SI (1994) Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *The Journal of Experimental Medicine* 179: 601–608.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
- Amann RI, Fuchs BM & Behrens S (2001) The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 231–236.
- Amann RI, Krumholz L & Stahl DA (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172: 762–770.
- Amann RI, Ludwig W & Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143–169.
- Amann RI, Zarda B, Stahl DA & Schleifer KH (1992) Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, *rRNA*-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3007–3011.
- Arthurson V, Sessitsch A & Jäderlund L (2011) Persistence and spread of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in soil and on spinach plants. *FEMS Microbiology Letters* 314: 67–74.
- Barak JD, Kramer LC & Hao L (2011) Colonization of tomato plants by *Salmonella enterica* is cultivar dependent, and type 1 trichomes are preferred colonization sites. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 498–504.

- Berger CN, Sodha Samir V, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P & Frankel G (2010) Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12: 2385–2397.
- Besse NG, Barre L, Buhariwalla C, Vignaud ML, Khamissi E, Decourseulles E, Nirsimloo M, Chelly M & Kalmokoff M (2010) The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria spp.* in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis. *International Journal of Food Microbiology* 136: 345–351.
- Beuchat LR (1996) *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control* 7: 223–228.
- Beuchat LR & Ryu JH (1997) Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases* 3: 459–465.
- Bilge SS, Vary Jr JC, Dowell SF & Tarr PI (1996) Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infection and Immunity* 64: 4795–4801.
- Blanck HM, Gillespie C, Kimmons JE, Seymour JD & Serdula MK (2008) Trends in fruit and vegetable consumption among U.S. men and women, 1994-2005. *Preventing Chronic Disease* 5: 1–9.
- Blaser MJ & Newman LS (1982) A Review of Human Salmonellosis: I. Infective Dose. *Reviews of Infectious Diseases* 4: 1096–1106.
- Botzler R, Cowan A & Wetzler T (1974) Survival of *Listeria monocytogenes* in soil and water. *Journal of Wildlife* 10: 204–212.
- Brandl Maria T & Amundson R (2008) Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2298–2306.
- Brandl Maria T (2006) Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology* 44: 367–392.
- Brehm-Stecher BF, Hyldig-Nielsen JJ & Johnson EA (2005) Design and evaluation of 16S *rRNA*-targeted peptide nucleic acid probes for whole-cell detection of members of the genus *Listeria*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5451–5457.
- Browicz T (1874) Pasorzyty roślinne w durze jelitowym (Vegetable parasites in typhoid fever). *Rozprawy i sprawozdania z posiedzen wydzialu matematyczno-przyrodnicznego Akademii Umiejetnosci. T. I.* 33–40.
- Bubert A, Köhler S & Goebel W (1992) The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria spp.* by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2625–2632.

- Bubert A, Sokolovic Z, Chun SK, Papatheodorou L, Simm A & Goebel W (1999) Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *Molecular & General Genetics* 261: 323–336.
- Center of Disease Control and Prevention (2010) *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States , 2007*.
- Center of Disease Control and Prevention (2011) *Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Jensen Farms Cantaloupe - United States, August-September*
- Center of Disease Control and Prevention (2006) *Ongoing multistate outbreak of Escherichia coli serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach--United States, September 2006*.
- Chang J-M & Fang TJ (2007) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. *Food Microbiology* 24: 745–751.
- Chen Y, Kumar N & Siddique N (2011) Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay targeting *iap* for the detection of *Listeria monocytogenes* in select food matrices. *Foodborne Pathogens and Disease* 8: 1063–1069.
- Cheng P, Lin B, Kao F, Gu M, Xu M, Gan X, Huang M & Wang Y (2001) Multi-photon fluorescence microscopy--the response of plant cells to high intensity illumination. *Micron (Oxford, England : 1993)* 32: 661–669.
- Colburn KG, Kaysner CA, Abeyta C & Wekell MM (1990) *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2007–2011.
- Cornu M, Kalmokoff M & Flandrois J-P (2002) Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology* 73: 261–274.
- Daims H, Brühl A, Amann R, Schleifer KH & Wagner M (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* 22: 434–444.
- Danyluk MD & Schaffner DW (2011) Quantitative assessment of the microbial risk of leafy greens from farm to consumption: preliminary framework, data, and risk estimates. *Journal Of Food Protection* 74: 700–708.
- Dijkstra RG (1982) The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of a sewage treatment plant. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale B, Hygiene* 176: 202–205.

- Dineen SM, Aranda R, Anders DL & Robertson JM (2010) An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1886–96.
- Disson O, Grayo S, Huillet E, Nikitas G, Langa-Vives F, Dussurget O, Ragon M, Le Monnier A, Babinet C, Cossart P & Lecuit M (2008) Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 455: 1114–1118.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K & Mattick JS (1991) “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19: 4008.
- Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J & Kaper JB (1993) The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. *The Journal of Clinical Investigation* 92: 1418–1424.
- Doyle ME, Hartmann FA & Wong ACL (2011) *White Paper on Sources of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Other Methicillin-Resistant Staphylococci: Implications for Our Food Supply*
- Dreux N, Albagnac C, Carlin F, Morris CE & Nguyen-The C (2007) Fate of *Listeria spp.* on parsley leaves grown in laboratory and field cultures. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1821–1827.
- Eberth C (1880) Die Organismen in den Organen bei Typhus abdominalis. *Virchows Archiv* 81: 58–75.
- Emberland K, Ethelberg S, Kuusi M, Vold L, Jensvoll L, Lindstedt B-A, Nygård K, Kjels C, Torpdahl M, Sørensen G, Jensen T, Lukinmaa S, Niskanen T, Kapperud G (2007) Outbreak of *Salmonella Weltevreden* infections in Norway, Denmark and Finland associated with alfalfa sprouts, July-October 2007. *Eurosurveillance* 12: 1–4.
- Farber J, Daley E, Coates F, Beausoleil N & Fournier J (1991) Feeding trials of *Listeria monocytogenes* with a nonhuman primate model. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 2606–2608.
- Farber J & Peterkin P (1991) *Listeria monocytogenes* , a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55: 476–511.
- Fenlon DR (1985) Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *The Journal of Applied Bacteriology* 59: 537–543.
- Fenlon DR, Wilson J & Donachie W (1996) The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *The Journal of Applied Bacteriology* 81: 641–650.

- Fischer D, Pfitzner B, Schmid M, Simões-Araújo JL, Reis VM, Pereira W, Ormeño-Orrillo E, Hai B, Hofmann A, Schloter M, Martinez-Romero E, Baldani IJ, Hartmann A (2012) Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum sp.*). *Plant and Soil* 356: 83–99.
- Fliss I, Emond E, Simard RE & Pandian S (1991) A rapid and efficient method of lysis of *Listeria* and other gram-positive bacteria using mutanolysin. *Biotechniques* 11: 453, 456–457.
- Francis CL, Starnbach MN & Falkow S (1992) Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Molecular Microbiology* 6: 3077–3087.
- Franz Eelco, Visser A a, Van Diepeningen AD, Klerks MM, Termorshuizen AJ & van Bruggen AHC (2007) Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiology* 24: 106–112.
- Gaffky GTA (1884) Zur Aetiologie des Abdominaltyphus. *Mittheilungen aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte* 2: 372–420.
- Galan J, Ginocchio Christine & Costeas P (1992) Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *Journal of Bacteriology* 174: 4338–4349.
- Garrec N (2003) Comparison of a cultural method with ListerScreen plus Rapid'L.mono or PCR-ELISA methods for the enumeration of *L. monocytogenes* in naturally contaminated sewage sludge. *Journal of Microbiological Methods* 55: 763–773.
- Gorski L, Duhé JM & Flaherty D (2011) The Sigma B operon is a determinant of fitness for a *Listeria monocytogenes* serotype 4b strain in soil. *Foodborne Pathogens and Disease* 8: 699–704.
- Handeland K, Refsum T, Johansen BS, Holstad G, Knutsen G, Solberg I, Schulze J & Kapperud G (2002) Prevalence of *Salmonella typhimurium* infection in Norwegian hedgehog populations associated with two human disease outbreaks. *Epidemiology and Infection* 128: 523–527.
- Hanning IB, Nutt JD & Ricke SC (2009) Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. *Foodborne Pathogens and Disease* 6: 635–648.
- Heaton JC & Jones K (2008) Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of applied microbiology* 104: 613–626.

- Hellström S, Kiviniemi K, Autio T & Korkeala H (2008) *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain. *Journal of Applied Microbiology* 104: 883–888.
- Ho JL, Shands KN, Friedland G, Eckind P & Fraser DW (1986) An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Archives of Internal Medicine* 146: 520–524.
- Hutchison M, Walters L, Avery S, Munro F & Moore A (2005) Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1231–1236.
- Hutchison M, Walters L, Avery S, Syngé B & Moore A (2004) Levels of zoonotic agents in British livestock manures. *Letters in Applied Microbiology* 39: 207–214.
- Hutchison M, Walters L, Moore A, Crookes K & Avery S (2004) Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5111–5118.
- Hülphers G (1911) Lefvernekros hos kanin orsakad av en ej förut beskriven bakterie. *Svensk Veterinärtidskrift* 16: 265–273.
- Ibarra JA & Steele-Mortimer O (2009) Salmonella – the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular Microbiology* 11: 1579–1586.
- Jablasone J, Warriner K & Griffiths M (2005) Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *International Journal of Food Microbiology* 99: 7–18.
- Jiang X, Islam M, Morgan J & Doyle Michael P (2004) Fate of *Listeria monocytogenes* in bovine manure-amended soil. *Journal Of Food Protection* 67: 1676–1681.
- Kandeler E & Gerber H (1988) Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* 6: 68–72.
- Kjeldahl J (1883) Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Fresenius Journal Of Analytical Chemistry* 366–382.
- Klerks MM, Franz Eelco, van Gent-Pelzer Marga, Zijlstra Carolien & van Bruggen AHC (2007) Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *The ISME Journal* 1: 620–631.
- Klerks MM, van Gent-Pelzer M, Franz E, Zijlstra C & van Bruggen AHC (2007) Physiological and molecular responses of *Lactuca sativa* to colonization by *Salmonella enterica* serovar Dublin. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4905–4914.

- Koch J, Schrauder A, Alpers K, Werber D, Frank C, Prager R, Rabsch W, Broll S, Feil S, Roggentin P, Bockemühl J, Tschäpe H, Ammon A & Stark K (2005) *Salmonella agona* outbreak from contaminated aniseed, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1124–1127.
- Kroupitski Y, Pinto R, Brandl M T, Belausov E & Sela S (2009) Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1876–1885.
- Kroupitski Yulia, Golberg D, Belausov Eduard, Pinto Riky, Swartzberg D, Granot D & Sela Shlomo (2009) Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6076–6086.
- Krtinić G, Đurić P & Ilić S (2010) Salmonellae in food stuffs of plant origin and their implications on human health. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 29: 1321–1325.
- Kudva IT, Blanch K & Hovde CJ (1998) Analysis of *Escherichia coli* O157: H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3166–3174.
- Kuhn M & Goebel Werner (1989) Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infection and Immunity* 57: 55–61.
- Kutter S, Hartmann A & Schmid Michael (2006) Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria spp.* *FEMS Microbiology Ecology* 56: 262–271.
- Köhler S, Leimeister-Wächter M, Chakraborty T, Lottspeich F & Goebel W (1990) The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 58: 1943–1950.
- Leclercq A (2004) Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. *Journal of Microbiological Methods* 57: 251–258.
- Lee S-Y & Baek S-Y (2008) Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. *Food Microbiology* 25: 582–587.
- Lettini AA, Barco L, Mancin M, Ramon E, Longo A, Pozza MCD, Ruffa M, Lucchini R & Ricci A (2012) A Pilot Study for Identification of Salmonella in Food Processing Plants by Real-Time PCR Screening. *Food Analytical Methods* 5: 988–994.

- Lichtman SN, Okoruwa EE, Keku J, Schwab JH & Sartor RB (1992) Degradation of endogenous bacterial cell wall polymers by the muralytic enzyme mutanolysin prevents hepatobiliary injury in genetically susceptible rats with experimental intestinal bacterial overgrowth. *The Journal of Clinical Investigation* 90: 1313–1322.
- Lignieres J (1900) Maladies du porc. *Bull. Soc. Cent. Med. Veterin.* 18: 389–431.
- Lorber B (1997) Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases* 24: 1–11.
- Low JC & Donachie W (1997) A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *The Veterinary Journal* 153: 9–29.
- Ma L, Zhang G & Doyle Michael P (2011) Green fluorescent protein labeling of *Listeria*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 for safety-related studies. *PloS one* 6: e18083.
- Mahmoudi N, Slater GF & Fulthorpe RR (2011) Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soils. *Electrophoresis* 628: 623–628.
- Makino S, Kobori H, Asakura H, Watarai M, Shirahata T, Ikeda T, Takeshi K & Tsukamoto T (2000) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiology and Infection* 125: 55–61.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M & Schleifer KH (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 593–600.
- McLauchlin J (1996) The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control* 7: 187–193.
- McLaughlin HP, Casey PG, Cotter J, Gahan CGM & Hill C (2011) Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Archives of Microbiology* 193: 775–785.
- Millan J, Aduriz G, Moreno B, Juste RA & Barral M (2004) *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain). *Revue Scientifique Et Technique Office International Des Epizooties* 23: 905–911.
- Le Minor L & Rhode R (1986) Genus *Salmonella* Lignieres 1900. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.): *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Co. Baltimore, USA, pp. 298–318.
- Murray EGD, Webb RA & Swann MBR (1926) A disease of Rabbits characterised by a large mononuclear Leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 29: 407–439.

- Nicholson FA, Groves SJ & Chambers BJ (2005) Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology* 96: 135–143.
- Notermans SH, Dufrenne J, Leimeister-Wächter M, Domann E & Chakraborty T (1991) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2666–2670.
- Ohl ME & Miller SI (2001) Salmonella: A Model for Bacterial Pathogenesis. *Annual Review of Medicine* 52: 259–274.
- Ottaviani F, Ottaviani M & Agosti M (1997) Differential Agar Medium for *Listeria monocytogenes*. “*Quimper Froid. Symposium Proceedings*” pp. 6. Quimper (France): A.D.R.I.A.
- O'Brien AD & Holmes RK (1987) Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 51: 206–220.
- O'Connor L, O'Leary M, Leonard N, Godinho M, O'Reilly C, Coffey L, Egan J & O'Mahony R (2010) The characterization of *Listeria spp.* isolated from food products and the food-processing environment. *Letters in Applied Microbiology* 51: 490–498.
- Palmgren H, Sellin M, Bergström S & Olsen B (1997) Enteropathogenic bacteria in migrating birds arriving in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 29: 565–568.
- Pangloli P, Ahmed O, Stevens JH, Golden DA & Draughton F (2007) Comparison of chromogenic agar media for recovery of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat meat and poultry products. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* 15: 230–239.
- Pirie JHH (1927) A new disease of veld rodents “Tiger River Disease.” *Publication South African Institute for Medical Research* 3: 163–186.
- Pirie JHH (1940a) *Listeria*: Change of Name for a Genus of Bacteria. *Nature* 145: 264.
- Pirie JHH (1940b) The genus *Listerella* Pirie. *Science* 91: 383.
- Platz S (1977) Untersuchungen über das Verhalten pathogener Mikroorganismen bei der Heißverrottung von Hühnerkot. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 24: 25–34.
- Rahn K, De Grandis S, Clarke RC, McEwen S, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R & Gyles CL (1992) Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes* 6: 271–279.

- Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP & Vijila HM (2007) *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 40: 4–13.
- Refsum Thorbjørn, Handeland Kjell, Baggesen DL, Holstad Gudmund & Kapperud Georg (2002) Salmonellae in Avian Wildlife in Norway from 1969 to 2000. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5595–5599.
- Renter DG, Gnad DP, Sargeant JM & Hygnstrom SE (2006) Prevalence and serovars of *Salmonella* in the feces of free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Nebraska. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 699–703.
- Robert Koch Institut (2011a) *EHEC O104 : H4 Ausbruch Deutschland 2011*.
- Robert Koch Institut (2012) *Epidemiologisches Bulletin, 6. Februar 2012 / Nr. 5*.
- Robert Koch Institut (2011b) *Obst- und Gemüsekonsum heute*.
- De Roever C (1998) Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control* 9: 321–347.
- Rothballer M, Schmid Michael & Hartmann A (2003) *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis* 34: 261–279.
- Rothballer MH (2004) *In situ* Lokalisierung , PGPR-Effekt und Regulation des *ipdC*-Gens der *Azospirillum brasilense* Stämme Sp7 und Sp245 bei verschiedenen Weizensorten , sowie endophytische Kolonisierung durch *Herbaspirillum sp.* N3.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
- Salmon DE & Smith T (1886) The bacterium of swine-plague. *American Monthly Microscopical Journal* 7: 204–205.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463–5467.
- Scharpf H & Wehrmann J (1976) Die Bedeutung des Mineralstickstoffvorrates des Bodens zu Vegetationsbeginn für die Bemessung der N-Düngung zu Winterweizen. *Landwirtschaftliche Forschung* 32: 100–114.
- Schlech WF et al. (1983) Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food. *New England Journal of Medicine* 308: 203–206.
- Seeliger HPR & Jones D (1986) Genus *Listeria* Pirie 1940. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.): *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Co. Baltimore, USA, Vol. 2, pp. 1235–1245.

- Semenov AV, van Overbeek L & van Bruggen AHC (2009) Percolation and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 3206–3215.
- Sinde E & Carballo J (2000) Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology* 17: 439–447.
- Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L & Tauxe RV (2004) Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal Of Food Protection* 67: 2342–2353.
- Skov MN, Spencer AG, Hald B, Petersen L, Nauerby B, Carstensen B & Madsen M (2004) The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* and thermophilic *Campylobacter spp.* between broiler flocks. *Avian Diseases* 48: 9–18.
- Sodha SV, Lynch M, Wannemuehler K, Leeper M, Malavet M, Schaffzin J, Chen T, Langer A, Glenshaw M, Hoefler D, Dumas N, Lind L, Iwamoto M, Ayers T, Nguyen T, Biggerstaff M, Olson C, Sheth A & Braden C (2011) Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with a national fast-food chain, 2006: a study incorporating epidemiological and food source traceback results. *Epidemiology and Infection* 139: 309–316.
- Stessl B, Luf W, Wagner M & Schoder D (2009) Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 106: 651–659.
- Stucki U, Frey J, Nicolet J & Burnens A (1995) Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 855–859.
- Sánchez S, Martínez R, García A, Vidal D, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Herrera-León S, Echeita A, Alonso JM & Rey J (2010) Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Veterinary Microbiology* 143: 420–423.
- Takkinen J, Nakari U, Johansson T, Niskanen T, Siitonen A & Kuusi M (2005) A nationwide outbreak of multiresistant *Salmonella Typhimurium* var Copenhagen DT104B infection in Finland due to contaminated lettuce from Spain, May 2005. *Eurosurveillance* 10: 194.
- Tebbe CC & Vahjen W (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2657–2665.
- Tsai YL & Olson BH (1992) Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 754–757.

- Tucker PW, Hazen EE & Cotton FA (1978) Staphylococcal nuclease reviewed: a prototypic study in contemporary enzymology. I. Isolation; physical and enzymatic properties. *Molecular and Cellular Biochemistry* 22: 67–77.
- Töwe S, Wallisch S, Bannert A, Fischer D, Hai B, Haesler F, Kleinedam K & Schloter M (2011) Improved protocol for the simultaneous extraction and column-based separation of DNA and RNA from different soils. *Journal of Microbiological Methods* 84: 406–412.
- US Food and Drug Administration (2003) *Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne Listeria monocytogenes Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods*.
- United States Department of Agriculture (2011) *USDA and HHS Announce New Dietary Guidelines to Help Americans Make Healthier Food Choices and Confront Obesity Epidemic*.
- Vieira-Pinto M, Morais L, Caleja C, Themudo P, Torres C, Igrejas G, Poeta P & Martins C (2011) *Salmonella* sp. in game (*Sus scrofa* and *Oryctolagus cuniculus*). *Foodborne Pathogens and Disease* 8: 739–740.
- Vinnerås B (2007) Comparison of composting, storage and urea treatment for sanitising of faecal matter and manure. *Bioresource Technology* 98: 3317–3321.
- Wacheck S, Fredriksson-Ahomaa M, König M, Stolle A & Stephan R (2010) Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease* 7: 307–312.
- Wachtel MR, Whitehand LC & Mandrell RE (2002) Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal Of Food Protection* 65: 18–25.
- Wagner M, Schmid M, Juretschko S, Trebesius KH, Bubert A, Goebel W & Schleifer KH (1998) *In situ* detection of a virulence factor *mRNA* and 16S *rRNA* in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters* 160: 159–168.
- Wang G, Zhao T & Doyle M P (1996) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2567–2570.
- Watkins J & Sleath KP (1981) Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water. *The Journal of Applied Bacteriology* 50: 1–9.
- Welshimer HJ & Donker-Voet J (1971) *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology* 21: 516–519.
- World Health Organization (2003) *Fruit and Vegetable Promotion*.

- Xu H, Lee H-Y & Ahn J (2010) Growth and virulence properties of biofilm-forming *Salmonella enterica* serovar typhimurium under different acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 7910–7917.
- Yadav RKP, Karamanoli K & Vokou D (2005) Bacterial colonization of the phyllosphere of mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microbial Ecology* 50: 185–196.
- Yoon Y, Kim K, Nam M, Shim W-B, Ryu J-G, Kim D-H, You O-J & Chung D-H (2010) Microbiological assessment in strawberry production and recommendations to establish a good agricultural practice system. *Foodborne Pathogens and Disease* 7: 1511–1519.
- Zhang B, Bai Z, Hoefel D, Wang X, Zhang L & Li Z (2010) Microbial diversity within the phyllosphere of different vegetable species. *Current Research, Technology and Education topics in applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (Mendez-Vilas, A, ed), pp. 1067–1077.

H Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

Prof. Dr. Anton Hartmann für die Bereitstellung dieses sehr spannenden Themas, sowie für die sehr gute Unterstützung, die vielen netten und hilfreichen Diskussionen und die sehr schöne Arbeitsatmosphäre in der Gruppe.

Prof. Dr. Dirk Schüler für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit sowie allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Dr. Michael Schmid für die gute Betreuung dieser Arbeit, die vielen hilfreichen Gespräche sowie die netten Abende, sei es beim Schafkopfen oder bei den Löwen.

Dem gesamten PathOrganic Consortium für die sehr gute Zusammenarbeit sowie im speziellen Dr. Evelyn Hackl und Prof. Dr. Angela Sessitsch für die herausragende Organisation und Koordination dieses Projektes.

Dr. Andreas Gattinger sowie Georg Gerl für die Hilfe bei der Kontaktaufnahme mit den landwirtschaftlichen Betrieben sowie nochmals Dr. Andreas Gattinger für die Durchführung der Feldversuche und die schönen Abende am Tannenhof.

Dr. Roland Fuss und der Abteilung Analytische BioGeoChemie des Helmholtz Zentrums München für die Hilfe bei den chemischen Analysen der Hofdüngerproben.

Dr. Doreen Fischer und Barbara Pfitzner für die tolle Hilfe in den Nachtschichten bei der Probenaufbereitung der Feldproben.

Angelika Schulz und Angelo Weiss für die Unterstützung und Hilfe im Laboralltag.

Angelo Weiss für die „rührende“ Hilfe beim Ansetzen der Gewächshausproben.

Allen Mitgliedern des AMP und im Speziellen allen Mitstreitern im „31er Block“ für die gute Arbeitsatmosphäre und die tolle Zeit in der Arbeitsgruppe.

Barbara Fischer und Dr. Doreen Fischer für die viele Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Meiner Familie für die viele Unterstützung und Geduld.

Meinem Schatz Doreen für die viele Hilfe, die wunderschöne Zeit und für so Vieles mehr. Ich kann dir gar nicht genug danken.