

**Systemische Kolonisierung von
Weißklee (*Trifolium repens*) durch
*Clostridium botulinum***

Matthias Christian Zeiller

Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktionen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Januar 2016

1.Gutachter: Prof. Dr. Anton Hartmann¹

2.Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung²

¹ Helmholtz Zentrum München

Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)

Department für Umweltwissenschaften, Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen (AMP)

Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg

² Ludwig-Maximilians-Universität München

Biozentrum, Department Biologie, Abteilung Mikrobiologie

Großhaderner Str. 2-4, 82152 Martinsried

Eingereicht am: 21.01.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2016

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikation:

Zeiller, M, M Rothballer, A N Iwobi, H Böhnelt, F Gessler, A Hartmann und M Schmid. 2015.
“Systemic colonization of clover (*Trifolium repens*) by *Clostridium botulinum* strain 2301”.
Front. Microbiol. **6**: 1207.

***für meine Familie
und meine Freunde***

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Historie	7
1.2 <i>Clostridia</i> : Taxonomie und Eigenschaften	8
1.3 Genetische Diversität und Entwicklungslinien	10
1.4 Vorkommen und Ökologie von <i>C. botulinum</i>	13
1.5 Toxine von <i>C. botulinum</i>	15
1.6 Botulismus	19
1.6.1 Botulismus bei Tieren	19
1.6.2 Humaner Botulismus	22
1.7 Mikroben-Pflanzen-Interaktionen	25
1.7.1 Interaktionen von Symbionten und PGPR mit Pflanzen	26
1.7.2 Interaktionen von pathogenen Mikroorganismen mit Pflanzen	27
1.8 Klee (<i>Trifolium</i>) als Modellpflanze	29
1.9 Biogasproduktion	30
1.10 Ausgangslage für die vorliegende Arbeit	32
1.11 Aufgabenstellung	34
2. Material und Methoden	35
2.1 Verwendete Bakterienstämme	35
2.2 Herstellung von Lösungen, Puffer und Reagenzien	36
2.3 Kulturführung und Medien	37
2.3.1 Clostridien-Stämme	38
2.3.2 <i>Rhizobium leguminosarum</i>	42
2.3.3 <i>Escherichia coli</i>	42
2.3.4 Stammhaltung	43
2.4 Pflanzsysteme	43
2.4.1 Verwendete Pflanzen	44

2.4.2	Axenisches System	44
2.4.3	Bodensystem (Topfexperimente)	45
2.4.4	Inokulation der Pflanzsysteme	47
2.4.5	Klimabedingungen innerhalb der Phytokammer	48
2.4.6	Ernte der Pflanzen	48
2.4.7	Auswertung der Wachstumsversuche	49
2.5	Molekularbiologische Methoden	49
2.5.1	DNS-Isolierung	49
2.5.2	Plasmidisolierung	50
2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion	50
2.5.4	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	52
2.5.5	Präparative Gelelektrophorese	52
2.5.6	PCR-Aufreinigung	53
2.5.7	Klonierung	53
2.5.8	Sequenzierung	54
2.5.9	Auswertung von Sequenzdaten	56
2.5.10	Wachstumsparameter der Bakterienstämme	56
2.5.11	Fixierung	57
2.5.12	Vorbehandlung Gram-positiver Bakterien	58
2.5.13	Färbungen	58
2.6	Diagnostischer Nachweis inokulierter Clostridien	59
2.6.1	16S-rDNS (P930/P932)	60
2.6.2	<i>bont D</i> – Gen (Toxin-Gen)	60
2.7	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	61
2.8	Markierung von Clostridien mit <i>evoglow</i>	65
2.8.1	Elektroporation	66
2.8.2	Überprüfung der Transformation mittels PCR	67
2.9	Mikroskopische Methoden	67
2.9.1	Durchlicht-Mikroskopie	68
2.9.2	Epifluoreszenz-Mikroskopie	69

2.9.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	69
2.10	Beprobung von Fermentern zur Biogasproduktion	70
3.	Ergebnisse	71
3.1	Wachstum der Clostridien	71
3.1.1	Wachstumstemperatur von <i>C. botulinum</i> / <i>C. sporogenes</i>	71
3.1.2	Wachstumsphasen der Clostridien	72
3.2	DNS-Isolierung in den verschiedenen Wachstumsphasen	73
3.3	Sporen	74
3.3.1	Sporulation von <i>C. botulinum</i> bzw. <i>C. sporogenes</i>	74
3.3.2	DNS-Isolierung aus Sporen	75
3.3.3	Widerstandsfähigkeit der Sporen	75
3.4	Diagnostische PCR zur Detektion von Clostridien	77
3.4.1	Detektionslimit der verschiedenen PCR Systeme	77
3.4.2	Detektionslimit bei Anwesenheit von pflanzlicher DNS	79
3.4.3	Schwierigkeiten beim Nachweis des <i>bont</i> D Toxin-Gens	80
3.4.4	Einfluss der Sporenbildung auf den Nachweis des <i>bont</i> D-Gens	83
3.5	<i>In planta</i> PCR-Detektion der inokulierten Clostridien	83
3.5.1	Detektion ohne Aktivierung/Anreicherung der Clostridien	84
3.5.2	Detektion nach spezifischer Aktivierung/Anreicherung der Clostridien	84
3.6	Pflanzenwachstumsfördernder Effekt	91
3.6.1	Axenisches Pflanzsystem	92
3.6.2	Bodensysteme	93
3.7	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	95
3.8	Markierung mit <i>evoglow</i>	98
3.8.1	Sensitivität der Clostridien auf verschiedene Antibiotika	99
3.8.2	Überprüfung der Transformationseffizienz	99
3.8.3	Erworbene Fluoreszenz	102
3.9	Lokalisierungsstudien	103
3.9.1	Lokalisierung der Clostridien in Pflanzenmaterial mit FISH	103
3.9.2	Lokalisierung der <i>evoglow</i> -markierten Stämme in Pflanzenmaterial	105

3.10 Beprobung von Biogasproduktionsanlagen _____	107
4. Diskussion _____	109
4.1 Nachweis/Lokalisierung der inokulierten Clostridien <i>in planta</i> _____	109
4.1.1 Nachweis mittels PCR _____	109
4.1.2 Lokalisierung der inokulierten Clostridien mit FISH/CLSM _____	110
4.2 Nachweis und Instabilität der Botulinumtoxin-Gene _____	113
4.3 Variabilität der Sporulation _____	114
4.4 Axenisches System vs. Bodensystem _____	114
4.5 Reporter-gen-Markierung der Clostridien-Stämme _____	115
4.5.1 Fluoreszenzmarkierung der Clostridien _____	116
4.5.2 Elektroporation: Transformation der Clostridien mit <i>evoglow</i> _____	116
4.6 Systemische Ausbreitung von Clostridien in Pflanzen _____	117
4.7 Wachstumsstimulierungseffekt durch Clostridien _____	119
4.8 Clostridien in Dünge- und Futtermitteln – Botulismus bei Tieren _____	120
4.9 Biogasproduktionsanlagen _____	122
Ausblick _____	124
5. Zusammenfassung _____	126
Summary _____	128
Abstract _____	130
6. Literaturverzeichnis _____	131
Tagungsbeiträge und Publikationen _____	144
Abbildungsverzeichnis _____	145
Tabellenverzeichnis _____	147
Danksagung _____	148

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	Irrtumswahrscheinlichkeit
μ	Mikro (10^{-6})
μm	Mikrometer
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
16S	16S-rRNS: kleine 30S-Untereinheit der prokaryotischen Ribosomen
3' - 5'	Orientierung eines DNS/RNS-Stranges (5' und 3')
A	Adenosin
Amp	Ampicillin
atm	Atmosphäre
AS	Aminosäure
a_w	Wasseraktivität; Maß für frei verfügbares Wasser in einem Material
BoNT	Botulinum-Neurotoxin
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
C.	<i>Clostridium</i>
Cbot	<i>Clostridium botulinum</i> IBT 2301
CL-T	Topferde
cm	Zentimeter
CMM	engl. <i>cooked meat medium</i> ; Kulturmedium
Cspo	<i>Clostridium sporogenes</i> 1739
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
d	Tag
Da	Dalton
dest.	einfach entionisiert
D-Glukose	D-Enantiomer der Glukose
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E.	<i>Escherichia</i>
ED-73	„Einheitserde“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE-0	Nullerde
EK	Einzelkolonie
et al.	lat. <i>et alteri</i> ; dt. „u.a.“ („und andere“)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
h	Stunde
H ₂ O _{reinst}	hochreines Wasser, entsalzt
HCl	Salzsäure
k	Kilo (10^3)
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare (10^3 Basenpaare)
kU	Kilo Units
l	Liter
LB	engl. <i>lysogeny broth</i> ; Kulturmedium

log.	dekadischer Logarithmus
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaare
MDa	Megadalton (= 10^6 Dalton), Masse
MeOH	Methanol
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MO	Mikroorganismen
msek	Millisekunde
n	Nano (10^{-9})
n.b.	nicht bestimmt
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorid
NaOH	Natronlauge
NB	engl. <i>nutrient broth</i> ; Kulturmedium
NFW	Nuklease freies Wasser
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
OD	optische Dichte
OT	Objekträger
p	Pico (10^{-12})
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> ; dt. Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> ; dt. Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pH-Wert	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
R.	<i>Rhizobium</i>
RCM	engl. <i>reinforced clostridial medium</i> , Kulturmedium
rDNS	Ribosomale DNS, kodierende Gene für ribosomale RNS
RNS	Ribonukleinsäure
Rleg	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (DSM 6039)
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> . dt. Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SSS	engl. <i>spore salt solution</i> ; Kulturmedium
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TPGY	engl. <i>trypticase-peptone-glucose-yeast medium</i> ; Kulturmedium
U	Unit
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
VD	Verdünnung
Vol.	Volumen
x-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galaktopyranosid
Y	Cytosin oder Thymin

1. Einleitung

1.1 Historie

In Deutschland traten in den letzten Jahrhunderten immer wieder Ausbrüche einer Krankheit beim Menschen auf, die in Zusammenhang mit dem Verzehr geräucherter Wurstwaren gebracht wurden (sog. "Wurstvergiftung"). Bei einem gut dokumentierten Ausbruch in Wildbad im Jahr 1793, der durch den Verzehr von einer Art Blutwurst verursacht wurde, erkrankten mehrere Landwirte tödlich (Kreyden *et al.*, 2000). Die Zahl der gemeldeten Fälle von Wurstvergiftung, die später als Botulismus bezeichnet wurde, stieg in den folgenden Jahrzehnten rasch an und veranlasste den deutschen Amtsarzt Justinus Kerner (1786-1862), eine groß angelegte medizinische Studie durchzuführen. Er sammelte Daten von Botulismus-Erkrankungen und konnte erstmals eine Kausalität zu dem Verzehr vergifteter Wurstwaren herstellen (Kerner, 1822). Aufgrund seiner Arbeiten in diesem Gebiet bezeichnete man Botulismus damals auch als Kerner'sche Erkrankung. Die Untersuchung eines Ausbruchs in Süddeutschland im Jahr 1895 lieferte grundlegende Informationen, aus denen ein Großteil unseres modernen Wissens über Botulismus resultiert. Nach Verzehr eines rohen, gesalzenen Schinkens erkrankten innerhalb der folgenden Tage 23 Menschen an einer zunehmend schweren, neuromuskulären Lähmung. Dieses Ereignis erregte die Aufmerksamkeit des belgischen Mikrobiologen Emile Pierre Marie van Ermengem (1851-1922), Professor für Bakteriologie an der Universität Gent und Schüler von Robert Koch (1843-1910), der 1882 das Tuberkelbazillus entdeckte, und die Grundzüge der modernen Bakteriologie legte. Im Zuge seiner Untersuchungen konnte ein bis dato unbekanntes sporenbildendes, obligat anaerobes, Toxin-produzierendes Bakterium isoliert werden (van Ermengem, 1897), wodurch die Fettsäuren-Theorie von Kerner widerlegt wurde. Er benannte den Organismus aufgrund seiner erstmaligen Isolierung aus Wurst *Bacillus botulinus* (v. lat. „*botulus*“, dt. „Wurst“) und stellte fest, dass Extrakte des Schinkens für Versuchstiere giftig waren und eine paralytische Krankheit auslösten, die große Ähnlichkeit zu Botulismus beim Menschen aufwies. Der Organismus, der für einen Botulismusausbruch in Deutschland verantwortlich war, wurde durch Landman 1904 aus in Dosen verdorbenen weißen Bohnen isoliert (Landmann, 1904). Dieser produzierte ein Toxin mit sehr ähnlicher Wirkung wie der von van Ermengem isolierte Organismus, konnte jedoch nicht durch ein Antitoxin gegen van Ermengems Stamm neutralisiert werden. Daher musste davon ausgegangen werden, dass es mindestens zwei Arten bzw. Toxine von *B. botulinus* gab (Leuchs, 1910). Die beiden Typen erhielten die Bezeichnung - Typ A und Typ B - gemäß ihrer chronologischen Entdeckung erst später (Burke, 1919). Der erste Typ C Toxin-produzierende Stamm wurde 1925 in den Vereinigten Staaten und Australien entdeckt und aus einer Goldfliegenlarve (*Lucilia caesar*), zur Familie der Schmeißfliegen (*Calliphoridae*) gehörig, isoliert (Bengston,

1922), wohingegen Typ D erstmals aus dem Kadaver einer Kuh isoliert wurde, die an einer Erkrankung mit Lähmungserscheinungen verstarb. Dieselbe Erkrankung galt als Ursache für den Tod zahlreicher Rinder in Südafrika (Robinson, 1929). Typ E wurde fast zur gleichen Zeit in Russland und in den Vereinigten Staaten bei Ausbrüchen von Botulismus isoliert, die mit dem Konsum von Fischereiprodukten assoziiert wurden (Gunnison *et al.*, 1936). Typ F-Toxin wurde von Moller und Scheibel (1960) entdeckt (Moller und Scheibel, 1960). Sie isolierten einen Organismus nach einem Ausbruch von Botulismus, der durch den Verzehr von hausgemachter Leberpastete verursacht wurde. Ein weiterer Toxintyp von *C. botulinum*, Typ G, wurde im Boden eines Maisfeldes in Argentinien gefunden (Giménez und Ciccarelli, 1970a). Der bis heute zuletzt isolierte Toxintyp von *C. botulinum*, Typ H, wurde aus einem Baby isoliert, welches an Säuglingsbotulismus erkrankt war (Barash und Arnon, 2014). 1949 konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Botulinumtoxin nicht, wie bisher angenommen, durch eine postsynaptische Blockade, sondern durch eine präsynaptische Hemmung der Acetylcholin-Ausschüttung bedingt ist (Burgen *et al.*, 1949). Die Genus Bezeichnung „*Clostridium*“ (griechisch: „Spindelchen“) wurde 1880 durch Prazmowski etabliert (Prazmowski, 1880). Um das anaerobe, sporenbildende, stäbchenförmige Bakterium von den aeroben Sporenbildnern abzugrenzen, wurde von Bengston eine neue Terminologie vorgeschlagen, so dass der Erreger als *Clostridium botulinum* bezeichnet wurde (Bengston, 1924). Heute ist *C. botulinum* die taxonomische Sammelbezeichnung für alle bekannten Organismen, die Botulinum-Neurotoxine (BoNT) produzieren und dadurch die Fähigkeit aufweisen, Botulismus bei Mensch und Tier auszulösen (Prévot, 1953).

1.2 *Clostridia*: Taxonomie und Eigenschaften

Stämme der Klasse ***Clostridia***, die ein breites Spektrum an obligat anaeroben, stäbchenförmigen, sporenbildenden, Gram-positiven Bakterienarten mit niedrigem GC-Gehalt enthält, kommen im Boden (Saprophyten), Wasser und verrottendem organischen Material (Destruenten) vor und sind ubiquitär in der Umwelt verbreitet. Unter der Vielzahl von Arten der Gattung *Clostridium* innerhalb der Familie ***Clostridiaceae*** produzieren einige Arten potente Neurotoxine und sind daher für neurologische Erkrankungen bei Mensch und Tier wie Tetanus (*C. tetani*), Gasbrand (*C. perfringens*) und Botulismus (*C. botulinum*) (Böhnel *et al.*, 2001; Johnson und Bradshaw, 2001), verantwortlich. Die Clostridien-Neurotoxine (CNT) sind für Menschen die am stärksten toxischen Proteine und beinhalten Botulinum-Neurotoxine (BoNT) und das Tetanus-Neurotoxin (TeNT). Der Neurotropismus der CNT basiert auf der bevorzugten Bindung an Neuronen und der Aufnahme in diese, gefolgt von einer spezifischen Spaltung neuronaler SNARE (*Soluble NSF Acceptor Protein Receptor*) - Proteine. Auf der anderen Seite sind viele Clostridien-Stämme aufgrund ihrer großen Stoffwechselvielfalt (z.B. vielfältige Gärungsformen) in der biotechnologischen Industrie wichtige Produzenten von Lösungsmitteln wie Aceton, Ethanol und Butanol (Dürre, 2008; Jang *et al.*,

2012) oder Methan und Biogas (Andreesen *et al.*, 1989). Ein gemeinsames Merkmal der Clostridien ist die Fähigkeit, bei schlechten Umweltbedingungen, wie z.B. einer reduzierten Nährstoffversorgung, oder sobald für das Wachstum andere limitierende Faktoren auftreten, extrem widerstandsfähige Endosporen zu bilden (Smith und Sugiyama, 1988).

Die Art ***Clostridium botulinum*** ist äußerst heterogen; sie besteht aus Stämmen und Untergruppen mit verschiedenen biochemischen Eigenschaften. Die Zellen sind gerade bis leicht gebogene Stäbchen von 2 - 10 µm Länge und einem Durchmesser von 0,5 - 1 µm (Montecucco *et al.*, 2006). Die Zellen sind aufgrund peritricher Geißeln mobil und treten einzeln oder in Paaren bzw. kurzen Ketten auf. Obwohl es sich bei *C. botulinum* um eine obligat anaerobe Bakterienart handelt, ist diese, verglichen mit anderen Vertretern der *Clostridiaceae*, relativ tolerant hinsichtlich Luftsauerstoff. Die Zellwand von *C. botulinum* hat einen für Gram-positive Bakterien typischen Aufbau. Die Zellen können sich jedoch nach Übergang in die vegetative Wachstumsphase Gram-variabel verhalten. Oberflächlich lokalisierte Proteine können als Bestandteile der Zellwand oder als Komponenten von Oberflächenstrukturen oder Anhängseln der Zelle, wie Flagellen und Fimbrien, vorkommen und zur Pathogenese beitragen. Zellwandproteine wirken als Immunogene; dies führt bei einer Infektion zur Auslösung einer Immunantwort.

Die **Sporen** von *C. botulinum* zählen zu den widerstandsfähigsten aller bekannten Überdauerungsformen, die z.B. mehr als 30 Jahre in Böden persistieren können (Hofer und Davis, 1972). Sie weisen eine extrem hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Hitze und Kälte, Trockenheit, verschiedenen Arten von Strahlung (UV-Strahlung, radioaktive Strahlung), chemischen Substanzen (Natriumhydroxid, Ameisensäure, Phenole, organische Lösungsmittel, Alkohole (Smith und Sugiyama, 1988)), Enzymen (Lysozym) und extremen pH-Werten auf. Diese Widerstandskraft beruht auf der Ausbildung einer mehrschichtigen Zellwand bzw. innerer und äußerer Sporenhüllschichten, der Einlagerung von Calciumdipicolinat und einem relativ geringen Wassergehalt, sowie metabolischer Inaktivität. Die im Protoplasten enthaltene DNS wird von der zytoplasmatischen Membran und einer kortikalen Membran, welche primär aus Peptidoglycan besteht und 2,6-Diaminopimelinsäure enthält, umgeben und durch sog. SASP (*small acid soluble proteins*) geschützt. Die Sporen aller *C. botulinum*-Stämme sind subterminal lokalisiert, wobei sie in ihrer Morphologie variieren und je nach Stamm gelegentlich dicker als die Mutterzelle sind und daher das vegetative Sporangium z.T. deutlich anschwellen lassen. Die Transformation der ruhenden Sporen in multiplikationsfähige vegetative Zellen verläuft unter geeigneten Wachstumsbedingungen in drei Stufen. Der erste Schritt ist die Aktivierung, wodurch die Keimung induziert wird. Die zweite Stufe beinhaltet degenerative Änderungen, wodurch die Sporen ihre Hitze- und Strahlungswiderstandsfähigkeit verlieren. Die dritte Stufe ist durch die Synthese von Zellkomponenten gekennzeichnet, wodurch vegetative Zellen entstehen.

Alle Toxin-produzierenden *C. botulinum*-Stämme weisen einen DNS–GC-Gehalt zwischen 24% und 28% auf (Cato *et al.*, 1986) und gehören aufgrund der 23S-rRNS-Homologie zur **Clostridia Gruppe I** (Johnson und Francis, 1975), welche die Typspezies *C. butyricum* enthält. Der alleinige Grund für die Zuordnung zur Art (**taxonomische Stellung**) ist die Fähigkeit zur Bildung von hochwirksamen Neurotoxinen, den so genannten Botulinum-Neurotoxinen (BoNT) (Prévot, 1953; Skerman *et al.*, 1980; Collins und East, 1998), obwohl nicht-toxigene Arten vorkommen. Nach heutigem Stand wird *C. botulinum* anhand der Bildung der verschiedenen neurotoxischen Proteine (Toxintypen), welche sich serologisch hinsichtlich ihrer Neutralisierung mit Antikörpern unterscheiden, in acht Untergruppen eingeteilt. Den Stämmen wird anhand des jeweiligen gebildeten Neurotoxins - entsprechend der chronologischen Abfolge ihrer Entdeckung [1.1] - ein fortlaufender Buchstabe von **A bis H** zugeordnet. Bei Typ C-Stämmen unterscheidet man zwei Subtypen: Typ C α und C β (Smith und Sugiyama, 1988). C α -Stämme produzieren das Neurotoxin C1 (BoNT C) und ein weiteres Toxin (C2-Toxin, [1.5]), welches kein Neurotoxin darstellt. C β -Stämme produzieren nur das C2-Toxin (Collins und East, 1998). Phylogenetisch eindeutig nahe verwandte Clostridien, die jedoch nicht in der Lage sind, ein Botulinumtoxin zu produzieren, werden taxonomisch verschiedenen Arten wie *C. sporogenes* und *C. subterminale* zugeordnet. Hinsichtlich einer korrekten taxonomischen Einteilung ist die bisherige Klassifikation und der Gebrauch der Bezeichnung *C. botulinum* kritisch, da BoNT auch durch *Clostridium*-Stämme produziert werden können, die deutlich von bereits beschriebenen *C. botulinum*-Stämmen abweichen und biochemisch bzw. genetisch mit anderen Arten, wie *C. butyricum* (McCroskey *et al.*, 1986) und *C. baratii* (Hall *et al.*, 1985) verwandt sind. Einige Vertreter dieser beiden Stämme produzieren wie *C. botulinum* ebenso BoNT E und F-Toxine und sind daher mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden (McCroskey *et al.*, 1986). Ein Problem bezüglich der taxonomischen Einordnung stellt die Tatsache dar, dass die Toxin-Gene von *C. botulinum* Typ C und D durch Phagen kodiert werden [1.5] und nicht fest ins Genom der Stämme integriert sind (Eklund und Poysky, 1974). Die Klassifizierung nach Prévot (1953) kann daher nicht konsequent eingehalten werden. Eine Reklassifikation, wie sie beispielsweise von Hunter und Poxton (2002) oder von Collins und East (1998) vorgeschlagen wurde, konnte bis heute nicht etabliert werden.

1.3 Genetische Diversität und Entwicklungslinien

Clostridium botulinum-Stämme umfassen sowohl proteolytische als auch chitinolytische Bakterien, die mehrere extrazelluläre Proteasen und Chitinasen produzieren. Die Wirkung der Kombination von Adhäsinen, extrazellulärer Matrix-bindender Proteine, Proteasen und Cytolysin trägt zur umfangreichen Zerstörung von Geweben verwesender Kadaver toter Tieren bei, während das chitinolytische System eingesetzt wird, um chitinhaltige Organismen wie Insekten, Pilze und Krebstiere verwerten zu können (Sebahia *et al.*, 2007). Analysen zur

Diversität (16S-rRNS und DNS-Hybridisierungen) haben gezeigt, dass verschiedene Entwicklungslinien innerhalb des *C. botulinum*-Komplexes existieren, die durch genetisch unterscheidbare Cluster repräsentiert werden und die Organismen anhand ihrer physiologischen Eigenschaften **vier phänotypischen Gruppen (I bis IV)** zugeordnet werden können (Hutson *et al.*, 1993; Collins und East, 1998) [Tabelle 1.1]. Innerhalb der Gruppen sind die Stämme untereinander, unabhängig vom Toxintyp (Böhnel und Seifert, 1995), entsprechend ihrer phänotypischen Eigenschaften, DNS/DNS-Homologie und 16S-rRNS-Sequenz eng miteinander verwandt und bilden jeweils einen eigenen phylogenetischen Zweig im taxonomischen Stammbaum. Die optimale Wachstumstemperatur, sowie der optimale pH-Wert für das Wachstum, sind abhängig von der jeweiligen Gruppe [1.2].

Tabelle 1.1: Vier phänotypische Gruppen (I bis IV) von *C. botulinum*.
(Collins und East, 1998; Smith und Sugiyama, 1988).

Gruppe	I	II	III	IV
Toxintyp	Typ A und proteolytische Typ B und F -Stämme	Typ E und saccharolytische Typ B und F -Stämme	Typ C und D -Stämme	Typ G -Stämme
Wachstumsoptimum	35°C – 40°C	18°C – 25°C	40°C	37°C
Minimale Wachstumstemperatur	10°C	3°C	15°C	n.b.
Hitzeresistenz der Sporen	112°C	80°C	104°C	104°C

Die **Gruppe I** beinhaltet nur proteolytische Stämme und umfasst alle Stämme des Typ A, proteolytische Stämme des Typ B und Typ F [Tabelle 1.1] und die der dualen Toxintypen AB, Ab, Af und Bf (Hutson *et al.*, 1996; Barash und Arnon, 2004). Toxigene *C. butyricum* und *C. baratii*-Stämme sind genetisch und phänotypisch mit Stämmen der Gruppe I verwandt (Popoff, 1995). Im Fall der dualen Toxintyp-Stämme werden zwei Neurotoxine in der Regel in unterschiedlichen Anteilen produziert (Schreibweise aB, Ab; Großbuchstabe = mengenmäßig primär gebildeter BoNT-Typ). Die vegetativen Zellen der Gruppe I sind mesophil und somit in der Lage, in einem Temperaturbereich von 10°C bis 48°C zu wachsen (Smith und Sugiyama, 1988). Ihre Sporen haben eine hohe Hitzebeständigkeit mit bis zu 112°C (Scott und Bernard, 1982). Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei ca. 37°C. Der optimale pH-Wert beträgt 6,8 bis 7,0, wobei unter bestimmten Bedingungen ein Wachstum bis zu einem pH-Wert von 4,3 auftreten kann. Des Weiteren besteht eine ausgeprägte DNS-Homologie zu dem atoxischen *C. sporogenes*-Stamm. Eine Abgrenzung aufgrund von metabolischen oder biochemischen Parametern ist daher unmöglich (Kiritani *et al.*, 1973; Cato, 1986). Stämme der Gruppe I weisen ein Genom mit ca. 4 Mb (Lin und Johnson, 1995) auf und bilden sowohl Fermentationsprodukte wie Essigsäure und Buttersäure, als auch Isobutter- und Isovaleriansäure und mehrere Alkohole.

In **Gruppe II** finden sich die hauptsächlich Kohlenhydrat-verwertenden Stämme des Typ E und nicht-proteolytische (saccharolytische) Stämme von Typ B und Typ F [Tabelle 1.1]. Die vegetativen Zellen aller Organismen dieser Gruppe zeigen eine psychrotrophe Natur mit hoher Kältetoleranz und sind in der Lage, bei Temperaturen bis zu 3°C zu wachsen (Eklund *et al.*, 1967). Sporen der Gruppe II haben eine moderate Hitzebeständigkeit bis zu 80°C (Lindström *et al.* 2003). Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt bei etwa 18°C bis 25°C. Der limitierende pH-Wert ist von vielerlei Faktoren abhängig. Der niedrigste pH-Wert, der einen Übergang von Sporen in die vegetative Wachstumsphase von Typ E-Sporen erlaubt, ist pH 6,2 bei 5°C bzw. pH 5,4 bei einer Inkubationstemperatur von 16°C (Emodi und Lechowich, 1969). Auch die limitierende Salzkonzentration ist temperaturabhängig und liegt im Bereich von 3% NaCl (a_w -Wert: 0,985) bei 5°C bis 5% NaCl (a_w -Wert: 0,975) bei 16°C. Organismen der Gruppe II sind widerstandsfähiger bezüglich Natriumchlorid als Organismen der Gruppen I und III. Wie bei Gruppe I liegt die Genomgröße der Organismen der Gruppe II bei ca. 4 Mb (Hielm *et al.*, 1998a). Verglichen mit Gruppe I ist die genetische Vielfalt der Gruppe II, vor allem bei *C. botulinum* Typ E, größer (Hielm *et al.*, 1998a; Keto-Timonen *et al.*, 2005; Kirkwood *et al.*, 2006; Leclair *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass viele *Clostridium* Isolate ein oder mehrere Plasmide enthalten, erhöht die Biodiversität (Strom *et al.*, 1984; Hielm *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur Gruppe I zeigt Gruppe II konsequent drei große Cluster (Hielm *et al.*, 1998; Leclair *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2007). Im Allgemeinen bestehen zwei dieser Cluster alleine aus Typ E und das dritte Cluster enthält Typ B- und Typ F-Stämme, was darauf hindeutet, dass die drei Cluster genetisch unterschiedliche Linien repräsentieren (Hill *et al.*, 2007).

Gruppe III besteht aus nicht- oder schwach proteolytischen Stämmen der Toxintypen C und D. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt etwa 40°C und liegt somit leicht höher als die der Stämme anderer *C. botulinum*-Gruppen. Die meisten Stämme wachsen gut bei 37°C bis 45°C, schlecht bei 25°C und kaum noch bei 15°C. Bei 10°C findet auch nach langer Inkubation kein Wachstum statt (Segner *et al.*, 1971a; Segner und Schmidt, 1971; Segner *et al.*, 1971b). Das frühe Wachstum in Nährlösung ist gleichmäßig, gefolgt von der Bildung eines Sediments oder von Zelllyse. Die limitierende Salzkonzentration variiert über einen weiten Bereich in Abhängigkeit von Faktoren, wie pH-Wert und Temperatur, wobei 10% NaCl das Wachstum der meisten Stämme hemmt. Eine Ausnahme stellen marine Stämme dar, für die die limitierende Salzkonzentration höher ist. Gruppe III Sporen haben eine Hitzebeständigkeit bis zu 104°C. Die Typ C und D-Toxine sind hinsichtlich ihrer Antigene verwandt [1.5]. Kolonien zeigen auf festen Nährmedien eine kreisförmige Form mit leicht unregelmäßigen Rändern, die durchscheinend bis grau-weiß gefärbt auftreten.

Die wichtigsten Gärungsprodukte der Gruppe III Organismen sind Propionsäure und Buttersäure mit geringeren Mengen an Essigsäure, Valerian- und Bernsteinsäure.

Gelatine wird verflüssigt, Fleisch und Milch wird von einigen Stämmen langsam abgebaut. Stämme vom Typ C und D sind sich physiologisch sehr ähnlich. Ein Typ kann in den anderen über nicht-Toxin-produzierende Serotypen transformiert werden [1.5].

Die **Gruppe IV** besteht aus Stämmen, die langsam proteolytisch sind, wobei sie zwei- bis viermal so lange wie Typ A-Stämme benötigen, um geronnenes Serum, Eiweiß oder Fleisch zu verdauen. Sie sind nicht-saccharolytisch und das Enzym Lipase fehlt ihnen (Solomon *et al.*, 1985). Das einzige produzierte Toxin der Stämme dieser Gruppe, in der 7 Vertreter beschrieben sind, ist Typ G. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt 37°C, obwohl Kulturen bei Temperaturen von 25°C und 45°C wachsen können (Collins und East, 1998). Stämme des Typ G werden ab 6,5% NaCl gehemmt. Diese Gruppe, zu der auch nicht-toxigene Stämme von *C. subterminale* und *C. hastiforme* zählen, unterscheidet sich metabolisch von den anderen Gruppen. Wegen der phänotypisch und genetisch verschieden ausgeprägten Eigenschaften wurden die Stämme der Gruppe IV einer anderen Art zugeordnet und in der Artbezeichnung *C. argentinense* zusammengefasst (Suen *et al.*, 1988a; Suen *et al.*, 1988b).

1.4 Vorkommen und Ökologie von *C. botulinum*

Clostridium botulinum ist ubiquitär verbreitet; vor allem die für lange Zeit in der Umwelt überdauernden Sporen können weltweit nachgewiesen werden. Das Vorkommen der verschiedenen physiologischen Gruppen [1.3] von *C. botulinum* hängt weitgehend von Temperatur, Wasseraktivität (a_w -Wert), pH-Wert und Nährstoffversorgung ab. Gruppe I und II-Stämme stellen unterschiedliche Ansprüche an deren Umwelt. Durch den heutzutage globalen Tier-, Reise- und Warenverkehr wird eine weltweite Verbreitung begünstigt (Böhnel und Seifert, 1995). *Clostridium botulinum*-Stämme der Gruppe I dominieren in wärmeren Regionen der Welt, wohingegen Gruppe II-Organismen überwiegend in Gebieten mit einem milden Klima in der nördlichen Hemisphäre auftreten. **Gruppe I** zeigt generell eine hohe Prävalenz in Böden, Sedimenten im Landesinneren und ehemaligen Viehgründen, die sich durch relativ geringen Niederschlag (niedriger a_w -Wert) und durch ein warmes Klima auszeichnen (Smith und Moryson, 1975; Chulkova *et al.*, 1976; Hauschild und Dodds, 1993; Lindström *et al.*, 2001). Darüber hinaus scheinen Insekten eine wichtige Rolle in der Epidemiologie der Gruppe I zu spielen. So werden Gruppe I-Stämme häufig in Bienen, Bienenstöcken und auch in Honig nachgewiesen (Nevas *et al.*, 2005; Nevas *et al.*, 2006). Eine besonders hohe Inzidenz von Gruppe I Typ B-Stämmen wurde in Ländern festgestellt, in denen ein gängiger Infektionsweg verdorbenes Fleisch darstellt (Hauschild und Dodds, 1993).

Das natürliche Auftreten der **Gruppe II**-Stämme, Typ E im Besonderen, scheint eng mit der aquatischen Umwelt mit einem hohen a_w -Wert assoziiert zu sein (Hauschild und Dodds, 1993). Typ E-Stämme können oft aus Proben aquatischer Herkunft isoliert werden, wie aus Wasser und Sedimenten von Süßwasserseen und Bächen (Eklund *et al.*, 1966; Eklund und Poysky, 1966), sowie aus Wasser der Nord- und Ostsee (Hielm *et al.*, 1998). Häufig kommt *C. botulinum*, vor allem Typ E, in Fischereiprodukten wie Süß- (Hielm *et al.*, 1998) und Salzwasserfischen (Hyytiä *et al.*, 1999) und Krustentieren vor. Aus Süßwassersedimenten stammend, werden die Organismen und deren Sporen über Flüsse bis ins Meer gespült (Johannsen, 1963). Die Isolierung eines identischen Typ E-Genotypen aus verschiedenen aquatischen Standorten (Hielm *et al.*, 1998) zeigt, dass Vertreter der Gruppe II große Entfernungen zusammen mit Bodenwasser zurücklegen (Huss, 1980). Typ E-Stämme zeigen die Tendenz, am besten in relativ kühlen Regionen zu wachsen. Typ F-Stämme wurden aus marinen Sedimenten (Eklund *et al.*, 1966; Eklund und Poysky, 1966) isoliert.

Das wichtigste Reservoir der **Gruppe III**, Typ C und D-Stämme, sind Sedimente oder Böden, die in Kontakt mit Wasser stehen und von denen aus die Sporen in den Gastrointestinaltrakt von Tieren übertragen werden. Typ C-Stämme haben als einen ihrer wichtigsten Lebensräume den Schlamm von Seen und Flüssen (Serikawa *et al.*, 1977) und sind weltweit in der Umwelt verbreitet (Ohishi *et al.*, 1979). Es scheint möglich, dass Organismen der Gruppe III, ähnlich wie Typ E, in marinen Sedimenten auftreten, jedoch ursprünglich aus Süßwasserbächen stammen. Die niedrigeren Temperaturen im Winter hemmen das Wachstum der Typ C-Stämme, wodurch der Einfluss der Umgebungstemperatur auf das Auftreten deutlich wird (Marion *et al.*, 1983). Typ D-Stämme konnten in nächster Nähe zu einer aquatischen Umwelt auch in Boden, Schlamm, Sand und Wasserproben von Küstengebieten und Sedimenten, insbesondere solche aus den wärmeren Teilen der Welt, gefunden werden. Vertreter der Gruppe III sind oft obligate Darmbakterien von vielen Säugetier- und Vogelarten und stellen einen Teil der Darmflora im Gastrointestinaltrakt dar (Lindström *et al.*, 2001) [1.6.1]. Aas ermöglicht die Übertragung der Sporen auf andere Tiere, Pflanzen und die Umwelt.

Zwei Stämme der **Gruppe IV** (Typ G), darunter der erste beschriebene Stamm, wurden aus Bodenproben in Argentinien (Giménez und Ciccarelli, 1970b) isoliert. Fünf Stämme wurden in der Schweiz bei einer Autopsie von Patienten isoliert (Sonnabend *et al.*, 1981; Sonnabend *et al.*, 1987).

1.5 Toxine von *C. botulinum*

Neben den BoNT werden weitere Proteine beschrieben, die z.T. auch als Toxine bezeichnet werden können (Bonventre *et al.*, 1967). Dazu gehören das von C und D-Stämmen gebildete **C2-Toxin** (Ohishi und Tsuyama, 1986; Ohishi, 1987) und das ebenfalls bei BoNT C vorkommende **C3-Toxin** (Aktories *et al.*, 1987). Die BoNT, sowie C2- und C3-Toxin stellen Exoenzyme dar, die sezerniert werden. Sonstige Proteine mit Enzymcharakter, wie Proteinasen, Lipasen, Desoxyribonukleasen, Esterasen und Thiaminasen und auch Proteine mit toxischen Eigenschaften, wie Autolysin und Hämolysin, konnten nachgewiesen werden (Popoff und Bouvet, 2009).

Das binäre, als Porenbildner geltende (Böhnel und Gessler, 2005) **C2-Toxin** (Simpson, 1984) wirkt auf nicht-neuronale Zellen zytotoxisch und verursacht zwar keine Lähmungen aufgrund neuromuskulärer Blockade, kann jedoch für Mäuse, Enten und Gänse aufgrund einer fatalen Hypotonie mit verbundener Hypovolämie, beispielsweise durch Blutungen in der Lunge, tödlich sein (Simpson, 1982).

Weder der physiologische Grund der Toxinbildung noch die auslösenden Umweltsignale sind bisher, abgesehen von der Stoffwechselbeeinflussung durch Phagen, bekannt (Böhnel und Seifert, 1995).

BoNT

Basierend auf den serologischen Eigenschaften können die produzierten Neurotoxine durch Antikörper (monoklonale Antiseren, *Maus-Bioassay*, Standard-Referenzmethode für die Analyse von BoNT) neutralisiert werden (Smith und Sugiyama, 1988) und traditionell in **acht Typen (BoNT A – BoNT H)** unterschieden werden (Collins und East, 1998) [Tabelle 1.2]. Diese lassen sich wiederum aufgrund ihrer immunologischen Eigenschaften in verschiedene Subtypen unterteilen. In der Gruppe III können Mosaik-Toxin-Gene (*bont C-D*, *D-C*) vorkommen, die von den klassischen Toxintypen der C und D-Stämme unterschieden werden. Die **Toxin-Chimären** *bont C-D* bzw. *D-C* besitzen ein Toxin-Gen-Cluster, das eine Mischung eines typischen *bont C* und *bont D* Toxin-Gen-Clusters darstellt. Ein *bont C-D* Toxin-Gen besteht am 5'-Ende der AS-Sequenz aus einem Abschnitt eines *bont C* Toxin-Gens und am 3'-Ende aus einem *bont D* Toxin-Gen und umgekehrt für *bont D-C* Toxin-Gene (Woudstra *et al.*, 2012). C und D-Toxine sind oft bezüglich ihrer Antigene identisch, wodurch monoklonale Antikörper beide Toxine neutralisieren. C und D-Toxine scheinen ein Spektrum von Antigenen zu besitzen, dessen Extreme durch die serologisch unterschiedlichen Toxintypen repräsentiert werden.

Tabelle 1.2: Toxintypen und Quellen (Collins und East, 1998).

Toxintyp	Hauptsächlich pathogen für	Quelle und Vehikel
A	Mensch, Hühner	Konserven: Gemüse, Obst, Fleisch, Fisch
B	Mensch, Pferde, Rinder	verarbeitete Gerichte, besonders Schweinefleischprodukte
C	Wasservogel	verrottende Vegetation alkalischer Sümpfe, Wirbellose
D	Rinder	Aas, Gastrointestinaltrakt
E	Mensch, Fische, Wasservogel	Meeres- und andere Fischereiprodukte
F	Mensch	Fleischprodukte
G	n.b.	Boden
H	n.b.	n.b.

In der Regel bilden die einzelnen Serovare ihren jeweiligen spezifischen Neurotoxintyp, wobei auch Stämme gefunden wurden, die zwei verschiedene Toxine gleichzeitig produzieren [1.3] (Hatheway und McCroskey, 1987; Collins und East, 1998), sowie andere, die nur einen Toxintyp produzieren, jedoch ein „stilles“, nicht aktives Gen für ein anderes Toxin tragen (Kirma *et al.*, 2004). Die verschiedenen Botulinum-Neurotoxintypen werden als pharmakologisch ähnliche Giftstoffe definiert, die auf cholinerge Rezeptoren der Nervenenden wirken.

BoNT ist Teil eines Komplexes. Die Neurotoxin-Gene (*bont*) und die Gene, die für assoziierte nicht-toxische Proteine (*antp*) kodieren, sind in unmittelbarer Nachbarschaft in einem DNS-Segment gruppiert und bilden den sogenannten Botulinum-Neurotoxin-Lokus.

Ein Sequenzvergleich der Neurotoxin-Gene deutet darauf hin, dass sich die *bont*-Gene in verschiedenen genetischen Hintergründen getrennt voneinander entwickelt haben (Hill *et al.*, 2007). Die genetische Vielfalt der BoNT spiegelt auch eine unterschiedliche geographische Verbreitung der Stämme [1.4] wider.

Die verschiedenen BoNT gelten als die am stärksten toxischen aller bekannten biologischen Substanzen (Lamanna, 1959) mit einer intraperitonealen tödlichen Dosis von BoNT A mit 1ng/kg Körpergewicht für den Menschen, wobei nicht alle Tierarten in gleichem Maße auf die Wirkung eines spezifischen Toxins reagieren (van Ermengem, 1897). Die Toxizität wird generell entweder als LD50 (mittlere letale Dosis, die bei 50% der Versuchstiere zum Tod führt) oder als MLD (minimale letale Dosis, die für ein Versuchstier tödlich ist) angegeben. BoNT können durch Erhitzung auf 85°C für 5 min in ihrer Wirkung inhibiert werden (Arnon *et al.*, 2001), jedoch nicht nach oraler Aufnahme durch Verdauungsenzyme.

Die Neurotoxin-Synthese ist ein stark regulierter Prozess und die Expression von Botulinum-Neurotoxin-Lokus-Genen findet während des vegetativen Wachstums in der späten exponentiellen Phase bzw. während des Übergangs von der exponentiellen in die stationäre

Wachstumsphase (maximales Level) statt (Lövenklev *et al.*, 2004a; Lövenklev *et al.*, 2004b; Couesnon *et al.*, 2006). Die höchste Toxin-Konzentration wird nach 24 h (12 h nach der maximalen Genexpression) beobachtet und ist für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen konstant (Couesnon *et al.*, 2006).

Molekülstruktur der BoNT

Botulinum-Neurotoxine sind Zink-abhängige Metalloproteasen (Schiavo *et al.*, 1992), die zunächst als Vorläuferproteine synthetisiert werden (Krysinski und Sugiyama, 1981). Das Toxin erlangt seine charakteristische hohe Toxizität erst außerhalb des Bakteriums, nachdem es, je nach Enzymausstattung, entweder durch eigene Proteasen (proteolytische Stämme) (Hobbs, 1976; Dekleva und DasGupta, 1989) oder durch exogene Proteasen (Verdauungsenzyme nach oraler Aufnahme) (Ohishi und Sakaguchi, 1979) oder durch proteolytische Enzyme anderer Mikroorganismen (Sakaguchi und Tohyama, 1955; Sakaguchi und Sakaguchi, 1959) eine proteolytische Spaltung (*nicking*) durchlaufen hat (Ohishi und Sakaguchi, 1979; Lacy *et al.*, 1998). Sowohl die Molekülstruktur als auch die Kristallstruktur des Botulinum-Neurotoxins, sowie die endogenen Änderungen des Vorläufertoxins, werden schematisch u.a. von Lacy *et al.* (1998) dargestellt (Lacy *et al.*, 1998). Die Molekülstruktur aller BoNT-Typen ist untereinander vergleichbar, wobei sich das Molekulargewicht unterscheidet, jedoch generell mit 150 kDa (Binz *et al.*, 1990) angegeben wird. Isolierte Toxine sind jedoch mindestens doppelt so groß (300 kDa), da das Toxin-Molekül innerhalb eines hoch stabilen Vorläufer-Toxin-Komplexes sezerniert wird, der zusätzlich zum Neurotoxin, je nach Serotyp bzw. Subtyp, mehrere atoxische Neurotoxin-assoziierte Proteine (NAP) und assoziierte nicht-toxische Proteine (ANTP) von etwa der Größe des Toxins enthält (Collins und East, 1998).

Pharmakologie der BoNT

Die aufgenommenen oder direkt *in vivo* synthetisierten [1.6] Neurotoxine werden aus dem Darm über die Schleimhaut, ohne Veränderung der Epithelzellen, durch Transzytose resorbiert (Sakaguchi, 1982; Couesnon *et al.*, 2008) und via Körperflüssigkeiten (Blut und / oder Lymphe) (Rossetto *et al.*, 2001) zur Zielzelle transportiert. Die Wirkung der BoNT tritt hauptsächlich an peripheren, cholinergen, neuromuskulären, motorischen Nervenendungen auf (Gessler *et al.*, 2005), an denen die Membranfusionsprozesse gehemmt werden und daher die Exozytose des Neurotransmitters Acetylcholin zum Erliegen kommt bzw. die durch Nervenimpulse normalerweise freigegebene Menge von Acetylcholin progressiv abnimmt. Wird ein Schwellwert unterschritten, so wird bei Mensch und Tier die charakteristische schlaffe Lähmung der postsynaptischen Muskeln als klassisches Symptom von Botulismus [1.6] hervorgerufen.

Die **Wirkungsweise der BoNT** besteht aus einer Abfolge von vier Schritten: Bindung des Toxins (Ligand) an einen Rezeptor, Internalisierung, Translokation und intrazelluläre Aktivität (Simpson, 2004). BoNT **bindet** an spezifische Rezeptoren auf nicht-myelinisierten Bereichen der präsynaptischen Membran cholinergischer Nervenzellen. Anschließend findet eine **Internalisierung** des rezeptorgebundenen Toxins über rezeptorvermittelte Endozytose in die Nervenzelle statt (Rossetto *et al.*, 2001; Turton *et al.*, 2002). Das ins Zytosol **translozierte** Toxin (Hoch *et al.*, 1985) **spaltet** spezifisch innerhalb der neuromuskulären Synapse an spezifischen Bindungsstellen unterschiedliche Proteine des SNARE-Komplexes (VAMP, SNAP25 und Syntaxin) im nicht-assemblierten Zustand (Singh, 2000), der an Fusionsprozessen der Acetylcholinvesikel mit der präsynaptischen Membran beteiligt ist (Montecucco und Schiavo, 1994). Dadurch wird die freigesetzte Menge des Neurotransmitters Acetylcholin (Wonnacott *et al.*, 1978) reduziert bzw. die Freisetzung komplett unterbunden (Pellegrini *et al.*, 1995). Der molekulare Mechanismus der Toxinwirkung von BoNT wird u.a. von Simpson (2004) bzw. Brüggemann und Gottschalk (2009) dargestellt. BoNT werden hinsichtlich ihrer Substratspezifität als die höchst selektiven Proteasen betrachtet (Arndt *et al.*, 2006). Alle BoNT verursachen eine Blockade der erregenden Nervenreizweiterleitung, die jedoch in ihrer Intensität und Dauer je nach Neurotoxintyp variiert (Meunier *et al.*, 2002).

Genetische Lokalisierung der Neurotoxin-Gene

Der Botulinum-Neurotoxin-Lokus ist, abhängig vom jeweiligen Stamm, im Genom auf verschiedenen genetischen Elementen lokalisiert. Er kann chromosomal-, Plasmid- oder durch Bakteriophagen kodiert vorliegen. In der *C. botulinum*-Gruppe I und II sind die Toxin-Gene der Typen A, B, E und F im bakteriellen Chromosom lokalisiert (Binz *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1990; Sebahia *et al.*, 2007). Das *bont G*-Toxin-Gen von *C. argentinense* (Gruppe IV) liegt auf einem 76 MDa großen Plasmid lokalisiert (Eklund *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 1995). Die Toxin-Gene der Typ C und D-Stämme werden durch Bakteriophagen kodiert (Eklund und Poysky, 1974; Poulain *et al.*, 1996; Skarin *et al.*, 2011), wodurch das Toxinbildungsvermögen der Gruppe III von deren Anwesenheit abhängig ist. Zwischen diesen Phagen und *C. botulinum* besteht eine pseudolysogene Beziehung (instabile Lysogenie, Pseudolysogenie). Abhängig vom Stamm und den jeweiligen Wachstumsbedingungen wird ein Teil der Zellen lysiert und freigesetzte Bakteriophagen können wiederum andere Zellen infizieren. Solche Lysogenie- und Reinfektionszyklen treten in der Umwelt (Boden, Darmtrakt von Tieren) auf (Eklund und Poysky, 1974) und sind für die Isolierung von nicht-toxischen oder nur schwach-toxischen Phänotypen verantwortlich. Typ C bzw. D-Stämme der Gruppe III konnten durch gezielte Behandlung mittels Acridinorange oder UV-Licht von ihren Phagen befreit werden (*curing*) und die erhaltenen atoxischen Stämme konnten mit Phagen, die aus toxischen *C. botulinum* C oder D-Stämmen

isoliert worden waren, infiziert (Reinfektion) und in die jeweils andere Art umgewandelt werden (Inoue und Iida, 1971; Eklund und Poysky, 1972; Eklund und Poysky, 1974). Der Verlust der toxigenen Bakteriophagen verändert die biochemischen Eigenschaften der Stämme der Typen C und D nicht (Oguma *et al.*, 1986).

1.6 Botulismus

Botulismus ist eine weltweit, sowohl beim Menschen als auch bei vielen Säugetier- und Vogelarten, auftretende Erkrankung, die durch BoNT verursacht wird und generell tödlich verläuft, wenn sie nicht behandelt wird. BoNT blockieren die Transmitter-(Acetylcholin)-Ausschüttung in Motoneuronen und deren autonomen, cholinergen Synapsen [1.5], wodurch eine charakteristische, paralytische **Lähmung** der postsynaptischen Muskulatur hervorgerufen wird. Die Art *C. botulinum* wird in vier physiologische Gruppen (I-IV) unterteilt [1.3]. Organismen der Gruppen I und II verursachen Botulismus beim Menschen und Organismen der Gruppe III bei Tieren. Gruppe IV (Typ G) konnte nur in äußerst wenigen Fällen mit menschlichen Botulismus in Verbindung gebracht werden (Sonnabend *et al.*, 1981). *Clostridium botulinum* Typ C und D, sowie deren Mosaik-Varianten C-D und D-C werden in der Regel mit Vogel- und Säugetierbotulismus in Verbindung gebracht. *Clostridium botulinum* wird in klinischen Proben, kontaminierten Lebensmitteln und Kulturen im Labor durch den Nachweis des Neurotoxins unter Verwendung eines „Maus-Bioassays“ und / oder „in vitro-assays“ nachgewiesen.

1.6.1 Botulismus bei Tieren

Obwohl viele Tiere für die verschiedenen Botulinumtoxine anfällig sind, werden die meisten Fälle von Botulismus bei Säugetieren und Vögeln durch Organismen der Gruppe III verursacht. Für Geflügel wie Enten, Gänse und Hühner ist v.a. Typ C, für Tiere wie Pferde, Rinder, Schafe, Hunde, Rehe, Nerze u.v.m. ist besonders Typ D pathogen. Je nach aufgenommenen Toxinmenge ist die Inkubationszeit variabel. Botulismus bei Tieren kann als **Intoxikation**, **Infektion** und **Toxikoinfektion** (Swerczek, 1980a; 1980b) auftreten, wobei es Misch- und Übergangsformen gibt. Neben der typischen Intoxikation sind weitere Krankheitsbilder beschrieben, wie ein die Eingeweide betreffender Botulismus („viszeraler Botulismus“) beim Rind (Böhnel *et al.*, 2001; 2005; Krüger *et al.*, 2012). Botulismus tritt bei Pferden weltweit meist sporadisch auf (Galey, 2001). Typ C und D sind am häufigsten die Verursacher, obwohl Pferde auch sehr empfindlich auf Typ B-Toxin reagieren. Bei Fohlen ist eine Erkrankung namens *shaker foal syndrome* (Swerczek, 1980a; 1980b) bekannt, die als Toxikoinfektion eine weitere Form von Botulismus darstellt. Hunde scheinen besonders anfällig für Typ C-Toxin zu sein, da diese Art bei fast jedem Ausbruch zu finden ist (Richmond *et al.*, 1978). Da Aasfresser (Truthahngeier, Krähen, Kojoten und Bären) aufgrund ihrer Ernährungsweise dem Toxin oft ausgesetzt sind, werden in ihren Seren oft

hämagglutinierende Antikörper gegen *C. botulinum*-Toxine gefunden (Ohishi *et al.*, 1979). Ausbrüche von Botulismus bei Füchsen und Löwen (Greenwood, 1985) wurden beschrieben. Botulismus bei Fischen zieht ernsthafte wirtschaftliche Konsequenzen durch hohe Verluste für kommerzielle Betreiber von Regenbogenforellen nach sich (Eklund *et al.*, 1967; Huss und Eskildsen, 1974). Fische sind extrem anfällig für Typ E-Toxin. Vogelbotulismus, generell durch mit der Nahrung aufgenommenes Typ C-Toxin verursacht, tritt in fast jeder Vogelart in allen Teilen der Welt auf (Wobeser, 1997).

Ursachen der Krankheitsentstehung

Botulismus tritt weltweit oft als Folge einer sog. **Grünfüttervergiftung** durch den Verzehr von Futter wie Heu bzw. Silage auf (**klassische Verlaufsform**), das z.B. kontaminierten Hühnermist (Payne *et al.*, 2011) oder aufgrund der Verwesung von Tierkadavern Toxin enthält (Tokarnia *et al.*, 2002). Die Toxinquelle sind oft mit *C. botulinum* kontaminierte kleine Tiere wie Hasen, Vögel oder Katzen, die beispielsweise bei der Heuernte getötet und versehentlich in das Futtermittel eingebracht wurden (Galey, 2001), wodurch innerhalb ihres Kadavers *C. botulinum*-Sporen unter anaeroben Bedingungen (vgl. Silage) auskeimen, in das Gewebe eindringen und dort Toxin produzieren können. Das Toxin diffundiert in das umliegende Futtermittel, das dadurch für Monate toxisch sein kann. Darüber hinaus dient ein Kadaver auch als Quelle für Fliegenmaden, die selbst unempfindlich gegen die Wirkung von BoNT sind, jedoch durch den Fraß des Kadavers Toxin aufnehmen, sowie Träger von Zellen und Sporen von *C. botulinum* werden können, und daher eine Infektionsquelle beispielsweise für Vögel darstellen (Hubálek und Halouzka, 1991; Wobeser, 1997; Evelsizer *et al.*, 2010). Aufgrund der hohen Widerstandsfähigkeit von Katzen bezüglich des Typ C-Toxins, können diese beispielsweise durch ihren Kot Überträger sowohl für Sporen als auch für das Toxin selbst sein. Hühnermist, der Typ C oder D-Toxin enthält, hat sich als Ursache für Botulismus bei Rindern gezeigt (Kennedy und Ball, 2011). Die Ausscheidung von *C. botulinum* mit dem Kot infizierter Tiere dauert mehrere Wochen an und kontaminiert entweder direkt oder indirekt über die Verwendung von Gülle und Mist als biologischen Dünger in der Landwirtschaft beispielsweise die Weiden, von der sich die Tiere ernähren, bzw. das daraus produzierte Futter (Heu, Stroh, Silage). Weitere Infektionsquellen stellen Futtermittel, wie verdorbener und Toxin-haltiger Fisch oder Fleisch, sowie Aas, bzw. Wasser aus Teichen oder Brunnen, die den Kadaver eines infizierten Nagetieres enthalten und über Wochen lang toxisch sind, dar. In Regionen, in denen sich aufgrund langer Trockenheit bzw. geringer Niederschlagsmengen nur ein äußerst karger Bewuchs von Weideland zeigt und ein Phosphormangel in Böden vorherrscht (z.B. Südamerika, Afrika), wird das Auftreten von Botulismus bei Rindern und Schafen oft durch den Verzehr von Kadavern oder dem Kauen von Knochen (**Pica**) ausgelöst, die durch das Wachstum vom Typ D-Stämmen mit Toxin belastet sind (Critchley, 1991; Cameron, 2009).

1.6.1.1 Rinderbotulismus

Rinderbotulismus tritt meist in Folge einer Vergiftung durch BoNT C und D von Gruppe III-Stämmen mit hohen Letalitätsraten auf und zieht oft große Ausbrüche mit enormen wirtschaftlichen Verlusten nach sich. In den letzten 15 bis 20 Jahren wird in Deutschland ein Anstieg der klinischen Fälle von *C. botulinum* assoziierten Erkrankungen bei Rindern beobachtet, wobei der Grund für diese Entwicklung derzeit nicht bekannt ist. In Abbildung 1.1 werden die Symptome, wie die schlaffe Paralyse, Steifigkeit der Muskulatur und Koordinationsstörungen am Beispiel eines Rindes sichtbar.



Abbildung 1.1: Botulismus beim Rind.
(Böhnel *et al.*, 2001).
Die charakteristischen Lähmungserscheinungen schreiten, am Kopfbereich beginnend, kaudal fort. Im Falle einer generalisierten Lähmung tritt häufig der Tod durch Atemstillstand oder Dehydrierung ein.

Die Lähmungserscheinungen beginnen am Vorderende und schreiten in Richtung hinterem Ende des Tieres bis zu einer generalisierten Lähmung fort. Die Muskeln des Kopfes und Halses zeigen in der Regel vor denen der Gliedmaßen erste Schwächen. Es gibt aufgrund der Muskellähmung der Speiseröhre oft Schwierigkeiten beim Kauen und Schlucken, wodurch z.T. Wasser und Nahrung verweigert wird. Die Pupillen sind häufig geweitet und ein vermehrter Speichel- und Tränenfluss ist weit verbreitet (Böhnel und Seifert, 1995). Da die Muskeln des Bewegungsapparates sukzessive immer stärker betroffen werden, weist das Tier eine charakteristische allgemeine Körperschwäche auf und es kommt zu Schwierigkeiten beim Aufrichten. Eine schwere Lähmung der Halsmuskulatur führt oft dazu, dass der Kopf flach auf dem Boden liegt und es zu einem Festliegen des Tieres kommt. Manchmal tritt bereits vor Ausprägung dieser Erscheinungen plötzlich der Tod durch Atemstillstand oder Dehydrierung ein. Eine schlaffe Lähmung kann für vier bis sechs Wochen andauern.

Die **atypische Form von Botulismus** verläuft langsamer und mit weniger ausgeprägten Symptomen. Die Tiere liegen oft am Boden und zeigen ein erschwertes Aufrichten, nehmen jedoch über einen relativ langen Zeitverlauf der Erkrankung noch Futter und Wasser zu sich, bevor nach einiger Zeit vermehrt Lähmungserscheinungen auftreten. Im weiteren Verlauf kann es sowohl zu sporadischer Heilung als auch zu schleichender Abmagerung und Siechtum der infizierten Tiere kommen. Die Ursachen für diese Verlaufsform kann eine Aufnahme geringer Toxinmengen oder verschiedenartiger Toxintypen sein (Böhnel und Seifert, 1995).

Chronische Form von Botulismus bei Rindern

Obwohl Botulismus in der Regel eine akute und oft tödliche Krankheit darstellt, die durch die Aufnahme von BoNT verursacht wird, gibt es auch anerkannte Formen wie Säuglingsbotulismus, Wundbotulismus oder "Botulismus undefinierten Ursprungs", die dadurch gekennzeichnet sind, dass *C. botulinum* einen Wirt kolonisiert und das Toxin *in situ* produziert wird [1.6.2]. Es gibt Hinweise, dass sich innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte bei Rindern und Menschen, die in nahem Kontakt zu erkrankten Tieren standen, eine chronische, viszerale Form von Botulismus entwickelt hat (Rodloff und Krüger, 2012). In den letzten Jahren wurden in Deutschland immer mehr Fälle von „chronischem Botulismus“ durch Tierärzte diagnostiziert und auch in den Medien wurde bereits über diese Verlaufsform berichtet. Die **viszerale Verlaufsform von Botulismus** wurde erstmals 2001 in Deutschland beim Rind beschrieben und ist noch weitgehend unerforscht (Böhnel *et al.*, 2001; Krüger *et al.*, 2012). Die Pathogenese der Toxikoinfektion zeichnet sich dadurch aus, dass der Darmtrakt durch *C. botulinum* besiedelt wird und vom Erreger *in vivo* gebildetes Toxin direkt aus dem Darm über das Kreislaufsystem in den Organismus gelangt und die Symptome verursacht (Böhnel *et al.*, 2001). Wie beim Säuglingsbotulismus [1.6.2.2] stellt diese Form, die auch bei Hühnern und Pferden beschrieben wurde, statt einer Intoxikation eine Infektion dar. Aufgrund der *in vivo* Toxinproduktion konnte bei Ausbrüchen des viszeralen Botulismus keine äußere Quelle des Toxins nachgewiesen werden, obwohl die Symptome eindeutig auf Botulismus hindeuteten. Diese Form existiert insbesondere dort, wo große Gruppen von Tieren zusammen kommen (z.B. Futterplätze, Wasserlöcher, Stallungen, Massentierhaltung). Ab 2005 wurde häufig über chronische Verläufe von Botulismus bei Rindern („chronischer viszeraler Botulismus“) berichtet (Rodloff und Krüger, 2012; Krüger *et al.*, 2013). Weitere Krankheitsbezeichnungen sind Morbus Kerner, „*Hemorrhagic Bowel Syndrom*“ (HBS) und Clostridiose.

1.6.2 Humaner Botulismus

Clostridium botulinum-Stämme, die in Zusammenhang mit Botulismus beim Menschen stehen, produzieren Toxine der Typen A, B und / oder F (Gruppe I) bzw. Toxine der Typen B, E oder F (Gruppe II). Typisch für alle Formen von Botulismus beim Menschen ist eine aufgrund der Wirkung des Neurotoxins [1.5] fortschreitende, absteigende, **schlaffe Lähmung**, die in den dicht innervierten Bereichen des Kopfes beginnt und symmetrisch kaudal fortschreitet (Sobel, 2005). Sobald das Toxin die Weiterleitung von Reizen von den motorischen Nerven zu den Muskeln verhindert, treten erste Symptome wie Schwierigkeiten bei der Fokussierung, Gesichtslähmung sowie Konzentrationsschwierigkeiten als frühe Anzeichen für Botulismus auf. Im weiteren Verlauf kommen Symptome wie eine Beeinträchtigung beim Schlucken (Dysphagie), Sprechstörungen, eine Schwäche der Nackenmuskulatur und Mundtrockenheit sowie Lähmungen aller Muskeln des Körpers hinzu.

Sind Muskeln, die für die Atmung benötigt werden, das Diaphragma und die Muskeln des Intercostalraums oder die Herzmuskulatur betroffen, so tritt, wenn nicht medizinisch entgegengesteuert wird (z.B. künstliche Beatmung), schließlich der Tod ein (Sobel, 2005). Botulismus tritt beim Menschen in fünf verschiedenen Formen auf: Klassischer Botulismus als Lebensmittelvergiftung, Wundbotulismus, Säuglingsbotulismus („*Infant botulism*“ (Midura und Arnon, 1976; Pickett *et al.*, 1976) und eine ähnliche Form beim Erwachsenen, dem adult infektiösen Botulismus („*Hidden botulism*“ (Chia *et al.*, 1986), und iatrogener Botulismus.

1.6.2.1 Durch Lebensmittel übertragener Botulismus

Die bekannteste Form des humanen Botulismus ist die Lebensmittelvergiftung, die dem Verzehr verdorbenen Lebensmitteln folgt, in denen der Erreger das Neurotoxin gebildet hat. Da es sich bei dieser Form um eine **Intoxikation** und nicht um eine Infektion handelt, ist diese nicht ansteckend. Abhängig von der Menge an Toxin variiert die Inkubationszeit in der Regel von 12 h bis 72 h, kann sich aber auch auf mehreren Wochen erstrecken (Gao *et al.*, 1990). Bei durch Lebensmittel verursachtem Botulismus gehen dem Auftreten von Lähmungen oft zusätzliche Magen-Darm-Symptome wie Übelkeit und Erbrechen voraus, obwohl diese gastrointestinalen Störungen nicht vom Neurotoxin verursacht werden, sondern durch andere Substanzen die von *C. botulinum* während seines Wachstums in Lebensmitteln produziert werden. Das Auftreten und die Schwere des Krankheitsverlaufs sind in hohem Maße vom verursachenden *C. botulinum*-Stamm abhängig (Hatheway, 1995). Generell wird diese Form von Botulismus durch zu Hause zubereitete Lebensmittel wie Wurstwaren, Gemüsekonserven und fermentierte Fischprodukte als Folge einer unzureichenden Haltbarkeitsmachung durch Erhitzung verursacht [Tabelle 1.2]. Die Letalität des durch Lebensmittel übertragbaren Botulismus liegt in den entwickelten Ländern in der Regel bei weniger als 10% (Sobel *et al.*, 2004).

1.6.2.2 Säuglingsbotulismus

Infantiler Botulismus bzw. Säuglingsbotulismus resultiert als Folge aufgenommener Sporen neurotoxischer *C. botulinum*-Stämme und stellt eine **Infektion** bzw. **Toxikoinfektion** dar, die durch Toxin verursacht wird, das innerhalb des Körpers (*in vivo*) im infantilen Gastrointestinaltrakt aufgrund von Sporenkeimung und vegetativem Wachstum gebildet wird. *Clostridium botulinum* ist nur dann in der Lage, sich im Darmtrakt zu vermehren und sein Toxin in dieser Umgebung zu produzieren, wenn keine ausgeprägte bakterielle Population innerhalb der Darmflora vorhanden ist. Sobald ein Neugeborenes eine komplexe Darmflora erwirbt, zeigt sich, wie beim Erwachsenen, eine Immunität gegen eine Besiedlung. Die Krankheit befällt daher in der Regel Kleinkinder unter einem Jahr (Keet *et al.*, 2005), wobei die meisten Fälle bei Säuglingen unter sechs Monaten festgestellt wurden. Das Krankheitsbild variiert von subklinisch bis hin zum plötzlichen Kindstod (Arnon und Chin, 1979). Ein Lebensmittel, das häufig mit Säuglingsbotulismus assoziiert wird, ist Honig [1.4], der oft eine

hohe Zahl von *C. botulinum*-Sporen beinhaltet, die durch Bienen in der Natur aufgenommen wurden (Nevas *et al.*, 2005; 2006). Da Staub ein weiteres wichtiges Übertragungsvehikel darstellt (Nevas *et al.*, 2005), kann ein Säugling durch Ablecken von Oberflächen und in der Folge durch Verschlucken der Sporen Botulismus entwickeln.

1.6.2.3 Wundbotulismus

Einige *C. botulinum*-Stämme können im menschlichen Organismus, vor allem in kontaminierten Wunden, wachsen und *in vivo* Toxin erzeugen, wodurch sie Botulismus auslösen. Wundbotulismus wird zunehmend unter injizierenden Drogenabhängigen aufgrund der Verwendung von kontaminierten Nadeln oder unreinem Heroin diagnostiziert (Akbulut *et al.*, 2005; Aguirre-Balsalobre *et al.*, 2007). Nach einer Latenzzeit, die für die Schaffung geeigneter anaerober Bedingungen in tiefen Wunden oder Abszessen benötigt wird, findet ein Wachstum der Clostridien und eine *in vivo* Produktion des Toxins und dessen Verteilung im Körper statt. Die mittlere Inkubationszeit beträgt 7 Tage und die geschätzte Letalität liegt bei 15% (Hatheway, 1995). Die Form der Wunde entsteht oft durch eine gemischte Begleitinfektion und kann z.T. auf mehrere Toxin-produzierende Stämme zurückgeführt werden (Akbulut *et al.*, 2005).

1.6.2.4 Infektiöser Botulismus beim Erwachsenen

Aufgrund von beispielsweise Bauchchirurgie (Freedman *et al.*, 1986), längerer Behandlung mit Antibiotika oder gastrointestinalen Wunden und Abszessen (Chia *et al.*, 1986), können Erwachsene wegen der dadurch verursachten Abwesenheit einer protektiven, natürlichen Darmflora bzw. einer veränderten phylogenetischen bakteriellen Diversität im Darm, die normalerweise in Konkurrenz mit *C. botulinum* steht, anfällig für eine Infektion und Kolonisation des Darmtrakts mit Toxin-produzierenden Clostridien (Chia *et al.*, 1986; Fenicia *et al.*, 2007; Rodloff und Krüger, 2012), ähnlich wie Säuglinge [1.6.2.2], werden. Es gibt Beobachtungen, dass normalerweise sehr widerstandsfähige, erwachsene Mäuse durch *C. botulinum* besiedelt werden können, wenn sie zunächst mit Antibiotika (Kanamycin-Erythromycin oder Metronidazol) behandelt worden sind (Burr und Sugiyama, 1982).

1.6.2.5 Andere Formen von Botulismus

Botulismus durch Inhalation als Folge einer Dispersion des Neurotoxins ist sehr selten (Bossi *et al.*, 2004), wobei einige Fälle berichtet worden sind (Holzer, 1962). Iatrogener Botulismus mit lokaler oder generalisierter Schwäche entwickelt sich als Folge einer therapeutischen Injektion des Neurotoxins (Bakheit *et al.*, 1997). Bis heute tritt diese Form selten auf, aber die erhöhte therapeutische und kosmetische Verwendung von Botulinumtoxin (vgl. BotoxTM) kann weltweit zu einem Anstieg von Fällen führen. Abhängig von der Toxin-Dosis kann iatrogener Botulismus mit besonders schweren Lähmungen und langfristigen neuronalen Schäden assoziiert sein (Chertow *et al.*, 2006; Souayah *et al.*, 2006).

Gegen Botulismus ist **keine spezifische Therapie** bekannt. Die biochemische Denervierung ist irreversibel, somit ist eine Heilung von Botulismus unmöglich. Die Rückgewinnung der Funktionalität der neuromuskulären Reizweiterleitung nach Lähmung durch eine subletale BoNT-Intoxikation wird durch Auswachsen von neuen intramuskulären Axonen und motorischen Nerven erreicht. Die progressive Lähmung, die bei allen Formen von Botulismus auftritt, muss durch eine intensive, symptomatische Vorgehensweise mit besonderer Aufmerksamkeit der Aufrechterhaltung der Atemfunktion (vgl. künstliche Beatmung) (Bossi *et al.*, 2004) behandelt werden. Zunächst sollte noch nicht adsorbiertes Toxin möglichst rasch aus dem Gastrointestinaltrakt entfernt werden. Um das zirkulierende Neurotoxin effektiv zu neutralisieren, ist die Verabreichung eines Antitoxins (Kombination monoklonaler Antikörper) sofort nach der Aufnahme des Toxins nötig (Koenig *et al.*, 1964; Rogers *et al.*, 1964). Sobald das Toxin jedoch den Blutkreislauf verlassen hat und in den Nervenenden angelangt ist, wird eine Verabreichung irrelevant. Bei Formen von Botulismus, die durch eine *in situ* Toxinproduktion verursacht werden, kann die Verabreichung von einem Immunglobulin zu einer deutlich verkürzten Krankheitsdauer führen (Arnon *et al.*, 2006). Zu einer spezifischen Behandlung von Wundbotulismus gehört die gründliche, chirurgische Entfernung von infiziertem, geschädigtem oder abgestorbenem (nekrotischem) Gewebe, sowie die Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe. Eine Impfung mit einem pentavalenten BoNT-Toxoid-Impfstoff, um zirkulierende Antikörper zu bilden, welche die BoNT binden, neutralisieren und entfernen, bevor sie internalisiert werden können, ist die wirksamste Form des Schutzes gegen Botulismus. Auch zur Bekämpfung von Rinderbotulismus sind in Folge einer Impfung gebildete neutralisierende Antikörper der effektivste Weg für einen effizienten Schutz gegen BoNT (Gil *et al.*, 2013). Zwar werden Antitoxine und zuverlässige Impfstoffe für landwirtschaftliche Nutztiere wie Rinder vom Typ C und D hergestellt (Gil *et al.*, 2013; Webb und Smith, 2013), jedoch sind sie in Deutschland nicht zugelassen bzw. bedarf ihr Einsatz einer Sondergenehmigung. Sowohl in Südamerika und Südafrika als auch in Australien hat sich jedoch eine Immunisierung von Rindern in gefährdeten Gebieten mit Typ C und D-Toxoid als äußerst wirksam erwiesen (Jansen *et al.*, 1976).

1.7 Mikroben-Pflanzen-Interaktionen

Die Rhizosphäre der Pflanzen ist ein Lebensraum mit außerordentlicher Bedeutung für die Lebensgemeinschaften in Böden und die Ernährung und Gesundheit der Pflanzen. Wurzel-ausscheidungen (Exsudate) liefern große Mengen leicht abbaubarer, organischer Kohlenstoffquellen, die eine reiche und hochaktive Mikroflora der Rhizosphäre anziehen und unterstützen (Assmus *et al.*, 1995). Die Populationen der Rhizosphäre und ihre physiologischen Aktivitäten tragen daher wesentlich zur Primärproduktion in terrestrischen Ökosystemen bei.

1.7.1 Interaktionen von Symbionten und PGPR mit Pflanzen

Da das Pflanzenwachstum durch eine Reihe von Faktoren wie hormonales und ernährungsbedingtes Ungleichgewicht, Ionen-Toxizität, physiologische Störungen, Anfälligkeit für Krankheiten usw. bestimmt wird, stellen biotische als auch abiotische Stressfaktoren Einschränkungen für die landwirtschaftliche Produktion von Feldfrüchten dar. Unter diesen Bedingungen kann das Pflanzenwachstum durch die Anwendung einer mikrobiellen Inokulation mit **pflanzenwachstumsfördernden Rhizobakterien** und Mykorrhiza-Pilzen verbessert werden. Diese Mikroben können das Pflanzenwachstum durch die Regelung des Nahrungs- und Hormonhaushalts, der Herstellung von Pflanzenwachstumsregulatoren sowie der Verfügbarmachung von Nährstoffen und Induzierung von Resistenzen gegen Pflanzenpathogene fördern. Zusätzlich zu ihren Interaktionen mit Pflanzen können diese Mikroben auch synergistische sowie antagonistische Wechselwirkungen mit anderen Mikroben in der Bodenumgebung zeigen. Diese Wechselwirkungen können von entscheidender Bedeutung für eine nachhaltige Landwirtschaft sein, weil sie vor allem auf biologischen Prozessen statt auf Agrochemikalien basieren und das Pflanzenwachstum und die Entwicklung sowie die richtige Bodengesundheit unter Stressbedingungen aufrecht erhalten. Die Rolle der Rhizobakterien und Mykorrhiza allein und / oder in Kombination bei der Verbesserung des Pflanzenwachstums unter Stressbedingungen und die wichtigsten Mechanismen, die an der Pflanzenstresstoleranz und der Wirksamkeit der Inokulation mit Mikroorganismen beteiligt sind, zeigt eine Reihe von Forschungsartikeln (Franché *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2009; Nadeem *et al.*, 2013).

Die Rhizosphäre weist Symbiosen von Pflanzen und Mikroorganismen auf, wie z. B. die Wurzelknöllchen, die durch Rhizobien bei Leguminosen (Werner, 1992) induziert werden und die Mykorrhiza (Abbott und Gazey, 1994). Zusätzlich zu den symbiotischen Pflanzen-Mikroorganismen Systemen ist eine große Vielfalt von Pflanzen-assoziierten Bodenbakterien in der Lage, das Wachstum von einer breiten Palette von wirtschaftlich bedeutenden Pflanzen zu verbessern (Nadeem *et al.*, 2013). Diese taxonomisch diverse Gruppe von Bakterien wird als **plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)** bezeichnet. *Azospirillum* ist eine Gattung, der vielseitige, pflanzenwachstumsfördernde Rhizobakterien zugeordnet werden (Assmus *et al.*, 1995), welche die Rhizosphäre vor allem von Getreide in tropischen und subtropischen Regionen (Steenhoudt und Vanderleyden, 2000) besiedeln. Deren potenziell für die Pflanze vorteilhafte Eigenschaften beinhalten Fixierung von molekularem, atmosphärischem Stickstoff (Tarrand *et al.*, 1978), Nitratreduktion (Hartmann und Zimmer, 1994) und Phytohormon-Produktion (Hartmann *et al.*, 1983). Diese pflanzenwachstumsfördernde Fähigkeiten führen zu Wachstumsstimulation in Feldversuchen, wenn geeignete Inokulationstechniken angewendet wurden (Okon und Labandera-Gonzalez, 1994).

1.7.2 Interaktionen von pathogenen Mikroorganismen mit Pflanzen

Ein großer Bereich bei der Erforschung von durch Lebensmittel übertragbaren, humanpathogenen Krankheitserregern hat sich auf die Übertragung durch Lebensmittel tierischer Herkunft konzentriert. Lange Zeit wurden z.B. Infektionen mit Salmonellen mit dem Konsum tierischer Lebensmittel in Verbindung gebracht. Auch Infektionen mit Shiga-Toxin-produzierenden *Escherichia coli* O157 Stämmen wurden primär mit Rindfleisch assoziiert. Jüngste Untersuchungen haben jedoch frisches Obst und Gemüse, vor allem grünes Blattgemüse (insbesondere Salat), welches roh verzehrt wird, als Ursache für viele lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche identifiziert (Greene *et al.*, 2008). Daher wird heutzutage angenommen, dass diese pflanzlichen Lebensmittel einen viel größeren Beitrag als Vehikel für Krankheitserreger, wie *E. coli* O157:H7 und *S. enterica* Serovare, haben, als bisher geglaubt (Franz und van Bruggen, 2008). In den letzten Jahren wurde weltweit ein kontinuierlicher Anstieg von Erkrankungen beim Menschen festgestellt, die auf den Verzehr von mikrobiologisch belasteten Pflanzen (z.B. Gemüse) zurückgeführt werden konnten (Cooley *et al.*, 2003; Brandl, 2006; Berger *et al.*, 2010). Auch für Erkrankungen bei Nutz- und Wildtieren, wie Botulismus, ist ein deutlicher Anstieg in den letzten Jahren festzustellen (Payne *et al.*, 2011). Trotz der zunehmenden Bedeutung von Obst und Gemüse als Quelle von Krankheitserregern, gibt es derzeit nur ein begrenztes Wissen über die Zeitpunkte der Kontamination in der Produktionskette oder über den Mechanismus, durch den es menschlichen Krankheitserregern möglich ist, auf oder in Pflanzen zu persistieren (Berger *et al.*, 2010). Detailwissen über den Weg der Infektion und über kritische Pflanzen- und Mikroben-Faktoren, welche die Besiedlungseffizienz von Pflanzen durch humanpathogene Bakterien beeinflussen, ist für die Produktion sicherer Lebensmittel wichtig. Dies hat zur verstärkten Erforschung der Mechanismen geführt, durch die kontaminierende, magensaftresistente Krankheitserreger in der Lage sind, auf und in dieser Nicht-Wirts-Umgebung zu persistieren (Critzler und Doyle, 2010). Pflanzen, insbesondere deren Rhizosphären, bieten nicht nur Habitate für „harmlose“ Mikroorganismen wie Azospirillen [1.7.1], sondern auch für pflanzen- und sogar humanpathogene oder Toxin-produzierende Bakterien (Tauxe, 1997; Berg *et al.*, 2005; Mierau und Kleerebezem, 2005; Brandl, 2006; Kutter *et al.*, 2006). Mikroorganismen können Pflanzen sowohl auf diversen Oberflächen, aber auch endophytisch besiedeln. Viele pathogene Stämme sind phylogenetisch oft sehr nah mit Stämmen verwandt, die für Pflanzen zum Teil große Vorteile mit sich bringen [1.7.1], für die Gesundheit von Tier und Mensch jedoch völlig unbedenklich sind. Bei einer endophytischen Besiedlung der Wurzel besteht die Gefahr, dass die Pflanze auch im Spross systemisch von potentiellen Krankheitserregern kolonisiert werden kann. Diese Keime können nicht durch Abwaschen entfernt werden und somit im Folgenden über die Nahrungskette auf Tier und Mensch übertragen werden und sich negativ auf deren

Gesundheit auswirken. Interaktionen zwischen Krankheitserregern und Pflanzen sowie Interaktionen zwischen natürlich vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaften tragen zur epiphytischen und endophytischen Kolonisation bei, wobei die Wahrscheinlichkeit, dass ein Produkt kontaminiert wird, in einer Umgebung größer ist, in der das Erregerlevel hoch ist.

Die Internalisierung von *Salmonella enterica* Typhimurium über die Blätter wurde wissenschaftlich untersucht und es konnte gezeigt werden, dass *S. enterica* in Tomatenpflanzen und deren Früchte eindringen kann, die in natürlichem Boden gewachsen sind (Gu *et al.*, 2011). Es wurden auch verschiedene Interaktionen humanpathogener *S. enterica*-Stämme mit handelsüblichen Kopfsalatsorten beschrieben. Die Prävalenz und der Grad der endophytischen Kolonisierung von axenisch angebautem Salat durch *S. enterica* Serovare ergab eine signifikante Wechselwirkung zwischen Serovar und Sorte für den Grad der Besiedlung. *Salmonella enterica* kann Samen (Winthrop *et al.*, 2003), Keimlinge (O'Mahony *et al.*, 1990), Blätter (Horby *et al.*, 2003; Klerks *et al.*, 2007a) und Früchte (Guo *et al.*, 2002) einer Vielzahl von Pflanzenarten besiedeln. Mehrere Salmonellen-Serovare konnten ins Wurzelgewebe eindringen und sich im Spross verbreiten (Klerks *et al.*, 2007b), so dass eine systemische Ausbreitung nachgewiesen werden konnte (Kutter *et al.*, 2006). *Escherichia coli* O157 ist beispielsweise durch Mechanismen wie Typ III-Sekretionssysteme, Geißeln und Pili in der Lage, sich an Salatblätter anzuheften, und so konnten schwere Ausbrüche auf den Verzehr von kontaminierten Rettichsprossen und abgepacktem Spinat zurückverfolgt werden (Berger *et al.*, 2010). Eine Studie von Hassan *et al.* zeigte eine bakterielle Belastung von krankheitserregenden Darmbakterien auf rohem Gemüse von 3 bis 8 log(10) cfu/g für aerobe Bakterien und bis zu 1 bis 4 log(10) cfu/g für coliforme Keime sowie *Enterobacteriaceae* (Hassan *et al.*, 2011). Einer Studie zu Folge, kann der Verzehr von rohem Gemüse und frischem Obst, vor allem wenn diese verpackt vorliegen, ein Risikofaktor für die Infektion Campylobacteriose durch *Campylobacter* sein (Verhoeff-Bakkenes *et al.*, 2011).

In der Literatur werden neben den klassischen Lebensmittelkontaminanten wie Salmonellen, EHEC und *Campylobacter* (Verhoeff-Bakkenes *et al.*, 2011) auch opportunistische Krankheitserreger wie *Roseomonas* spp. und *Klebsiella* spp., aber auch Gram-positive Bakterien wie Stämme der Gattungen *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* oder *Clostridium* genannt (Hassan *et al.*, 2011). 2011 erlebte Deutschland einen lebensmittelbedingten Ausbruch eines Shiga-Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC O104:H4) Stammes, der zu 53 Todesfällen führte und mit dem Verzehr von Bockshornklee-Sprossen korrelierte (Muniesa *et al.*, 2012; Vonberg *et al.*, 2013). Insbesondere durch Salmonellen kontaminierte Tomaten haben zu mehreren internationalen Ausbrüchen mit jeweils Hunderten von Fällen geführt (Cummings *et al.*, 2001; Greene *et al.*, 2008) [1.7.2].

Aufgrund der potentiellen Bedrohung des durch Lebensmittel übertragbaren Botulismus, ist *C. botulinum* seit langen Jahren im Fokus der Lebensmittelindustrie und den Regulierungsbehörden. Eine Art des Erregers kontaminiert in der Regel eine bestimmte Art von Lebensmitteln [Tabelle 1.2]. Um die Sicherheit von Lebensmitteln, wie beispielsweise Konserven, zu gewährleisten, werden routinemäßig strenge Provokationstests der Verarbeitungsbedingungen und der Zusammensetzungen von Lebensmitteln durchgeführt (Bradshaw *et al.*, 2010). Das die Vergiftung verursachende Toxin ist in der Regel im Produkt selbst oder in einem Bestandteil dessen produziert worden. In Produkten, die nicht vollständig die ernährungsphysiologischen Bedürfnisse der Organismen [1.3] erfüllen, kann kein vegetatives Wachstum und somit auch keine Toxigenese stattfinden. Von größter Bedeutung sind allerdings die Sporen, da diese für lange Zeit inaktiv sein können und Behandlungen überstehen, die vegetative Zellen abtöten würden. Da *C. botulinum* eine obligat anaerobe Art darstellt, werden für das Wachstum reduzierende Bedingungen benötigt und eine Kontamination von Nahrungs- und Futtermitteln mit elektronegativen Redoxpotential erscheint wahrscheinlicher (Hauschild und Dodds, 1993). Humanpathogene Stämme wachsen in einem Temperaturbereich von 3°C bis 45°C, wobei sich die Wachstumstemperaturen der Stämme der Gruppen I und II unterscheiden [1.3]. Eine Kühlung des Produkts stellt daher kein ausreichendes Maß an Sicherheit dar, da die Toxigenese dadurch nicht verhindert werden kann (Lynt *et al.*, 1982; Simunovic *et al.*, 1985). Da Clostridien-Stämme, darunter *C. botulinum*, weitgehend in der Natur allgegenwärtig sind [1.4], können sie häufig in landwirtschaftlicher Umgebung sowie in Silage, Rinderkot oder Einstreu nachgewiesen werden (Hauschild und Dodds, 1993). In einer Untersuchung von Kompost konnten beispielsweise in mehr als 50% der untersuchten Proben toxische *C. botulinum*-Stämme nachgewiesen werden (Böhnel und Lube, 2000). Kompost, Mist und Gülle aus der Tierhaltung sowie fermentierte Vergärungsrückstände aus der Biogasproduktion finden als wirtschaftliche Alternative zu chemischen Düngemitteln z.B. im ökologischen Landbau immer mehr Verwendung. Solche Substrate können die Einbringung von Krankheitserregern, wie toxische *C. botulinum*-Stämme, in den Ackerboden fördern (Girardin *et al.*, 2005).

1.8 Klee (*Trifolium*) als Modellpflanze

Die Produktivität landwirtschaftlicher Systeme ist stark von Stickstoff abhängig. Ein Stickstoffeintrag in Böden kann durch die Anwendung von exogenem Stickstoffdünger erfolgen. Alternativ kann Stickstoff durch eine symbiotische Stickstofffixierung [1.7.1], die beispielsweise durch Knöllchenbakterien (Rhizobien) bei Hülsenfrüchten realisiert wird, gewonnen werden. Dies ist in natürlichen und landwirtschaftlichen Umgebungen ein wichtiger biologischer Prozess, der durch die Sonnenstrahlung und die Nutzung des atmosphärischen CO₂ angetrieben wird.

Klee umfasst sowohl einjährige Arten (*Trifolium subterraneum*) als auch ausdauernde Arten (z.B. *T. pratense*, *T. repens* und *T. polymorphum*), die von subtropischen bis hin zu gemäßigten Klimazonen angepasst sind und daher in Nord- und Südamerika, Europa, Afrika und Australien vorkommen. Weißklee (*T. repens*) (von Linné, 1753), auch Kriechklee genannt, gehört zur Familie der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae* oder *Leguminosae*). Hierbei wird er der Unterfamilie der Schmetterlingsblütler (*Faboideae*) zugeordnet. Weißklee stellt eine krautige, ausdauernde Pflanze dar, die in Europa weit verbreitet ist und in der Regel Wuchshöhen von 5 - 20 cm erreicht. In Deutschland gilt er als eine der am weitest verbreiteten Pflanzen überhaupt. Der Weißklee besiedelt zum größten Teil Wiesen und Weideland. Er bevorzugt nährstoffreiche, leicht kalkhaltige, lehmige und feuchte Böden. Klee wird vor allem wegen seines hohen Anteils an verdaulichem Eiweiß (Schmeil-Fitschen, 2002; Düll und Kutzelnigg, 2011) in der Landwirtschaft als Futtermittel kultiviert, da er sowohl als Grünfutter genutzt, als auch siliert oder zu Kleeheu getrocknet werden kann. Wie auch viele andere Leguminosen lebt Klee in einer mutualistischen Symbiose mit Knöllchenbakterien (*Rhizobiaceae*). Diese besitzen die Fähigkeit, Klee zu nodulieren, elementaren, molekularen Stickstoff aus der Luft zu assimilieren und in chemische Verbindungen zu überführen, die von Pflanzen genutzt werden können. Dies trägt zur Erhaltung der Bodenfruchtbarkeit bei. Es treten wirtsspezifische *Rhizobium*-Stämme auf, die sich auf bestimmte Kleearten spezialisiert haben und mit anderen Hülsenfrüchtlern keine erfolgreiche Symbiose etablieren können. So geht zum Beispiel der Wiesenklee (*T. pratense*) ausschließlich eine Symbiose mit *Rhizobium trifolii* ein. Im Gegensatz hierzu lebt Weißklee (*T. repens*) mit *R. leguminosarum* symbiotisch zusammen. *Rhizobium leguminosarum* gehört zu den weltweit in der Landwirtschaft am meisten genutzten Arten an Wurzelknöllchenbakterien.

1.9 Biogasproduktion

Im Zuge der zunehmenden Energiegewinnung aus erneuerbaren Ressourcen wie Wind, Wasser und Geothermie gewinnt auch die Energiegewinnung aus Biomasse über die Biogasproduktion aus erneuerbaren Rohstoffen heutzutage immer mehr Bedeutung (Kleerebezem und van Loosdrecht, 2007). Biogasproduktionsanlagen [Abbildung 1.2] können einen bedeutenden Beitrag zur nachhaltigen Energieversorgung, zum Klimaschutz und zur Verwertung biologischer Abfälle leisten (Oleskovicz-Popiel *et al.*, 2012).

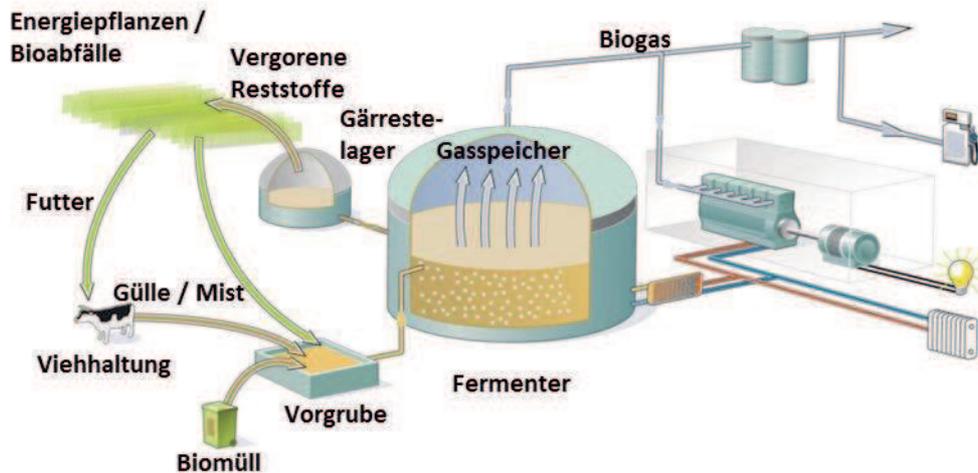


Abbildung 1.2: Biogasproduktion und Nutzung der Rückstände als Dünger in der Landwirtschaft (Agentur für Erneuerbare Energien e.V.).

Abbildung 1.2 zeigt schematisch die Biogasproduktion und Nutzung der Rückstände als Dünger in der Landwirtschaft. Energiepflanzen (z.B. Mais und Getreide) oder auch Abfallprodukte aus der Viehhaltung wie Gülle oder Mist, Kompost, Bioabfälle sowie Biomüll, die in einer Vorgrube gesammelt werden, dienen als Biomasse zur Gewinnung von Biogas. In einem Fermenter wird die Biomasse in einem Gärprozess von Mikroorganismen unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff abgebaut und Methan und Kohlendioxid, das Biogas, entsteht. Das entstandene Biogas wird in der Haube des Fermenters, direkt über der gärenden Biomasse, gespeichert und anschließend beispielsweise zur Energieerzeugung in nachgeschalteten Prozessen genutzt. Ist die Biomasse im Fermenter vergoren, kommen die Reststoffe zunächst in ein Gärrestelager, um dann als hochwertiger Dünger verwendet zu werden. Dadurch reduziert sich der Mineraldüngereinsatz in der Landwirtschaft erheblich. Wie sich in einer Umfrage der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) zeigte, waren Ende 2006 alleine in Bayern 1.348 Biogasanlagen mit einer durchschnittlichen Leistung von 190 kW_{el} in Betrieb (Neser, 2007). In der überwiegenden Anzahl der Anlagen (>90%) wurden ausschließlich Wirtschaftsdünger und/oder nachwachsende Rohstoffe eingesetzt. In ca. 9% der Anlagen wurden auch organische Abfälle vergoren (Neser, 2007). Diese organischen Abfälle (Lebensmittelindustrie, Schlachtabfälle, Gastronomie, Biotonne etc.) können aufgrund ihrer hohen Energiewerte gut zur Gewinnung von Biogas verwendet werden. Bei ca. 75% aller Fermenter, die in Bayern betrieben werden, läuft die Fermentation bei einer Temperatur von 35°C bis 44°C ab [Abbildung 1.3].

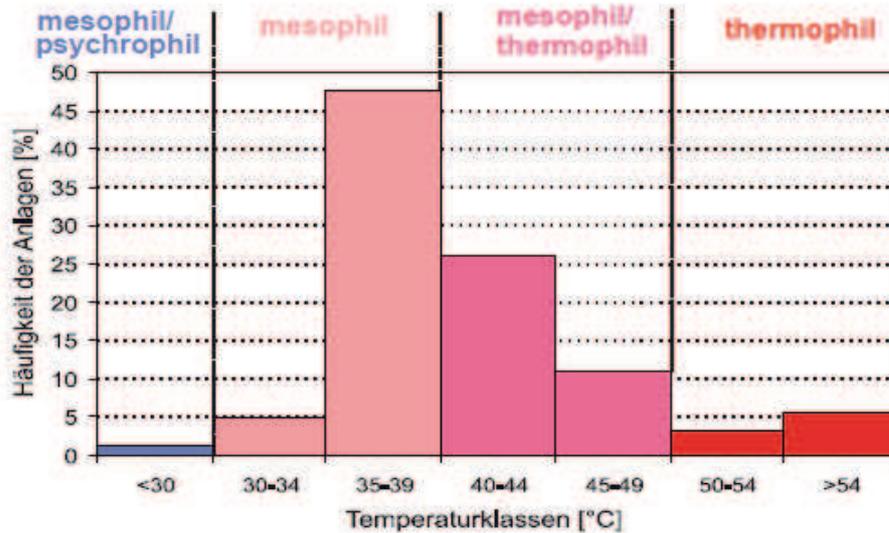


Abbildung 1.3: Temperaturführung der Fermenter zur Biogasproduktion (Neser, 2007). 85% aller Biogasanlagen in Bayern werden bei Temperaturen zwischen 30°C und 49°C betrieben.

Sind die Mikroben in der Lage den Sterilisationsprozess zu überleben (Sporenbildner, thermophile Bakterien), so kann eine rasche Proliferation der Kontaminanten im Fermenter nicht ausgeschlossen werden, da die Bedingungen zur Fermentation (Anaerobiose, Wärme [Abbildung 1.3], Nährstoffangebot) für ein Wachstum von z.B. Clostridien bestens geeignet sind. Werden die Gärrückstände anschließend in der Landwirtschaft verwendet und als Dünger auf Felder ausgebracht, so besteht potentiell die Gefahr, dass pathogene, Toxinproduzierende Bakterien, wie beispielsweise enthaltene *C. botulinum*-Stämme, in den Boden eingebracht werden und in der Folge die Rhizosphäre von Kulturpflanzen und Feldfrüchten jeglicher Art kontaminieren können (Böhnel und Lube, 2000). Werden anschließend die geernteten Feldfrüchte an Tiere verfüttert (Mais, Gerste, Hafer, Klee), oder vom Menschen konsumiert (Salat, Tomaten, etc.), so könnten diese Bakterien über die Nahrungskette übertragen werden.

1.10 Ausgangslage für die vorliegende Arbeit

In den letzten Jahren wurde weltweit ein kontinuierlicher Anstieg von Erkrankungen durch Botulismus [Abbildung 1.4] bei Rindern festgestellt (Böhnel und Gessler, 2013; Krüger *et al.*, 2013). Als mögliche Ursache wird die Fütterung mit mikrobiologisch belasteten Futtermitteln genannt. In diesem Zusammenhang wird die Zunahme von Biogasproduktionsanlagen [1.9] kontrovers diskutiert, da die Rückstände dieser Anlagen oft als natürlicher Dünger auf die Felder ausgebracht werden. Allerdings spielt auch die Verbesserung innerhalb der Diagnostik eine gewisse Rolle.

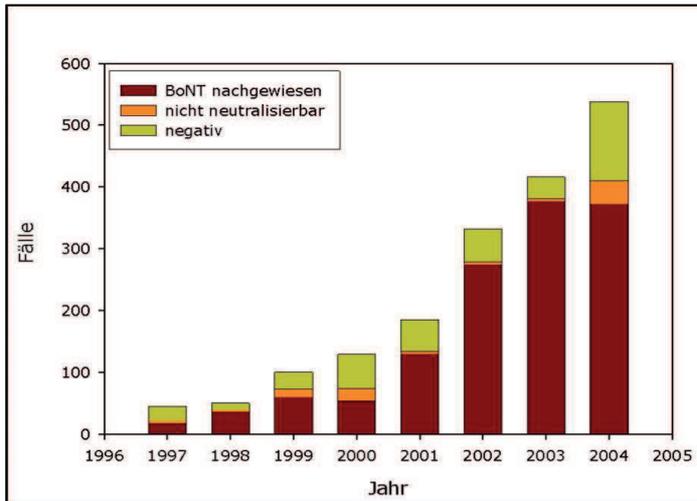


Abbildung 1.4: Auftreten toxikologischer Clostridien-Infektionen bei Rindern (1997-2004). Seit 1997 ist in Deutschland ein kontinuierlicher Anstieg von Erkrankungen durch Botulismus bei Rindern festgestellt worden.

Vorversuche der Gruppe des Kooperationspartners Dr. Frank Gessler vom Institut für angewandte Biotechnologie in den Tropen der Universität Göttingen und der Firma miprolab zeigten, in wie weit *C. botulinum*-Sporen im Boden überleben können (Gessler und Böhnel, 2006). In einem Freilandversuch wurden Parzellen (2 x 5 m) eines Forschungsfeldes nahe Göttingen mit Kompost, der mit 10^3 oder 10^5 Sporen eines *C. botulinum* Typ D-Stammes (IBT 2301) angereichert worden war, in vier Replikaten gedüngt. Die Kontrollparzellen wurden mit demselben Kompost, allerdings ohne Sporen, gedüngt. Die Negativkontrollen stellten Parzellen ohne Kompostdüngung dar. Am Tag 138 wurde eine Klee-/ Grassamen Mischung auf den Parzellen ausgesät. Nach Abschluss des Freilandversuches zeigte sich auf den Parzellen, die mit Clostridien-Sporen-haltigem Kompost gedüngt worden waren, ein deutlicher Wachstumsunterschied hinsichtlich der Größe und der Biomasse der dort gewachsenen Kleepflanzen verglichen mit den Kontrollen [Abbildung 1.5].



Abbildung 1.5: Parzellen eines Forschungsfeldes, die mit einer Klee / Gras-Mischung bepflanzt und mit Kompost gedüngt wurden, der z.T. *C. botulinum* 2301 Sporen enthielt. In Parzellen, in denen der Boden mit Sporen vorbehandelt wurde (rote Pfeile), konnte ein Unterschied im Wachstum von Klee beobachtet werden (Aufnahme von F. Gessler, Göttingen). (Zeiller *et al.*, 2015).

Ziel dieser Risikobewertungsstudie war es, das Fortbestehen toxischer *C. botulinum* Typ D-Sporen zu überwachen, die im Boden nach Ausbringung von angereichertem Kompost in landwirtschaftlichem Boden existierten. Als Ergebnis wurde festgehalten, dass in den Parzellen, die mit Kompost (10^5 Sporen g^{-1}) versetzt worden waren, über den gesamten Untersuchungszeitraum von 939 Tagen *C. botulinum*-Sporen nachgewiesen werden konnten. Zudem wurde auf den Parzellen, die mit *C. botulinum*-Sporen angereichert wurden, im zweiten Jahr des Feldversuchs eine auffallende pflanzenwachstumsfördernde Wirkung auf Klee [Abbildung 1.5] festgestellt. Eine Erhöhung der Biomasse um das 2,6-fache im Vergleich zu den Kontrollen wurde gemessen und mindestens im Folgejahr aufrechterhalten. Bodenproben der Rhizosphäre der Pflanzen wurden gesammelt. Im Boden wurden 20 *C. botulinum*-Sporen pro Gramm Boden nachgewiesen, während 5×10^4 Sporen pro Gramm Rhizosphärenboden und 2×10^2 pro Gramm Frischgewicht von Kleewurzeln gezählt wurden. Diese Daten zeigen einen Anstieg der Anzahl von Sporen in Richtung der Kleewurzeln (F. Gessler, mündliche Mitteilung).

1.11 Aufgabenstellung

Der Effekt der Erhöhung der Biomasse [1.10] sollte in Experimenten unter kontrollierten Laborbedingungen innerhalb einer Klimakammer reproduziert und im Detail analysiert werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit derselbe *C. botulinum*-Stamm (Typ D, IBT 2301), welcher durch zur Düngung ausgebrachter Fermentationsrückstände in den Boden eingebracht werden könnte, hinsichtlich seines Besiedlungsverhaltens und seiner Interaktion mit Weißklee (*T. repens*) und „Deutschem Weidelgras“ (*Lolium perenne*), die beide häufig als Futterpflanzen dienen, genauer untersucht. Da *C. botulinum* schwer zu kultivieren ist, sollten zu Beginn dieser Arbeit Optimierungen zur Kultivierung und zur Inokulation von Weißklee angestellt werden. Die Effizienz und die Ausprägung der möglichen Wurzelbesiedlung sollten mittels *in situ*-Lokalisierungsexperimenten (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung [FISH], Reportermarkierung) in Kombination mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) analysiert werden. Zudem sollten spezifische, PCR-gestützte Verfahren zum Nachweis von Botulinum-Neurotoxin (*bont*) kodierenden Genen angewendet werden.

2. Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen wurden mit entsalztem und filtriertem Wasser (H_2O_{reinst}) aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q PLUS, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) hergestellt. Für Medien wurde einfach entionisiertes Wasser ($H_2O_{\text{dem.}}$) verwendet, bei dem es sich um vollentsalztes Leitungswasser handelte. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle hitzestabilen Lösungen und Materialien bei 121°C für 20 min und 1 atm in einem Wasserdampf Hochdruckautoklaven mit Abluftfiltration (Systec D65, Systec V65 und Systec V150, Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg, Deutschland) autoklaviert.

Hitzelabile Lösungen wurden steril filtriert (Sterilfilter Porengröße 0,22 μm , Millipore GmbH).

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a. Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und VWR (Ismaning, Deutschland) bezogen.

Der pH-Wert wurde mit NaOH- oder HCl-Lösungen entsprechender Normalitäten eingestellt (pH-Meter, pH 523, WTW, Weilheim, Deutschland).

2.1 Verwendete Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften	Kultivierungsbedingungen
<i>Rhizobium leguminosarum</i> (DSM 6039)	Symbiontisches α -Proteobakterium, Knöllchenbildner bei Leguminosen	30°C, aerob
<i>Clostridium sporogenes</i> 1739	apathogener Typ D-Stamm	37°C, anaerob
<i>Clostridium botulinum</i> IBT 2301	Toxin-produzierender (BoNT D) Typ D-Stamm	37°C, anaerob

Clostridium botulinum* und *Clostridium sporogenes

In dieser Arbeit wurde das *Clostridium botulinum*-Toxovar D IBT 2301 sowie *Clostridium sporogenes* 1739 verwendet. *Clostridium botulinum* 2301 ist ein pathogener, Botulinum-Neurotoxin D (BoNT D) produzierender, *C. sporogenes* 1739 ist ein apathogener, Neurotoxin negativer Stamm, der nicht in der Lage ist, ein Botulinumtoxin zu produzieren. Der Stamm *C. sporogenes* 1739 ist mit *C. botulinum* 2301 nahe verwandt und zeigt eine hohe Ähnlichkeit bezüglich der 16S-rDNS (bis auf 3 Basen identische 16S-rDNS; unveröffentlichte Daten) [1.2]. *Clostridium sporogenes* 1739 zeigt physiologische Eigenschaften, die vergleichbar mit denen des Toxin-produzierenden Stammes sind. Daher bietet sich

C. sporogenes 1739 als atoxischer Kontrollstamm an. Sowohl der *C. botulinum* Typ D-Stamm als auch der *C. sporogenes*-Stamm wurde vom Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen des Clostridien Centers der Georg-August-Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Rekonstitution der lyophilisierten Stämme erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben.

Rhizobium leguminosarum

Das ubiquitär vorkommende Bodenbakterium *R. leguminosarum* stellt ein symbiontisches α -Proteobakterium dar und bildet unter natürlichen Bedingungen mit Weißklee (*T. repens*) eine N_2 -fixierende Symbiose in Wurzelknöllchen [1.8]. Daher wurde dieser Bakterienstamm in den Wachstumsversuchen verwendet. Der Stamm wurde von der DSMZ bezogen und, wie unter 2.3.2 beschrieben, kultiviert.

Escherichia coli

Escherichia coli wurde nach Herstellerangaben primär zur Klonierung von Genfragmenten [2.5.7] in den jeweiligen molekularbiologischen Verfahren verwendet.

2.2 Herstellung von Lösungen, Puffer und Reagenzien

Folgende Lösungen, Puffer und Reagenzien wurden in dieser Arbeit hergestellt und verwendet.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Zur Herstellung von 10 x PBS wurden 95,5 g kommerzielles 10 x PBS Pulver in 1 l $H_2O_{dem.}$ unter Rühren gelöst und anschließend der pH-Wert vor dem Autoklavieren auf $7,2 \pm 0,2$ eingestellt. Wurde 1 x PBS (im Folgenden PBS) benötigt, so wurde 10 x PBS 1:10 mit $H_2O_{dem.}$ verdünnt. Der pH-Wert wurde wiederum auf $7,2 \pm 0,2$ eingestellt und anschließend autoklaviert.

Glycerin / PBS 1:4 (v/v)

Um Glycerin / PBS 1:4 (v/v) herzustellen, wurde Glycerin im Verhältnis 1:4 (v/v) in PBS gelöst und anschließend autoklaviert.

50-fach konzentrierter Tris-Acetat-EDTA Puffer (50 x TAE)

Trizma® Base	242 g
$Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$	18,61 g
Eisessig	ca. 60 ml
Ad 1000 ml $H_2O_{dem.}$	
pH $8,0 \pm 0,2$	

1 x TAE wurde aus 50 x TAE durch eine 1:50 (v/v) Verdünnung mit $H_2O_{dem.}$ hergestellt und diente als Laufpuffer für die horizontale Gelelektrophorese [2.5.4].

1%iges Tween 80

Hierfür wurde Tween 80 im Verhältnis 1:100 (v/v) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ gemischt und anschließend autoklaviert.

EtOH

Soweit nichts anderes angegeben ist, handelt es sich hierbei um 99%iges, vergälltes Ethanol.

Verwendete Antibiotika

Um Pflanzensamen zu sterilisieren [2.4.1] und von evtl. anhaftenden Bakterien zu befreien, und um selektive Wachstumsbedingungen in Kulturmedien für eine Selektion von Transformanten nach der Transformation des *evoglow*-Plasmids [3.8.1] zur Verfügung zu haben, wurden diverse Antibiotika verwendet. Die Sensitivität bzw. Resistenz der Stämme bezüglich dieser Antibiotika wurde in Experimenten getestet. Um eine Vorratslösung (i.d.R. 100 bis 1000-fach) gewisser Konzentration (mg/ml) [Tabelle 2.2] zu erhalten, wurden die Antibiotika in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ bzw. MeOH gelöst, steril filtriert (0,22 μm) und nach einer Aliquotierung dunkel bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.2: Antibiotika (Konzentration der Arbeitslösung bzw. eingesetzte Endkonzentration).

Arbeitslösung	Verwendung [Endkonzentration]
Penicillin [60 mg/ml]	Samensterilisation [0,6 mg/ml]
Streptomycin [250 mg/ml]	Samensterilisation [0,25 mg/ml]
Ampicillin [100 mg/ml]	Selektion von Transformanten [0,1 mg/ml]
Kanamycin [50 mg/ml]	Selektion von Klonen [0,05 mg/ml]
Gentamycin [20 mg/ml]	Resistenz-Überprüfung [0,02 mg/ml]
Tetracyclin [20 mg/ml]	Resistenz-Überprüfung [0,02 mg/ml]

2.3 Kulturführung und Medien

Zur Kultivierung der Bakterien auf festem Medium (Agarplatten) wurde das jeweilige Flüssigmedium mit Agar verfestigt. Hierzu wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zugegeben. Nach erfolgter Sterilisation wurde dieses in einer Sterilwerkbank (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland) in Petrischalen (mit „Nocken“: anaerobe Kulturführung; ohne „Nocken“: aerobe Kulturführung) gegossen. Sollten Selektivmedien mit hitzelabilen Substanzen (z.B. Antibiotika) hergestellt werden, so wurde vor der Zugabe darauf geachtet, dass das Medium eine Temperatur von ca. 50°C bis 60°C nicht überschritt.

2.3.1 Clostridien-Stämme

Die beiden Clostridien-Stämme, *C. botulinum* 2301 bzw. *C. sporogenes* 1739, wurden unter anaeroben Bedingungen bei 37°C angezogen. Der Einsatz von **Reinforced Clostridial Medium** (RCM) zeigte sich zur Anzucht der Clostridien als optimal geeignet. Neben kommerziellem RCM, das nach Herstellerangaben verwendet wurde, wurde RCM auch selbst hergestellt.

Zusammensetzung RCM

Pepton aus Casein	10 g
Fleischextrakt	10 g
NaCl	5 g
D-Glukose	5 g
Hefeextrakt	3 g
Na-Acetat	3 g
L-Cystein-Hydrochlorid	0,5 g
Stärke (löslich)	1 g
Agar	0,5 g
Ad 1000 ml H ₂ O _{dem.}	
pH 6,8±0,2	

Als Kulturgefäße wurden gasundurchlässige Serumflaschen oder Hungate-Röhrchen verwendet, die mit jeweils 100 ml bzw. 10 ml des Mediums befüllt wurden und mit gasundurchlässigen Septen aus Butylkautschuk verschlossen wurden, da nur diese die Kulturen vor Sauerstoffeinströmung schützten. Die Septen wurden mit Aluminiumkappen auf den Serumflaschen mit einer Bördelzange fixiert. Anschließend wurden diese unter anaeroben Bedingungen in einer Stickstoffatmosphäre bei 121°C für 20 min mit jeweils einer durch die Septen gestochenen Kanüle autoklaviert, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Um das Einströmen von Sauerstoff zu verhindern, wurden die Medien zum Druckausgleich auf RT abgekühlt, bevor sie aus dem Autoklaven entnommen wurden. Einmal geöffnete Kulturgefäße wurden, um anaerobe Verhältnisse zu garantieren, nicht wieder verschlossen und erneut verwendet.

Alternativ zum Autoklavieren unter Stickstoffatmosphäre konnten die Medien, um gelöstes O₂ auszutreiben, auch für ca. 20 min mit N₂ gespült werden und erst im Anschluss verschlossen und ohne Stickstoffbegasung autoklaviert werden.

Medienzubereitung nach Widdel

Die Zubereitung von Medien zur anaeroben Kulturführung erfolgte auch wie 1980 von Widdel beschrieben wurde (Widdel, 1980). RCM wurde hierbei in einem Widdelkolben (3 l) für 20 min bei 121°C sterilisiert. Die Gasphase wurde durch Spülen mit N₂ ausgetauscht. Nachdem das Medium auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde der pH-Wert ermittelt und gegebenenfalls mit sterilem HCL (2 M) oder NaOH (1 M) auf pH 6,8±0,2 eingestellt. Anschließend wurde das Medium in sterile Serumflaschen abgefüllt, diese mit einem Septum aus Butylkautschuk verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert. Bevor das Medium für die Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzt wurde, sollte es mindestens 24 h equilibrieren.

Resazurin

Resazurin wurde als Redoxindikator eingesetzt und diente der Kontrolle der anaeroben Verhältnisse. Dazu wurden 2,5 mg Resazurin in 1 l Medium gelöst. Das Resazurin enthaltende Medium zeigte durch einen Farbumschlag von farblos zu rot ein positives Redoxpotential an, was auf Sauerstoff im Medium hinwies. Erfolgte kein Farbumschlag von farblos (anaerob) zu rot (aerob), so konnten die Medien verwendet werden. Sollten Kulturen photometrisch bestimmt werden, so wurde auf die Zugabe verzichtet, da ansonsten eine Bestimmung der OD nicht möglich war.

Die **Lyophilisate** der Clostridien-Stämme wurden in je 10 ml RCM für 3 d innerhalb eines Anaerobentopfes (Oxoid Limited, Cambridge, Großbritannien) bei 37°C reaktiviert. Das anaerobe Milieu wurde mittels Anaerogen® (Oxoid Limited, Cambridge, Großbritannien) geschaffen. Das Wachstum wurde anhand der Trübung des Mediums photospektrometrisch verfolgt. Um mit Einzelkolonien arbeiten zu können, wurden die bewachsenen Flüssigkulturen auf RCM-Platten ausgestrichen und wiederum anaerob bei 37°C für 3 d inkubiert. Aus den Einzelkolonien wurden Vorkulturen (10 ml RCM) unter anaeroben Kulturbedingungen angezogen. Die Röhrchen wurden mit nicht fest verschlossenem Deckel bei 37°C in einem Anaerobentopf für 24 h inkubiert. Nach Öffnen des Anaerobentopfes wurden die Röhrchen zügig verschlossen. Zum Animpfen der Hauptkulturen in Serumflaschen wurde das Septum mit einer Kanüle durchstoßen. Probennahmen erfolgten analog mittels einer Spritze.

Sporulation

Da die Pflanzsysteme [2.4] sowohl mit vegetativen Zellen als auch mit Sporen der beiden Clostridien-Stämme inokuliert werden sollten, wurden neben Wachstumsmedien auch Sporulationsmedien zur Generierung von Endosporen verwendet.

Generierung von Sporen

Da die Sporulationsrate stark vom verwendeten Medium abhängt und sich die Sporulationsraten bezüglich der beiden Stämme in den unterschiedlichen Medien unterschieden, wurden zunächst verschiedene, zur Erzeugung von Sporen geeignete Medien wie RCM, *Trypticase*, *Trypticase-Peptide-Glucose-Yeast* (TPGY) und *Cooked Meat Medium* (CMM) auf deren Effizienz zur Sporengewinnung getestet.

Zusammensetzung *Trypticase Medium*

Pepton aus Casein	50 g
Fleischextrakt	5 g
Ad 1000 ml H ₂ O _{dem.}	
pH 6,8±0,2	

Zusammensetzung *Cooked Meat Medium* (CMM)

Dieses Medium wurde kommerziell erworben und setzte sich laut Herstellerangaben folgendermaßen zusammen:

Herzmuskel	454 g
Pepton	10 g
Lab-Lemco Pulver	10 g
NaCl	5 g
Glukose	2 g
Ad 1000 ml H ₂ O _{dem.}	
pH 6,8±0,2	

Zusammensetzung Sporulationsmedium: CMM Mod. bzw. CMM Var.

CMM wurde auch in abgewandelter Form eingesetzt. Hierzu wurde statt 1 l H₂O_{dem.} entweder nur 500 ml H₂O_{dem.} (CMM Var.) oder anstelle von H₂O_{dem.} folgendes Medium zu den festen *pellets* des CMM gegeben (CMM Mod.):

Hefeextrakt	10 g
Ammoniumsulfat	10 g
Glucose	10 g
L-Cystein	0,5 g
Ad 1000 ml H ₂ O _{dem.}	
pH 6,8±0,2	

Zusammensetzung Trypticase-Peptone-Glucose-Yeast Medium (TPGY)

Trypticase	50 g
Pepton aus Casein	5 g
Hefeextrakt	20 g
Dextrose	4 g
Natriumthioglykolat	1 g
Ad 1000 ml H ₂ O _{dem.}	
pH 6,8±0,2	

Von diesen Medien wurden je 90 ml in Serumflaschen gefüllt, mit Butylkautschukseptum und Aluminiumkappe verschlossen, analog zu RCM autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Zur Erzeugung von Sporen wurden Kulturen unter anaeroben Bedingungen in RCM bei 37°C angezogen und anschließend 10% der Kultur (v/v) in die anaeroben Sporulationsmedien überführt. Um die Sporulationsrate der gewachsenen Clostridien zu ermitteln, wurden über 5 bis 7 Tage täglich Aliquote aus den wachsenden Sporulationskulturen entnommen und an einem Mikroskop [2.9.1] mittels eines Zähllokulars auf das Verhältnis vegetative Zellen/Sporen untersucht. Lag das Verhältnis von Sporen gegenüber vegetativen Zellen bei mehr als 90%, so wurden die Sporen durch Zentrifugation geerntet.

Gewinnung von Clostridien-Sporen

Um Medienrückstände zu entfernen, wurden die bewachsenen Sporulationsmedien durch eine sterile Gaze (37 µm Maschenweite, Bückmann, Mönchengladbach, Deutschland) filtriert und anschließend auf Zentrifugenbecher (250 ml) aufgeteilt, die für 10 min bei 7000 rpm (Sorvall Evolution RC, Rotor SLA-1500, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen. Das resultierende Zellmaterial wurde zweimal in je 30 ml PBS resuspendiert und wiederum für je 10 min bei 7000 rpm zentrifugiert, bevor es in 7 ml PBS resuspendiert und zusammengeführt wurde. Anschließend wurden die geernteten Sporen, um eine Ausprägung der Sporenhülle und Reifung der Sporen zu gewährleisten, in einer *Sporulation-Salt-Solution* (SSS) für eine Woche bei 4°C inkubiert.

Zusammensetzung *Sporulation-Salt-Solution* (SSS)

CaCl ₂ · 2 H ₂ O	2,65 mg
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	8,2 mg
MnSO ₄ · H ₂ O	8,8 mg
Ad 1000 ml H ₂ O _{dem.}	

Nach mikroskopischer Überprüfung der Reifung wurden die Sporen in PBS überführt und bis zur Verwendung in den entsprechenden Versuchen bei 4°C gelagert.

2.3.2 *Rhizobium leguminosarum*

Für die Anzucht von *R. leguminosarum* wurde ein Medium verwendet, dem ergänzend ein Bodenextrakt zugesetzt wurde (DSMZ Medium #98).

Zusammensetzung Bodenextrakt

Boden (Freiland)	120 g
Na-Carbonat	0,3 g
H ₂ O _{dem.}	300 ml

Der Bodenextrakt wurde für 20 min bei 121°C autoklaviert und anschließend ca. 12 h gelagert, bis sich ein Bodensatz bildete. Mit einer Pipette wurde der Überstand (~250 ml) in einen Zentrifugenbecher überführt und bei RT für 15 min bei 7000 rpm zentrifugiert.

Der geklärte Überstand wurde folgendem Medium zugesetzt:

Rhizobium-Medium

Hefeextrakt	1 g
Mannitol	10 g
Boden-Extrakt (geklärt)	200 ml
Ad 1000 ml H ₂ O _{dem.}	
pH 7,1±0,2	

Die Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von Platte angeimpft und unter aeroben Bedingungen in 50 ml Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 30°C und 175 rpm angezogen. Anschließend wurden die Hauptkulturen (50 ml) mit ca. 100 µl der Vorkulturen angeimpft und analog inkubiert.

2.3.3 *Escherichia coli*

Für die Anzucht von *Escherichia coli* wurde LB Medium verwendet.

Zusammensetzung LB-Medium

Pepton aus Casein	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Ad 1000 ml H ₂ O _{dem.}	
pH 7,2±0,2	

Die Bestandteile dieses Mediums wurden in H₂O_{dem.} gelöst und anschließend für 20 min bei 121°C autoklaviert.

2.3.4 Stammhaltung

Zur längerfristigen Stammhaltung der verwendeten Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 4 ml einer Übernachtskultur, ausgehend von einer Einzelkolonie, bei 7000 rpm für 5 min zentrifugiert, anschließend in 1 ml Glycerin / PBS 1:4 (v/v) gewaschen und nochmals bei 7000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das sedimentierte Zellmaterial wurde in 1 ml Glycerin / PBS aufgenommen und in Reaktionsgefäße zur Kryokonservierung überführt. Die Reaktionsgefäße wurden unmittelbar nach dem Verschließen in flüssigem N₂ schockgefroren und im Anschluss bei -80°C gelagert. Um Einzelkolonien für die folgenden Versuche zu erhalten, wurden die jeweiligen Kryoröhrchen auf Trockeneis in eine Sterilwerkbank eingebracht und die Glycerinkulturen unter sterilen Bedingungen auf Agarplatten des jeweiligen Mediums angeimpft. Hierfür wurde in der Regel ein 3-Ösen-Ausstrich angewandt.

Animpfen von Flüssigkulturen

Die auf den Platten gewachsenen Einzelkolonien wurden mit einer sterilen Impföse abgenommen und in Flüssigmedium überführt. Wurden die Flüssigkulturen wiederum subkultiviert, so wurde die Hauptkultur immer im Verhältnis 1:500 (v/v) bzw. 1:1000 (v/v) aus der Vorkultur beimpft.

Reinheit

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden sowohl mikroskopisch als auch durch Sequenzierung der 16S-rDNS auf ihre Reinheit hin überprüft. Zusätzlich wurde die Reinheit der Kulturen in PFA- bzw. EtOH-fixierten Proben durch Verwendung phylogenetischer, fluoreszierender Sonden überprüft. Für die Experimente wurden nur Kulturen verwendet, die keine Kontamination zeigten.

2.4 Pflanzsysteme

Innerhalb dieser Arbeit wurden das Besiedlungsverhalten und der wachstumsfördernde Effekt der Clostridien auf verschiedene Pflanzen in unterschiedlichen Pflanzsystemen untersucht. Die inokulierten Keimlinge wurden ca. 4 Wochen in einer Phytokammer (BioLine VB1514, Vötsch Industrietechnik GmbH, Reiskirchen, Deutschland) unter definiertem Klima angezogen. Die spezifischen Klimabedingungen sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen. Das verwendete Substrat bestand entweder aus feinkörnigem, autoklaviertem Quarzsand oder Boden. Neben Boden aus dem Versuchsgut Scheyern wurden auch, wie unter 2.4.3 beschrieben, kommerzielle Gärtnererden verwendet.

2.4.1 Verwendete Pflanzen

Als Modellpflanze diente zum einen Weißklee (*Trifolium repens*) „Barbian“ D560 BN 1777 und zum anderen „Deutsches Weidelgras“ (*Lolium perenne*). Die Samen wurden von der Firma Herbiseed (Twyford, Großbritannien) bezogen.

Oberflächensterilisation der Samen

Um die zu verwendenden Samen von Pilzsporen bzw. bakterieller Kontamination zu befreien, wurden die Samen einer Oberflächensterilisation unterzogen. Die Samen wurden hierfür für 2 min in 1% Tween 80 inkubiert. Anschließend wurden sie für 5 min in EtOH_{70%} inkubiert und daraufhin für 15 min mit 2% NaOCl unter Rühren behandelt. Die Samen wurden dann 5-mal mit H₂O_{dem.} gewaschen, bevor sie für 30 min in einer Antibiotika-Lösung (Penicillin [0,6 mg/ml], Streptomycin [0,25 mg/ml]) desinfiziert wurden.

Keimung der Samen

Für die Keimung der Samen wurde festes NB No.4 Medium verwendet. Dieses kommerzielle Medium wurde in H₂O_{dem.} gelöst, für 20 min bei 121°C autoklaviert und in Petrischalen gegossen.

NB No.4 Medium

NB No.4 Medium	8 g
Agar	15 g
Ad 1000 ml H ₂ O _{dem.}	

Nach der Oberflächensterilisierung wurden die Samen der jeweiligen Pflanzenart mit einer Pinzette steril auf Platten ausgelegt, dunkel bei RT für 3 - 4 Tage inkubiert und dadurch zur Keimung gebracht. Dies diente zum einen dazu, die Oberflächensterilisierung zu überprüfen und zum anderen, um ausgekeimte Samen für die folgenden Inokulationen zur Verfügung zu haben. Die gekeimten Samen, deren Wurzeln ca. 1 - 2 cm lang waren und die keine Kontamination zeigten, wurden vor der Inokulation 5-mal mit H₂O_{dem.} gewaschen, um evtl. anhaftende Antibiotika zu entfernen.

2.4.2 Axenisches System

Um das direkte Kolonisierungsverhalten der Bakterien auf Pflanzen ohne Einfluss einer konkurrierenden Mikroflora untersuchen zu können, wurden Versuche in einem mono-axenischen System durchgeführt. Das hierfür verwendete Substrat bestand aus feinkörnigem, gewaschenem und autoklaviertem Quarzsand.

Quarzsand für axenisches System

Um feine Quarzstaubpartikel zu entfernen, wurde der grobkörnige Quarzsand (ca. 3 mm Korngröße) in einem Sieb mit Leitungswasser mehrmals gespült. Anschließend wurde überschüssiges Wasser entfernt, der feuchte Sand autoklaviert und im Anschluss bei 105°C im Trockenschrank getrocknet.

Nährlösung für Pflanzen

Als Nährlösung für die inokulierten Pflanzen im axenischen System diente MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962). Hierfür wurde 2,15 g MS-Medium in 500 ml H₂O_{dem.} gelöst. Der pH-Wert des Mediums wurde aufgrund der Wachstumsbedingungen der Clostridien mit NaOH (1 M) von 5,2 auf 6,8 angehoben. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.4.2.1 Axenisches System in Schott-Duram Röhren

Als Anzuchtgefäße dienten zum einen Schott-Duram Röhren (Ø 30 mm, Schott Glas, Schott AG, Mainz, Deutschland), die, mit Alu-Steckkappen (Schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland) verschlossen, autoklaviert wurden. Diese wurden mit ca. 100 g Quarzsand befüllt, autoklaviert und anschließend getrocknet, bevor 10 ml MS-Medium pro Röhre steril zugegeben und darauffolgend je ein Keimling steril in das System mit einer Pinzette eingepflanzt wurde. Dieses System wurde um eine zweite Röhre ergänzt, die invertiert auf die erste Röhre gesetzt und mit Parafilm M[®] (Alcan Packaging, Neenah, WI, USA) verbunden wurde. Da Gras primär in die Höhe wächst, eignete sich dieser Versuchsaufbau gut für dessen Kultivierung.

2.4.2.2 Axenisches System in Phytatray[™]-Boxen

Da Weißklee vornehmlich in die Breite wächst, wurden für dessen Kultivierung Phytatray Kunststoffboxen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. In jede Phytatray Box wurden ca. 300 g gewaschener, steriler Quarzsand und 25 ml MS-Medium gegeben.

2.4.3 Bodensystem (Topfexperimente)

Um Resultate zu erhalten, die mehr den natürlichen Bedingungen im Freiland ähneln, wurde zur Kultivierung der Pflanzen auch ein Pflanzsystem mit nicht sterilem Boden verwendet. Hierbei wurde landwirtschaftlich genutzter Boden bzw. kommerzielle Gärtnererde eingesetzt. Neben Boden aus dem Versuchsgut Scheyern wurden auch Erden der Typen ED-73 („Einheitserde“) und CL-T („Topferde“) verwendet.

Die Bodenparameter sind folgender Tabelle 2.3 zu entnehmen.

Tabelle 2.3: Bodenparameter des verwendeten Bodensubstrats (Herstellerangaben).

Erde / Boden	bestehend aus:	pH-Wert (CaCl ₂)	Salzgehalt g/l (KCl)	Stickstoff (N) mg/l (CaCl ₂)	Phosphat (P ₂ O ₅) mg/l (CAL)	Kalium (K ₂ O) mg/l (CAL)	Schwefel (S) mg/l (Frischmasse)	Magnesium (Mg) mg/l (Frischmasse)
CL-T bzw. ED-73	Naturton, Weißtorf, Sodentorf	5,8	2,0 - 2,5	250 - 340	300 - 380	400 - 420	200	700

Die verwendeten Substrate wurden einer Spurenelementanalyse unterzogen. Hierbei wurde die Konzentration von Ammonium (NH₄⁺)-, Nitrat (NO₃⁻)- und Phosphat (PO₄³⁻)-Ionen bestimmt [Tabelle 2.4].

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der verwendeten Substrate (Analytik).

Substrat	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻
ED-73	11,8 mg/kg	3,20 g/kg	243 mg/kg
CL-T (1)*	20,6 mg/kg	6,62 g/kg	246 mg/kg
CL-T (2)*	6,35 mg/kg	6,10 g/kg	225 mg/kg
Boden Scheyern	7,78 mg/kg	35,6 mg/kg	7,21 mg/kg

*: **Natürliche Schwankung unterschiedlicher Chargen.**

Wie aus Tabelle 2.4 deutlich wird, unterliegen die Inhaltsstoffe gewissen natürlichen Schwankungen (CL-T (1) - (2)). Verglichen mit den kommerziell erhältlichen Gärtnererden (ED-73 und CL-T) weist der landwirtschaftlich genutzte Boden des Versuchsguts Scheyern einen deutlich geringeren Nährstoffgehalt (NO₃⁻, PO₄³⁻) auf.

Boden aus dem Versuchsgut Scheyern

Hierbei handelt es sich um landwirtschaftlich genutzten Ackerboden aus dem Versuchsgut Scheyern (Bayern, Deutschland). Da dieser Boden eine sehr feine Struktur aufweist, wurden für Wachstumsversuche jeweils zwei Blumentöpfe ineinander gesteckt und dazwischen eine Gaze (37 µm) eingelegt. Pro Topf wurde der trockene Boden mit ca. 100 ml Leitungswasser angefeuchtet und für 2 Tage quellen gelassen.

ED-73 („Einheitserde“) bzw. CL-T („Topferde“)

Die Erden der Typen ED-73 bzw. CL-T stellen handelsübliche Gärtnererden mit reichhaltigen Nährstoffen dar. ED-73 und CL-T wurden von der Bayerischen Gärtnereigenossenschaft e.G. (Aschheim, Deutschland) bezogen.

Die Substrate wurden in rechteckige Blumentöpfe (10 cm x 10 cm x 11 cm) zu ca. 190 g portioniert und anschließend mit Leitungswasser angefeuchtet, um optimale Wachstums-

bedingungen für die Sämlinge zu gewährleisten. Die Keimlinge wurden direkt in das jeweilige Substrat gepflanzt. Um eine Kreuzkontamination durch auslaufendes Gießwasser zu verhindern, wurde jeder Blumentopf in einen Untersetzer gestellt. Die Töpfe wurden innerhalb eines Gewächshauses (60 cm x 40 cm x 20 cm) für ca. 4 Wochen in eine Phytokammer eingebracht. Die Pflanzen konnten auf diese Weise unter definierten Klimabedingungen angezogen werden. Die spezifischen Klimabedingungen sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen. Die Pflanzen wurden je nach Bedarf gleichmäßig gegossen.

2.4.4 Inokulation der Pflanzsysteme

Nachdem die Pflanzsysteme bereitgestellt waren, wurden vor der Inokulation der Pflanzen die zu inokulierenden Bakterien in PBS-Suspension auf eine definierte Bakterienzellzahl eingestellt (*C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* $10^5 - 10^8$ /ml, *R. leguminosarum* 10^7 /ml). Die Keimlinge, deren Wurzeln bereits ca. 1 – 2 cm lang waren, wurden in ein Pflanzsystem (mono-axenisches System oder Bodensystem) überführt. Im Anschluss an das Einpflanzen ins Substrat wurden die Wurzeln mit je 1 ml Suspension inokuliert.

Für die Experimente wurden folgende Ansätze verwendet:

- Pflanzen mit *R. leguminosarum* inokuliert (Kontrolle)
- Pflanzen mit *C. sporogenes* 1739 und *R. leguminosarum* inokuliert
- Pflanzen mit *C. botulinum* 2301 und *R. leguminosarum* inokuliert

Vor der Inokulation der Pflanzen wurden die Clostridien mit *R. leguminosarum* gemischt und erst dann auf die sterilen Keimlinge appliziert. Eine Co-Inokulation mit *R. leguminosarum* wurde gewählt, weil unter natürlichen Freilandbedingungen dieser Bakterienstamm stets mit Weißklee in einer Symbiose assoziiert ist [1.8].

Inokulation mit Clostridien

Als Folge der anaeroben Wachstumsbedingungen der Clostridien wurden zur Inokulation der Pflanzenkeimlinge in den Wachstumsexperimenten sowohl vegetative Zellen als auch hauptsächlich Sporen eingesetzt. Die Zell- bzw. Sporenanzahl wurde am Mikroskop durch Auszählen mittels eines Zähllokulares bestimmt [2.9.1]. Daraufhin wurde eine Suspension mit 10^5 - 10^8 Zellen / Sporen pro ml hergestellt und zur Inokulation verwendet.

Inokulation mit *R. leguminosarum*

Nach ca. 24 h Wachstum wurden die Kulturen geerntet und für die Inokulation verwendet. Die Kulturen wurden bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das sedimentierte Zellmaterial wurde zweimal in 30 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert, bevor es in 10 ml PBS aufgenommen wurde. Die optische Dichte wurde bei 436 nm ($OD_{436 \text{ nm}}$) bestimmt. Daraufhin wurde eine Suspension auf eine $OD_{436 \text{ nm}}$ von 0,7 eingestellt, was einer Gesamtzellzahl von ca. 10^7 Zellen/ml entspricht. Diese Suspension

diente zur Inokulation der Keimlinge. Um ein definiertes und reproduzierbares Protokoll für die Inokulation der Pflanzen zu etablieren, wurden begleitend Experimente zur Bestimmung der Zellzahl, entweder durch Bestimmung der *cfu* (vegetative Zellen) oder durch mikroskopisch-quantitative Auszählung (Sporen), durchgeführt. Nach Ansatz der Pflanzsysteme wurde jeweils 1 ml der verwendeten Inokulationssuspensionen und übrige inokulierte Keimlinge fixiert [2.5.11]. Dies diente der nachträglichen Kontrolle der Inokulationsdosen bzw. der Effizienz der Inokulation.

2.4.5 Klimabedingungen innerhalb der Phytokammer

Die Wachstumsversuche wurden unter kontrollierten klimatischen Bedingungen in einer Phytokammer durchgeführt. Die Tabelle 2.5 stellt die klimatischen Parameter während der Wachstumsversuche innerhalb der Phytokammer dar.

Tabelle 2.5: Klimabedingungen innerhalb der Phytokammer.

Tag-Nacht-Rhythmus:	
14 h Tag	10 h Nacht
Temperatur:	
23°C am Tag	18°C in der Nacht
relative Luftfeuchtigkeit: 50%	

2.4.6 Ernte der Pflanzen

Nach Ende der Wachstumsphase wurden die Pflanzen geerntet und mit einer sterilen Schere in Wurzel und Spross separiert, die getrennt voneinander bearbeitet wurden. Darüber hinaus wurde aus dem Gewächshaus Kondenswasser entnommen und angereichert. Dies diente der Überprüfung einer Kontamination der Pflanzen durch herabtropfendes Kondenswasser. Des Weiteren wurde aus jedem axenischen System je 1 ml MS-Medium entnommen und angereichert. Zudem wurden die gewachsenen Pflanzen mit PBS gewaschen. Dieses Waschwasser wurde bei 7000 rpm für 10 min zentrifugiert und ebenfalls angereichert. Die Anreicherung erfolgte stets für 24 h – 48 h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen in RCM.

Wurzel

Zur Ernte der Wurzeln wurden diese aus dem Pflanzsystem mit einer sterilen Pinzette entnommen. Anschließend wurden sie in PBS gewaschen (Waschwasser) und entweder fixiert, mit Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend in einem Mörser zerrieben, um im Folgenden die Gesamt-DNS zu isolieren. Alternativ wurden die Wurzeln in einem Wägeschälchen mit PBS zerdrückt und in RCM überführt, um vorhandene Sporen zu aktivieren und die Bakterien unter anaeroben Bedingungen bei 37°C anzureichern. Nach 24 h – 48 h wurde aus den Anreicherungskulturen DNS isoliert.

Spross

Der Spross wurde mittels eines sterilen Lineals vermessen und anschließend unter sterilen Bedingungen in ein Röhrchen gegeben, um das Feuchtgewicht mittels einer Feinwaage (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) zu bestimmen. Anschließend wurde der Spross innerhalb des Röhrchens mit nicht fest verschlossenem Deckel für 48 h bei 70°C getrocknet und anschließend das Trockengewicht ermittelt. Um evtl. oberflächlich anhaftende Bakterien abzuspuhlen, wurden Stichproben mit PBS gewaschen (Waschwasser). Daraufhin wurde der Spross analog zur Wurzel bearbeitet.

Anreicherung inokulierter Bakterien aus Pflanzenmaterial vor der DNS-Isolierung

Die Pflanzenproben wurden in PBS gewaschen und in RCM überführt, um im Pflanzenmaterial vorhandene Clostridien anzureichern und potentiell vorhandene Sporen zu aktivieren. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bis 48 h bei 37°C wurden die Anreicherungskulturen einer DNS-Isolierung unterzogen. Die dadurch gewonnene Gesamt-DNS enthält einen signifikant höheren Prozentsatz an bakterieller DNS, verglichen mit der Flüssigstickstoff-Aufschlussmethode.

2.4.7 Auswertung der Wachstumsversuche

Die innerhalb der Wachstumsversuche ermittelten Wachstumsparameter (Sprossgröße, Feuchtgewicht und Trockengewicht des Sprosses) wurden zunächst mit Microsoft® Excel ausgewertet. Statistische Analysen zur Ermittlung der Signifikanz (*: $p < 0,05$) bzgl. einer Beurteilung von Wachstumsunterschieden erfolgten mit der Software GraphPad Prism®. Es wurden je 25 Pflanzen pro Ansatz für die statistische Ermittlung der Unterschiede hinsichtlich des Wachstums der Pflanzen verwendet. Dabei wurde ein t-Test durchgeführt, bei dem jeweils die Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben der unterschiedlichen Ansätze miteinander verglichen wurden. Die Versuche wurden so angelegt, dass die Grundgesamtheiten unter gleichen, unbekanntem Varianzen normalverteilt sind und die Stichproben unabhängig voneinander erfolgten. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α wurde stets auf 0,05 festgelegt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 DNS-Isolierung

Hierfür wurden *kits* der Firma MP-Biomedicals (*soil-kit* oder *spin-kit*) nach Herstellerangaben verwendet. Es konnten bis zu 500 mg einer Probe bzw. bis zu 200 μ l einer Kultur (10^9 Bakterienzellen) in ein Lysematrix-Reaktionsgefäß eingewogen werden. Bei Verwendung des *spin-kits* wurde die entsprechende *Cell Lysis Solution (CLS)* je nach Art der Anwendung zugefügt (Pflanzengewebe: *CLS-VF*; Bakterienkulturen: *CLS-TC*). Anschließend wurden die Proben für 40 sek bei einer Geschwindigkeitseinstellung von 6,0 mittels verschiedener

Matrizes (A, B, E: *soil-kit*) homogenisiert (*FastPrep* FP120, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Matrix A bestand aus Granatsplittern und einer 0,6 cm großen Zirkoniumkugel. Matrix B enthielt Siliziumkugeln (0,1 mm) und Matrix E bestand aus Keramikugeln (1,4 mm), Quarzkugeln (0,1 mm) und 4 mm großen Glasperlen. Die DNS wurde in einem sterilen Reaktionsgefäß in 50-100 µl DES (DNase/Pyrogen-freies Wasser) aufgenommen und konnte sofort für Experimente verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

2.5.2 Plasmidisolierung

Für die Plasmid-DNS-Präparation von *high copy* Plasmid-DNS aus *E. coli* wurde das NucleoSpin® Plasmid *kit* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Um sedimentierte Zellen zu erhalten, wurden 1 – 5 ml einer dicht bewachsenen Bakterienkultur in einer Mikrozentrifuge für 30 sek bei 11000 g zentrifugiert. Die *NucleoSpin*® Plasmid Filtersäulchen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und nach Zugabe von 50 µl Puffer *AE* und Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur für 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Für eine Plasmidisolierung aus Clostridien war es notwendig, das Lyseverfahren mit einer enzymatischen Vorbehandlung zu beginnen (250 µl Puffer *A1* mit 10 mg/ml Lysozym). Die sedimentierten Zellen wurden vollständig durch Verwendung eines Vortex oder Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach einer 30 min Inkubation bei 37°C wurde mit dem Protokoll zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* des *NucleoSpin*® Plasmid *kits* fortgefahren.

2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen *in vitro*-Amplifikation von spezifischen DNS Fragmenten. Der prinzipielle Ablauf einer PCR in einem *Thermocycler* (96-well universal peqstar/gradient, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) besteht aus mehreren Zyklen von drei Temperaturschritten mit unterschiedlicher Verweildauer, die für die jeweilige Phase der enzymatischen Reaktion essentiell sind. Zunächst werden die Doppelstränge der DNS als auch evtl. auftretende Primer-Dimere bei 94 – 96°C getrennt (Denaturierung). Während des nächsten Schritts erfolgt eine spezifische Anlagerung der Primer an die nun in einzelsträngiger Form im Reaktionsgemisch vorliegende zu amplifizierende DNS (Primerannealing / Hybridisierung). Alle Primer dieser Arbeit wurden von Eurofins Medigenomix GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die gewählte Annealing-Temperatur ist innerhalb einer PCR entscheidend für die Spezifität der Bindung der Primer an die Zielsequenz und wird durch die Basenabfolge und die Länge der Primer festgelegt. Bei dem sich anschließenden Schritt (Elongation) ergänzt die DNS-Polymerase am 3'-Ende des Primers die komplementären Basen auf den zu replizierenden Strängen mit freien Nukleotiden. Um noch nicht komplett vervollständigte Stränge im Reaktionsgemisch fertig zu stellen, findet meist eine finale Elongation statt.

2.5.3.1 Reaktionsbedingungen

Für die Amplifikation eines DNS-Abschnitts mittels PCR werden folgende Komponenten innerhalb eines Reaktionsansatzes benötigt. Eine Pufferlösung mit Mg^{2+} -Ionen, die als Kofaktor für die Polymerase dienen, zudem ein Primer-Paar, das auf den Einzelsträngen der DNS jeweils den Beginn für die Polymerase definiert, als auch Desoxyribonukleosid-triphosphate (dNTPs), als Bausteine für den neu-synthetisierten DNS-Strang, sowie die Original-DNS als Matrize und eine Polymerase. Innerhalb dieser Arbeit wurden PCR-Systeme der Hersteller Qiagen N.V (Hilden, Deutschland), Bioron GmbH (Ludwigshafen, Deutschland) und Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet. Tabelle 2.6 zeigt einen typischen Reaktionsansatz des *TopTaq*TM PCR-Systems der Firma Qiagen.

Tabelle 2.6: Reaktionsansatz *TopTaq*TM PCR-System in 50 µl-Volumen.

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
PCR Puffer (10 x) (15mM $MgCl_2$)	5 µl	1 x (1,5mM $MgCl_2$)
<i>CoralLoad</i> TM (10 x)	5 µl	1 x
dNTPs (je 10 mM)	4 µl	200µM je dNTP
Primer 1 (V) (50 µM)	0,1 µl	0,1 µM
Primer 2 (R) (50 µM)	0,1 µl	0,1 µM
<i>TopTaq</i> DNS Polymerase	0,25 µl	1,25 U
NFW	34,55 µl	
DNS [≤ 10 ng/µl]	1 µl	$\leq 1\mu g$

2.5.3.2 Temperatur-Zeit-Zyklen

Eine typische Reaktionsführung einer PCR ist in Tabelle 2.7 dargestellt. Um ein Kondensieren des Reaktionsgemisches zu unterbinden, wurde der Deckel des *Thermocyclers* stets auf 110°C geheizt. Nach Abschluss der PCR wurde die Deckelheizung deaktiviert und das Reaktionsgemisch bei 4°C gelagert.

Tabelle 2.7: PCR-Programm.

94°C 5 min	} 30 Zyklen
94°C 30 sek	
53°C 30 sek	
72°C 1 min	
72°C 10 min	

2.5.4 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Um DNS-Fragmente bzw. PCR-Produkte anhand ihrer Größe (Länge an bp) aufzutrennen, wurde das Verfahren der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Hierbei wird ein Agarosegel in einer mit Laufpuffer (1 x TAE) befüllten Kammer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) mit DNS beladen. Anschließend wird mit einem *power supply* (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) eine Spannung angelegt, um einen Stromfluss zu erreichen. Die negativ-geladenen DNS-Stücke „laufen“ innerhalb der Agarose-Matrix von der Anode zur Kathode, wobei kleinere / kürzere DNS-Stränge/Fragmente schneller „wandern“ als größere / längere. Um die Größe der DNS-Fragmente bzw. PCR-Amplifikate nach horizontaler Gelelektrophorese im Agarosegel abschätzen zu können, wurde jeweils ein Längenstandard mit DNS-Fragmenten definierter Größe (DNS-Leiter, Marker) mit aufgetragen. Es wurden hierfür drei verschiedene Marker, *GeneRuler 100 bp*, *GeneRuler 100 bp Plus* und *GeneRuler 1kb (DNA ladder)*, (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) verwendet.

Herstellung eines Agarose-Gels

Um ein 1%iges Agarosegel herzustellen, wurden 3 g Agarose in 300 ml 1 x TAE eingewogen und durch Kochen gelöst. Die Lösung wurde auf etwa 60°C abgekühlt, bevor EtBr zugeben wurde. Dadurch konnten die auf das Gel aufgetragenen DNS-Fragmente später in einem Transilluminator (biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland) mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden. Um kleinere Fragmente räumlich besser voneinander abzutrennen, wurde ein höherprozentiges (2%iges Gel) verwendet. Für ein kleines Gel (10 cm x 14 cm) wurden ca. 100 ml, für ein großes Gel (14 cm x 23 cm), auf das bis zu 96 Proben aufgetragen werden konnten, ca. 180 ml Agaroselösung pro Schlitten benötigt. Die bestmögliche Auftrennung der Fragmente wurde bei 125 V für ca. 30 min (kleines Gel) bzw. 145 V für ca. 45 min (großes Gel) erreicht.

2.5.5 Präparative Gelelektrophorese

Sollten einzelne Banden aus einem Agarosegel extrahiert werden, so wurde ein 0,8%iges Gel verwendet. Um eine möglichst gute Auftrennung zu erzielen, wurde nur ein Kamm verwendet und eine Spannung von 110 V für 75 min angelegt. Das Agarosegel wurde zum Schutz vor Interkalierung während der Dauer des Laufs ohne EtBr hergestellt. Nach Abschluss des Laufes wurde das Gel für 10 min im EtBr-Färbegrad (50 µl EtBr / 500 ml 1 x TAE) inkubiert. Um ausreichend DNS für die sich anschließenden Versuche zur Verfügung zu haben, wurden hierbei 20 µl aufgetragen. Um eine Fragmentierung der DNS durch eine zu lange Exposition mit UV-Licht zu unterbinden, wurden die Banden rasch mit dem Gel-X-trakta *kit* (Promega, Fitchburg, WI, USA) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel auf einem UV-Tisch ausgestochen.

2.5.6 PCR-Aufreinigung

Sollte mit PCR-Amplifikaten weiter verfahren werden, so wurden sie, nach Überprüfung ihrer Größe mittels eines Aliquot durch horizontale Agarosegelelektrophorese [2.5.4], mit dem *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt, in 30 µl EB Puffer eluiert und im Anschluss photometrisch (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) in ihrer Konzentration bestimmt.

2.5.7 Klonierung

Wurden PCR Amplifikate sequenziert, so wurden sie, um eine höhere Qualität der Sequenz zu erreichen, zunächst in Plasmide kloniert. Hierfür wurde das *StrataClone PCR Cloning kit* (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ligationreaktion beinhaltete 3 µl *StrataClone Cloning Puffer*, 2 µl PCR-Produkt (5 - 50 ng) und 1 µl *StrataClone Vector Mix amp/kan*. Nach erfolgter Transformation der kompetenten Zellen (*E. coli*) wurden 5 µl und 100 µl Zellsuspension auf LB-Kanamycin-Platten, die mit 2% X-Gal versetzt waren, gleichmäßig ausplattiert und anschließend bei 37°C inkubiert.

Herstellung LB-Kan-X-Gal-Platten

Um das blau/weiß-Screening durchführen zu können, wurden LB-Kan-X-Gal-Platten hergestellt. Die X-Gal Stammlösung (0,04 g X-Gal in 1 ml 99%igem Dimethylformamid) wurde bei -22°C lichtgeschützt gelagert. Hiervon wurden, neben 1 ml Kanamycin [50 mg/ml], 1,6 ml auf 1 l ca. 50°C warmes LB Medium gegeben. Das präparierte Medium wurde in Petrischalen gegossen und diese bis zur Verwendung dunkel bei 4°C gelagert.

2.5.7.1 Selektion rekombinanter Zellen

Nach ca. 24 h konnten weiße oder leicht hellblaue Kolonien, die auf festem Medium gewachsen waren, für eine sich anschließende Plasmid-DNS-Analyse vereinzelt werden. Hierfür wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas Zellmaterial abgenommen und auf eine *Gridplatte* (LB/Kan/X-Gal) ausgestrichen. Anschließend wurde Zellmaterial in einen Reaktionsansatz für eine Kolonie-PCR (M13 Primer) [2.5.7.3] und in ein Reagenzglas eingebracht, welches 3 ml LB-Kan [0,05 mg/ml]-Medium enthielt. Die angeimpften Kulturen ausgewählter Kolonien wurden, ebenso wie die *Gridplatte*, bei 37°C inkubiert, bevor Plasmid-DNS isoliert [2.5.2] wurde.

2.5.7.2 Überprüfung des aufgenommenen *inserts* innerhalb der Plasmide

Vor der Sequenzierung wurden das Vorhandensein und die Größe des *inserts* im Plasmid überprüft. Hierfür gab es zwei Möglichkeiten.

Verdau mit Restriktionsendonukleasen (EcoR1)

Durch den Verdau des isolierten Plasmids mit der Restriktionsendonuklease EcoR1 und des daraus resultierenden Bandenmusters konnte überprüft werden, ob und in welcher Größe das *insert* im Plasmid vorlag.

Hierfür wurde folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

EcoR1-Puffer (10 x)	1 μ l
EcoR1	0,2 μ l
NFW	7,8 μ l

Diesem Reaktionsansatz wurde 1 μ l Plasmid-DNS (200 - 500 ng/ μ l) hinzugefügt und für 5 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde, um die Restriktionsfragmente zu visualisieren, ein Aliquot mit Auftragspuffer gemischt und auf ein 1%iges Agarosegel auftragen.

2.5.7.3 Kolonie-PCR

Als weitere Methode zur Überprüfung, ob das *insert* im Plasmid enthalten ist, diente die Kolonie-PCR mit M13-Primern [Tabelle 2.8]. Zum Reaktionsansatz, der in Tabelle 2.6 dargestellt ist, wurden je 0,5 μ l der beiden 50 μ M vorliegenden Primer M13-V und M13-R hinzugegeben.

Anstelle von 1 μ l isolierter Plasmid-DNS [\leq 100 ng/ μ l] konnte auch 1 μ l Kulturüberstand einer Flüssigkultur oder Zellmaterial von festem Nährmedium direkt als DNS-Matrize zum Reaktionsgemisch gegeben werden.

Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 2.7 dargestellt, unterscheidet sich jedoch in der Annealing-Temperatur, die hier bei 55°C liegt.

2.5.8 Sequenzierung

Um die Sequenz von PCR-Amplifikaten zu bestimmen, wurde ein DNS-Kapillarsequenzierer (ABI 3730, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Sequenzier-Reaktion wurde in Mikrotiterplatten mit 96 *wells* (ABgene, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) durchgeführt. Hierfür wurde das *BigDye Terminator (BDT) v3.1* Sequenzier-kit (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.5.8.1 Sequenzierung von 16S-rDNS-Fragmenten

Für die Sequenzierung der etwa 1500 bp großen 16S-rDNS wurden folgende Primer [Tabelle 2.8] eingesetzt.

Tabelle 2.8: Primer für die Amplifikation und Sequenzierung von 16S-rDNS-Fragmenten.

Primer	Target	Sequenz (5´-3´)
907-R	16S-rDNS, 907-926	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT
609-V	16S-rDNS, 785-802	GGA TTA GAT ACC CBD GTA
616-V	16S-rDNS, 8-27	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG
630-R	16S-rDNS	CAK AAA GGA GGT GAT CC
341-V	16S-rDNS	CCT ACG GGA GGC AGC AG
M13-V	Klonierungsvektor	TGT AAA ACG ACG GCC AG
M13-R	Klonierungsvektor	CAG GAA ACA GCT ATG AC

V: „Vorwärts“ – Primer, an den „- Strang“ bindend. R: „Rückwärts“ – Primer, an den „+ Strang“ bindend.

2.5.8.2 Sequenzierreaktion

Bei der Sequenzierreaktion (nach Sanger) wird nur ein Primer eingesetzt, so dass die zu sequenzierende DNS linear amplifiziert wird. Hierfür werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (**ddNTPs**) verwendet. Jedes der vier verschiedenen ddNTPs wird mit einem anderen Farbstoff gekoppelt. Die amplifizierten Kettenabbruchprodukte werden durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers werden die am Ende jedes DNS-Fragmentes angehängten ddNTPs zur Fluoreszenz unterschiedlicher Wellenlänge angeregt und von einem Detektor erkannt. Das Chromatogramm gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNS-Stranges wieder.

Reaktionsgemisch der Sequenzier-Reaktion

BDT Puffer (5 x)	1 µl
BDT Mix	1 µl
Primer (50 µM)	0,2 µl
NFW	1,8 µl
Plasmid-DNS [100 - 200 ng/µl]	1 µl

Tabelle 2.9: PCR-Programm der Sequenzier-Reaktion.

ramp 96°C (1°C/s)	
96°C 1 min	
ramp 96°C (1°C/s)	} 50 Zyklen
96°C 10 sek	
ramp 50°C (1°C/s)	
50°C 5 sek	
ramp 60°C (1°C/s)	
60°C 4 min	

*: Die „Rampenzeit“ ist die Zeit, die ein Thermocycler benötigt, um eine bestimmte Temperatur innerhalb der PCR-Reaktion zu erreichen. Um Fehlpaarungen durch eine unspezifische Bindung gering zu halten, wird die Rampenzeit generell möglichst kurz gewählt. Bei der Sequenzierreaktion wird sie auf 1°C/s erhöht. Die Verwendung einer Temperatur-Rampe ermöglicht eine Primeranlagerung über einen größeren Temperaturbereich bei gleichzeitig langsam durch die Polymerase beginnender Elongation, wodurch schwach gebundene Primer sich schwerer von der Matrize ablösen.

2.5.8.3 EtOH-Fällung der Sequenzierreaktion

Nach Abschluss der Sequenzierreaktion wurde die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNS mittels EtOH gefällt. Hierfür wurden pro 5 µl Ansatz 25 µl EtOH_{per Analyse} hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde für 15 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Verwurf des Überstands wurden pro Ansatz 125 µl EtOH_{70% per Analyse} zugefügt und weitere 15 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals verworfen und die Multititerplatte für 1 min bei 500 g „getrocknet“. Zuletzt wurde jeder Ansatz in 50 µl H₂O_{Licrosolv} (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen und in eine Barcodeplatte (ABgene) überführt, die in einen Sequenzierer eingebracht wurde.

2.5.9 Auswertung von Sequenzdaten

Die vorhandenen Sequenzen des Klonierungsvektors wurden von der erhaltenen Gesamtsequenz entfernt. Die Sequenzdaten bzw. Chromatogramme wurden Korrektur gelesen und mit Hilfe der vom *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* zur Verfügung gestellten Suchmaschine „**BLAST**“ mit in der Datenbank *GenBank* abgelegten Sequenzen verglichen. Für die Assemblierung von mehreren Teilsequenzen zu einer Gesamtsequenz wurde das Sequenzanalyse-Programm *SeqMan* (Lasergene® v7.1, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) verwendet.

2.5.10 Wachstumsparameter der Bakterienstämme

Es wurde getestet, bei welchen Temperaturen *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* in der Lage ist zu wachsen. Hierfür wurden RCM-Flüssigmedien [2.3.1] mit Sporen der Clostridien-Stämme angeimpft und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Um das Wachstum der verwendeten Bakterien in statischen Kulturen in Flüssigmedium zu analysieren, wurden **Wachstumskurven** angefertigt. Hierfür wurde stündlich ein gewisses Volumen der Kultur entnommen und photometrisch die Zelldichte (OD) bei einer Wellenlänge von 436 nm (Rhizobien) oder 600 nm (Clostridien) bestimmt. Gleichzeitig wurden Proben der Kulturen zu gewissen Zeitpunkten sowohl fixiert und für spätere Analysen bei -22°C gelagert, als auch DNS isoliert. Die Kulturen wurden in **Triplikaten** unter optimalen Bedingungen inkubiert und das Wachstum wurde über 4 Tage verfolgt. Anfangs wurde stündlich ein Aliquot entnommen und photometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD-Messung) im Vergleich zum sterilen Medium vermessen. In der stationären Phase wurde die Zeitspanne zwischen den Messpunkten größer (6 h oder 12 h). Sobald die OD-Messung einen Wert von mehr als 1 ergab, wurde die Probe, um innerhalb der Linearität der Trübungsmessung zu bleiben, 1:10 mit Medium verdünnt. Um die Zellzahl mit den OD-Werten zu korrelieren, wurde ein Aliquot fixiert und am Mikroskop ausgezählt. Begleitend dazu wurde die *cfu/ml* durch Ausplattieren bestimmt. Die Zeitpunkte der DNS-Isolierung wurden so gewählt, dass die unterschiedlichen Phasen des Wachstums (lag-, exponentielle-, stationäre- und Absterbe-Phase) erfasst wurden.

2.5.11 Fixierung

Um die zu untersuchenden Bakterien in ihrer natürlichen morphologischen Integrität zu erhalten und sie andererseits abzutöten, wurde sie fixiert (Amann *et al.*, 1990).

Paraformaldehyd (PFA) - Fixierung

Die Wirkung des PFA beruht auf der Vernetzung von Proteinen in der Membran der Zellen. Um Gram-negative Bakterien zu fixieren, wurde eine 4%ige PFA-Lösung verwendet.

Herstellung einer 4%igen – PFA Lösung

Zur Herstellung von 50 ml 4%iger PFA-Lösung wurden in einem Abzug 45 ml H₂O_{reinst} vorgelegt und unter Rühren auf 60-65°C erwärmt. Anschließend wurden 2,5 g Paraformaldehyd zugegeben und sobald die Flüssigkeit nach tropfenweiser Zugabe von NaOH (10 M) aufklarte, wurden 5 ml 10 x PBS hinzugefügt. Um den pH-Wert auf 7,2±0,2 einstellen zu können, wurde die Lösung auf ca. 20°C abgekühlt, daraufhin steril filtriert (0,45 µm Porengröße, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) und aliquotiert. Die PFA-Lösung konnte, bei 4°C gelagert, bis zu einer Woche verwendet werden.

Um **Gram-negative Bakterien** einer Flüssigkultur mit **PFA** zu fixieren, wurden sie in sterilen Reaktionsgefäßen sedimentiert und, um Medienrückstände zu entfernen, in 800 µl PBS resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 7000 rpm und erneutem Verwurf des Überstandes wurde das sedimentierte Zellmaterial in 200 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 600 µl 4%iger PFA-Lösung wurde die Suspension für mindestens 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation verworfen und die erhaltenen, fixierten Zellen in 200 µl PBS aufgenommen. Nachdem 200 µl EtOH_{per Analyse} zugegeben wurden, konnten die Proben bei -20°C gelagert werden.

EtOH - Fixierung

Da die Zellwand **Gram-positiver Bakterien** durch den Einsatz von PFA zu stark quervernetzt werden würde, und somit die Zellen für Sonden unzugänglich werden würden, wurden Proben Gram-positiver Bakterien mit **EtOH** fixiert. Durch den Einsatz von EtOH findet eine Denaturierung der Proteine innerhalb der Bakterienzellwand statt. 1 ml einer bewachsenen Kultur wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml EtOH_{per Analyse} gemischt und für 3 - 4 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal für 5 min bei 7000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellmaterial jeweils in 1 ml PBS resuspendiert. Zuletzt wurden die sedimentierten Zellen in 50% EtOH / 50% PBS (v/v) resuspendiert und bei -20°C gelagert. Um an inokulierten Wurzeln anhaftende Zellen zu fixieren, wurden die Wurzeln in PBS gewaschen und mit 1,6 ml 50% EtOH / 50% PBS (v/v) für mindestens 4 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das EtOH verworfen, die Wurzeln in 60% EtOH und 40% PBS überführt und bei -20°C gelagert.

2.5.12 Vorbehandlung Gram-positiver Bakterien

Da Gram-positive Bakterien eine sehr dicke und stabile Zellwand aufweisen, die aus vielen Murein-Schichten (Peptidoglycan) bestehen kann, in welche (Lipo-) Teichonsäuren und Proteine eingelagert sind, bedarf molekularbiologisches Arbeiten mit diesen Bakterien oft spezieller Anpassungen (Wagner *et al.*, 1998). Sowohl das Einbringen von Substanzen in die Zelle (Färben, Transformation, Hybridisierung (FISH), etc.) als auch das Isolieren von DNS und Plasmiden benötigt gezielte enzymatische Vorbehandlungen mit beispielsweise Lysozym oder Mutanolysin. In der exponentiellen Wachstumsphase teilen sich die Zellen häufig, wodurch die Zellwand in diesem Stadium relativ dünn vorliegt. Daher ist beispielsweise das Eindringen (Penetranz) der FISH-Sonden besser gewährleistet als zu einem späteren Wachstumszeitpunkt, in dem die Zellwand verdickt vorliegt.

Herstellung einer Lysozym-Arbeitslösung

Es wurden 10 mg Lysozym in 1 ml H_2O_{reinst} gelöst und steril filtriert (0,22 μm). Diese Lösung enthält 111 KU/mg.

Herstellung einer Mutanolysin-Arbeitslösung

Es wurden 10 mg Mutanolysin in 1 ml H_2O_{reinst} gelöst und steril filtriert (0,22 μm).

Sedimentiertes Zellmaterial wurde in einer Enzymlösung resuspendiert und bei RT für 15 min bis 30 min inkubiert.

2.5.13 Färbungen

Innerhalb dieser Arbeit wurden verschiedene Färbetechniken angewandt.

Herstellung Methyleneblau-Färbelösung

30 ml einer gesättigten Methyleneblaulösung (0,6 g Methyleneblau in 50 ml EtOH) wurden mit 1 ml einer wässrigen 1%igen Kaliumhydroxidlösung (0,5 g KOH in 50 ml $H_2O_{\text{dem.}}$) und 99 ml $H_2O_{\text{dem.}}$ gemischt.

Ca. 20 μl dieser Färbelösung wurden jeweils auf eine Aussparung eines mit Epoxidharz beschichteten Objektträgers (OT) (Carl Roth GmbH+Co.KG, Deutschland) aufgetragen und für 2 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit $H_2O_{\text{dem.}}$ abgespült und der OT an der Luft getrocknet.

Endosporenfärbung mit Malachitgrün (5%)

Um die Sporen besser von vegetativen Zellen unterscheiden zu können, wurden sie mittels einer Endosporenfärbung mit Malachitgrün angefärbt. Hierzu wurden 5 g Malachitgrün in 100 ml $H_2O_{\text{dem.}}$ unter Rühren gelöst. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert (0,22 μm). Ca. 20 μl der Malachitgrünlösung wurden jeweils auf eine Aussparung eines Objektträgers aufgetragen, über einem Bunsenbrenner erwärmt, und für 2 min inkubiert. Im Anschluss

wurde die Lösung mit $H_2O_{\text{dem.}}$ ab gespült, die Kulturen auf einem OT für 1 min mit Safranin gegengefärbt, erneut mit $H_2O_{\text{dem.}}$ ab gespült und der OT an der Luft getrocknet.

DAPI-Färbung

Um beispielsweise die Effizienz der FISH Prozedur überprüfen zu können, wurden die mit Sonden hybridisierten Präparate z.T. zusätzlich mit DAPI gegengefärbt. Hierfür wurde die DAPI-Vorratslösung 1:100 mit H_2O_{reinst} verdünnt. Davon wurden 10 μl pro Aussparung auf einem OT mit fixierten Bakteriensuspensionen für 10 min im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die OT mit $H_2O_{\text{dem.}}$ gespült und an der Luft getrocknet.

2.6 Diagnostischer Nachweis inokulierter Clostridien

Für den spezifischen molekularbiologischen Nachweis der inokulierten Clostridien innerhalb des Pflanzenmaterials wurden verschiedene Primer-Paare zur Detektion verwendet [Tabelle 2.10].

Tabelle 2.10: Primer für die Detektion von Clostridien.

Primer	Target	Größe Amplifikationsprodukt (in bp)	Sequenz (5'-3')	Spezifität	Referenz
P930 (V)	16S-rRNS	665	GTG AAA TGC GTA GAG ATT AGG AA	Genus <i>Clostridium</i>	(Bourhis und Saunier, 2005)
P932 (R)	16S-rRNS		GAT YYG CGA TTA CTA GYA ACT C		(Bourhis und Saunier, 2005)
IBTSB1 (V)	<i>bont C</i> (5')	706	TCC TCG AGT TAC AAG CCC TAA	<i>C. botulinum</i> Typ C	F. Gessler (Göttingen)
IBTSB1 (R)	<i>bont C</i> (5')		ATC CAA TGC CTT TTC CTC AA		F. Gessler (Göttingen)
IBTSB2 (V)	<i>bont D</i> (5')	462	TGG TTC ACC TTT TAT GGG AGA	<i>C. botulinum</i> Typ D	F. Gessler (Göttingen)
IBTSB2 (R)	<i>bont D</i> (5')		TGT ACG TTG GGT CCA TCT TG		F. Gessler (Göttingen)
IBTSB3 (V)	<i>bont C</i> (3')	287	AAA TTA GGT AGT TCA GGG GAK GA	<i>C. botulinum</i> Typ C	F. Gessler (Göttingen)
IBTSB3 (R)	<i>bont C</i> (3')		TTR TAT CCM GSA GCA TTM TTT		F. Gessler (Göttingen)
IBTSB4 (V)	<i>bont D</i> (3')	128	TCA GAT GCT TTG GAT TAG AGA TTT	<i>C. botulinum</i> Typ D	F. Gessler (Göttingen)
IBTSB4 (R)	<i>bont D</i> (3')		ACT TCA AAG GAT TTC CCC AAT		F. Gessler (Göttingen)
AS 11 (V)	<i>bont A</i>	283	TGC AGG ACA AAT GCA ACC AGT	<i>C. botulinum</i> Typ A	(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
AS 22 (R)			TCC ACC CCA AAA TGG TAT TCC		(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
BS 11 (V)	<i>bont B</i>	315	CCT CCA TTT GCG AGA GGT ACG	<i>C. botulinum</i> Typ B	(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
BS 22 (R)			CTC TTC GAG TGG AAC ACG TCT		(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
CS 11 (V)	<i>bont C</i>	290	ATA CAC TAG CTA ATG AGC CTG	<i>C. botulinum</i> Typ C	(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
CS 22 (R)			TGG AGT ATT GTT ATT CCC AGG		(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
DS 11 (V)	<i>bont D</i>	497	GTG ATC CTG TTA ATG ACA ATG	<i>C. botulinum</i> Typ D	(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
DS 22 (R)			TCC TTG CAA TGT AAG GGA TGC		(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
ES 11 (V)	<i>bont E</i>	266	CAG GCG GTT GTC AAG AAT TTT A	<i>C. botulinum</i> Typ E	(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
ES 22 (R)			ATT AGC TTT TGA CAG TTC TTC		(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
FS 11 (V)	<i>bont F</i>	332	CAA TAG GAA CGA ATC CTA GTG	<i>C. botulinum</i> Typ F	(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)
FS 22 (R)			ATC AGG TCC TGC TCC CAA TAC		(Takeshi <i>et al.</i> , 1996)

V: „Vorwärts“ – Primer, an den „– Strang“ bindend. R: „Rückwärts“ – Primer, an den „+ Strang“ bindend.

2.6.1 16S-rDNS (P930/P932)

Das Primerpaar P930 und P932 amplifiziert ein 665 bp großes Fragment der 16S-rDNS und erfasst die gesamte Gattung *Clostridia*. Zum Reaktionsansatz, der in Tabelle 2.6 dargestellt ist, werden je 0,1 µl der beiden 50 µM vorliegenden Primer P930 und P932 hinzugegeben. Das verwendete PCR-Programm für den Nachweis von Clostridien mit dem Primerpaar P930/P932 ist in Tabelle 2.7 dargestellt, unterscheidet sich jedoch in der Annealing-Temperatur und in der Anzahl der Zyklen, die hier bei 60°C bzw. bei 35 Zyklen liegt.

2.6.2 *bont D* – Gen (Toxin-Gen)

Auf das Vorhandensein von *C. botulinum* Typ D kann durch einen PCR gestützten Nachweis des für das Botulinum-Toxin D kodierenden Gens (*bont D*) mittels diagnostischer PCR getestet werden. Hierzu stehen zwei verschiedene PCR-Systeme zur Verfügung. Zum einen das BoNT D-PCR System nach Takeshi (Takeshi *et al.*, 1996) und zum anderen das BoNT/CD-Multiplex-PCR System.

2.6.2.1 BoNT D PCR (DS11/DS22)

Mittels des Primerpaares DS11/DS22 (Takeshi *et al.*, 1996) ist es möglich, *C. botulinum* Typ D durch Amplifikation eines 497 bp großen Fragments spezifisch nachzuweisen. Zum Reaktionsansatz [Tabelle 2.6] werden je 0,1 µl der beiden 50 µM vorliegenden Primer DS11 und DS22 hinzugegeben. Das verwendete PCR-Programm für den Nachweis von *C. botulinum* mit dem Primerpaar DS11/DS22 ist in Tabelle 2.7 dargestellt, unterscheidet sich jedoch in der Annealing-Temperatur und in der Anzahl der Zyklen, die hier bei 55°C bzw. bei 35 Zyklen liegt.

2.6.2.2 BoNT/CD-Multiplex-PCR (F1-R4)

Aufgrund des Phänomens der Mosaiktoxine [1.5] wurde innerhalb dieser Arbeit eine BoNT/CD-Multiplex-PCR zur Unterscheidung eventuell auftretender Toxinchimären der verschiedenen BoNT C und D-Subtypen angewendet. Für die BoNT/CD-Multiplex-PCR werden 4 verschiedene spezifische Primerpaare [Tabelle 2.10] in einem Reaktionsansatz gleichzeitig verwendet. Anhand der Größe der Amplifikate kann zwischen den verschiedenen Subtypen der Toxine unterschieden werden. Die Größe des Amplifikationsprodukts für einen *bont D*-Nachweis liegt bei Verwendung von F2/R2 bei 462 bp bzw. bei F4/R4 bei 128 bp. Zum Reaktionsansatz [Tabelle 2.6] werden 0,4 µl einer 10 µM Mischung der 8 verwendeten Primer (Primer-Mix V1-R4) und zusätzlich 4 µl MgCl₂ (25 mM) gegeben. Daher verringert sich die zugegebene Menge an NFW auf 30,35 µl. Das verwendete PCR-Programm der BoNT/CD-Multiplex-PCR ist in Tabelle 2.7 dargestellt. Die Annealing-Temperatur liegt bei 56°C und die Anzahl der Zyklen bei 35.

2.7 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Bei der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) (Amann *et al.*, 1990; Roller *et al.*, 1994) wird eine phylogenetische Oligonukleotid-Sonde mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt und für die **kulturunabhängige Detektion** von Bakterien verwendet. Durch die Möglichkeit, verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe wie **Indocarbocyanin** (Cy3), **Indodicarbocyanin** (Cy5) oder **Fluorescein-Isothiocyanat** (FITC) an unterschiedlich spezifische Sonden zu koppeln, kann in einer Probe gleichzeitig der Nachweis mehrerer Bakterien unterschiedlicher taxonomischer Einordnung erzielt werden. FISH ist eine molekularbiologische Methode, um Mikroorganismen direkt „*in situ*“ in Geweben/Habitaten der jeweiligen fixierten Probe nachzuweisen, ohne die Organismen kultivieren zu müssen (*in vitro*). Dabei wird eine generierte Sonde (ca. 18 bp Länge) eingesetzt, die durch Ausprägung von Basenpaarungen an die Ziel-rRNS hybridisiert.

Bei Gram-positiven Bakterien, wie *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* erfordert der Nachweis durch fluoreszenzmarkierte phylogenetische Gensonden mittels der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) eine vorangehende Optimierung der Fixierungs- und Hybridisierungsbedingungen. Die Ursache liegt vor allem in der unterschiedlichen Ausprägung und somit Permeabilität der Gram-positiven Zellwand für Gensonden, bezogen auf die verschiedenen Wachstumsphasen (lag-, log-, stationäre- und Absterbe-Phase) der Organismen begründet. Da sich in der exponentiellen Wachstumsphase die Zellen schnell teilen, ist die Zellwand in diesem Stadium dünn und somit wenig ausgeprägt. Daher ist eine Durchdringung (Penetranz) der Sonde besser gewährleistet als zu einem späteren Wachstumszeitpunkt, in dem die Zellwand verdickt vorliegt. Aufgrund der beschriebenen Besonderheiten wurden verschiedene Vorbehandlungen für die Hybridisierung getestet. Zur Ermittlung der optimalen Stringenz für die verwendete CHIS150 Sonde, wurden Fixative aus der exponentiellen Wachstumsphase [Abbildung 3.29 II] verwendet und eine Formamid- (FA) Reihe (0% FA in 10% Schritten bis 60%) [Abbildung 3.30, 3.31] durchgeführt. Von jeder Konzentration wurden am Mikroskop mindestens 25 Bilder mit gleicher Belichtung aufgenommen. Die Auswertung wurde mit dem Programm *DAIME* (Daims *et al.*, 2006) durchgeführt. Für die Detektion der inokulierten Rhizobien wurde die Sonde RHI1247 [Tabelle 2.11] verwendet.

Alle für die FISH benötigten Reagenzien (5 M NaCl; 10% SDS; 1 M Tris/HCl pH 8,0; 0,5 M EDTA, entionisiertes Formamid) wurden von der Firma AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Oligonukleotidsonden für FISH

Für den Nachweis der Clostridien mittels FISH wurde eine Oligonukleotid-Sonde (CHIS150) verwendet [Tabelle 2.11]. Alle innerhalb der Arbeit verwendeten Oligonukleotidsonden [Tabelle 2.11] wurden von der Firma Eurofins Medigenomix GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 2.11: FISH-Sonden.

Sonde	Spezifität	Bindungsposition	Sequenz 5'-3'	% FA	Referenz
EUB338-I	<i>Bacteria</i> , außer *, **	16S-rRNS, 338-355	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	35	(Amann <i>et al.</i> , 1990)
EUB338-II	* <i>Planctomycetales</i>	16S-rRNS, 338-355	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	35	(Daims <i>et al.</i> , 1999)
EUB338-III	** <i>Verrucomicrobiales</i>	16S-rRNS, 338-355	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	35	(Daims <i>et al.</i> , 1999)
CHIS150	<i>C. botulinum</i> , andere Clostridien	16S-rRNS, 150-172	TTA TGC GGT ATT AAT CTY CCT TT	35	(Franks <i>et al.</i> , 1998)
RHI1247	<i>Agrobacterium</i> , <i>Bartonella</i> , <i>Blastobacter aggregatus</i> , <i>B. capsulatus</i> , <i>Brucella</i> , <i>Chelatobacter</i> , <i>Mycoplana dimorpha</i> , <i>M. ramosa</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Phyllobacterium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i>	16S-rRNS, 1247-1261	TCG CTG CCC ACT GTC	35	(Ludwig <i>et al.</i> , 1998)

Die verwendeten Oligonukleotidsonden waren jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt [Tabelle 2.12].

Tabelle 2.12: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Fluoreszenzfarbstoff	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	494	518
Indocarbocyanin (Cy3)	554	570
Indodicarbocyanin (Cy5)	650	667

Nach Erhalt der lyophilisierten Oligonukleotid-Sonden wurden diese in 100 µl H₂O_{reinst} rekonstituiert und die Konzentration der Lösungen photometrisch bestimmt. Aus den Stammlösungen wurden Arbeitslösungen (50 µl) in den Konzentrationen 30 ng/µl (für Cy3 und Cy5 markierte Sonden) und 50 ng/µl (für FITC markierte Sonden) hergestellt.

Das Hybridisierungsprotokoll (Amann *et al.*, 1992; Manz *et al.*, 1996) wurde auf die zu untersuchenden Bakterien angepasst. Für die Hybridisierung von Reinkulturen wurden 3 µl einer fixierten Bakteriensuspension auf je eine Aussparung eines mit Epoxidharz beschichteten Objektträgers gleichmäßig verteilt. Die Proben wurden bei 30°C getrocknet und anschließend für je 3 min zur Dehydratisierung einer aufsteigenden EtOH-Reihe (50% (v/v), 80% (v/v) und 100%) unterzogen und danach erneut getrocknet. Bei Gram-

positiven Bakterienarten wurde im Anschluss je 10 µl Lysozymlösung auf die fixierten Bakteriensuspensionen gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Die Objektträger wurden mit H₂O_{reinst} gespült, getrocknet und nochmals einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen, bevor das Protokoll fortgeführt wurde. Je Probe wurde 9 µl Hybridisierungspuffer (siehe unten) und je 1 µl Sondenarbeitslösung aufgebracht. Die OT wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt, das zum Schutz vor Eintrocknung ein mit dem Rest des Hybridisierungspuffers getränktes Stück Zellstoff enthielt (feuchte Kammer). Die Hybridisierung erfolgte bei 46°C für 1 - 1,5 h in einem Hybridisierungsöfen (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland). Die Stringenz wurde über die FA-Konzentration im Hybridisierungspuffer erreicht [Tabelle 2.13]. Durch Schwächung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Oligonukleotidsonde und rRNS wird die Bindungsstärke des Hybrids verringert. Die Zugabe von 1% (v/v) entionisiertem Formamid zum Hybridisierungspuffer erhöht die Stringenz um ca. 0,5°C. Die optimale Formamidkonzentration ist von der jeweiligen Basenzusammensetzung der Sonde abhängig und wurde durch Erstellung von Formamidreihen [Abbildung 3.30] im Vorfeld ermittelt. Wurden fixierte Wurzelproben [2.5.11] der FISH Prozedur unterzogen, so wurden ca. 1 - 2 cm lange Wurzelstücke verwendet und alle erforderlichen Schritte in 2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Um die Wurzeln vollständig zu bedecken, wurden 120 µl Hybridisierungslösung verwendet, zu der je 15 µl Sondenarbeitslösung gegeben wurden. Neben Wurzelstücken wurden auch horizontale Querschnitte der Wurzeln für die FISH verwendet. Die Wurzeln wurden hierfür zwischen zwei Styroporblöcken mit einer Rasierklinge in 50 - 100 µm dicke Scheiben geschnitten, auf einem Objektträger immobilisiert und anschließend einer Hybridisierung unterzogen. Der Hybridisierungspuffer setzt sich wie folgt zusammen.

Hybridisierungspuffer

NaCl (5 M)	360 µl
Tris/HCl (1 M, pH 8,0)	40 µl
Formamid (FA) (entionisiert)	siehe Tabelle 2.13
H ₂ O _{reinst}	siehe Tabelle 2.13
SDS (10% (w/v))	2 µl

Tabelle 2.13: Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer für FISH.

% (v/v) FA	FA [μ l]	H ₂ O _{reinst} [μ l]
0	0	1600
5	100	1500
10	200	1400
15	300	1300
20	400	1400
25	500	1100
30	600	1000
35	700	900
40	800	800
45	900	700
50	1000	600
55	1100	500
60	1200	400
65	1300	300
70	1400	200
75	1500	100
80	1600	0

Um überschüssige Sonden zu entfernen, findet nach der Hybridisierung ein stringenter Waschschrift bei 48°C für 15 min statt. Der Waschpuffer wird im Wasserbad auf 48°C vorgewärmt und hatte folgende Zusammensetzung.

Waschpuffer

NaCl (5 M)	siehe Tabelle 2.14
Tris/HCl (1 M) pH 8,0	1 ml
EDTA (0,5 M) pH 8,0*	500 μ l
H ₂ O _{reinst}	ad 50 ml
SDS (10% (w/v))	50 μ l
* ab 20% Formamid im Hybridisierungspuffer	

Tabelle 2.14: NaCl-Konzentration im Waschpuffer für FISH.

% (v/v) FA im Hybridisierungspuffer	[NaCl]	µl 5 M NaCl auf 50 ml
0	0,900	9000
5	0,636	6300
10	0,450	4500
15	0,318	3180
20	0,225	2150
25	0,159	1490
30	0,112	1020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,014	40
65	0,010	-
70	0,007	350 µl EDTA
75	0,005	250 µl EDTA
80	0,0035	175 µl EDTA

Die nötige Stringenz des Waschpuffers wird durch Variation der NaCl-Konzentration eingestellt. Ab 20% (v/v) FA im Hybridisierungspuffer wird dem Waschpuffer zur Komplexierung zweiwertiger Kationen zusätzlich 500 µl 0,5 M EDTA-Lösung zugegeben. Der Objektträger wird in Waschpuffer für 15 min bei 48°C inkubiert, in H₂O_{reinst} getaucht und anschließend getrocknet.

2.8 Markierung von Clostridien mit *evoglow*

Die Markierung mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) (Ma *et al.*, 2011) eignet sich nicht für die Markierung von Clostridien, da die Ausprägung der Fluoreszenz von GFP von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängig ist, der als Kofaktor für die Synthese der jeweiligen Fluorophore essentiell ist. Um obligat anaerobe Organismen, wie *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes*, mit einem sauerstoffunabhängigen, fluoreszierenden Reportergen markieren zu können, wurden von der Firma evocatal GmbH (Düsseldorf, Deutschland) die Flavinmononucleotid (FMN)-basierten fluoreszierenden Proteine (FbFPs) der *evoglow*®-Serie entwickelt. Sie sind in der Lage, eine helle Cyan-grüne Fluoreszenz in Abwesenheit von Sauerstoff zu entwickeln. Die Anregungs- und Emissionsspektren der *evoglow*-Proteine liegen in der Größenordnung anderer fluoreszierender Proteine [Tabelle 2.17]. Daher kann das gleiche instrumentale Setup für ihre Detektion benutzt werden. Das *evoglow Clostridia kit* enthält die Plasmide **pGLOW-CK^{XN}-Bs2** (Fluoreszenz-Gen von *Bacillus subtilis*) und **pGLOW-CK^{XN}-Pp1** (Fluoreszenz-Gen von *Pseudomonas putida*). Eine Markierung von *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* mit einem *evoglow*-Protein hat den Vorteil einer internen Fluoreszenzmarkierung, die bereits zum Zeitpunkt der Inokulation der Pflanzen vorhanden ist.

2.8.1 Elektroporation

Die meisten Bakterienzellen sind für eine Chemotransformation mittels Hitzeschock nicht geeignet. Ein Durchbruch in der Transformation von Bakterien wurde durch die Feststellung erreicht, dass ein elektrisches Feld von 5-10 kV/cm für 5-10 μ s die Porenbildung in verschiedenen Arten von Zellen und Stämmen induzieren kann und somit die Aufnahme von DNS Molekülen ermöglicht (Potter und Heller, 2011).

Diese Methode der sog. Elektroporation wurde in den letzten Jahren optimiert und für die Transformation einer großen Anzahl von Archae- (Aravalli und Garrett, 1997) und Eubakterien (Wirth *et al.*, 1989) einschließlich Gram-positiver, wie *Bacillus* spp. (Brigidi *et al.*, 1990), *Streptococcus* spp. (Dunny *et al.*, 1991), *Listeria* spp. (Alexander *et al.*, 1990) und *Clostridium* spp. (Information *et al.*, 1988; Jirásková *et al.*, 2005; Olson und Lynd, 2012), als auch Gram-negativer Bakterienarten, wie *E. coli* (Dower *et al.*, 1988), verwendet. Der Mechanismus der Transformation durch Elektroporation ist bis heute nicht vollständig geklärt. Wenn aufgrund eines Hochspannungsimpulses die Potentialdifferenz einen Schwellenwert überschreitet und Zellmembrankomponenten von im Kondensator befindlichen Zellen polarisiert werden (Tieleman, 2004), bilden sich lokale transiente Poren, was zu einer Durchlässigkeit für geladene Moleküle wie DNS führt (Aune und Aachmann, 2010). Die Bildung der Poren geschieht innerhalb von 10 ns, während das Schließen der Poren auf einer Zeitskala von Sekunden geschieht (Aune und Aachmann, 2010). Die Effizienz der Elektroporation ist von vielen Faktoren abhängig, wie der Zellwand, Membranstruktur, Endonuklease-Restriktionsmodifikationssystemen und der Menge an extrazellulären Nukleasen (Davis *et al.*, 2000). Daher müssen die Parameter einer Elektroporation in der Regel für jeden Zelltyp optimiert werden. Die Einbringung der *evoglow*-Gene zur Fluoreszenzmarkierung von *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* erfolgte durch Transformation mittels Elektroporation. Vor allem bei Gram-positiven Bakterien ist für eine erfolgreiche Transformation die Dicke der Zellwand ausschlaggebend, weshalb Zellen in der frühen exponentiellen Wachstumsphase mit nur schwach ausgeprägter Zellwand verwendet wurden. Die höchste Transformationseffizienz ($\sim 10^3$ Transformanden/ μ g Plasmid-DNS) wurde mit folgendem Protokoll erzielt:

Die Zellen wurden in RCM, das 1% (w/v) Glycin enthielt, bei 37°C kultiviert und nach ca. 12 h in neues Glycin-haltiges RCM überimpft. Die Kulturen wurden nach Erreichen der gewünschten $OD_{660nm} = 0,7$ bei 4°C zentrifugiert und mit 0,8 Volumen 10%igem Polyethylenglykol (PEG) 8000 gewaschen. Als Elektroporationspuffer wurde 10% PEG 8000 verwendet. Alle verwendeten Lösungen wurden auf 4°C gekühlt und die gesamte Prozedur der Elektroporation wurde auf Eis durchgeführt. Nach Zugabe von 1 μ g Plasmid-DNS zu einem Volumen von 40 μ l – 300 μ l (10^8 – 10^{10} Zellen) wurden die kompetenten Zellen mit einem Elektroporator (Gene Pulser, BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) einem elektrischen

Puls von 10 kV/cm bei einer Feldstärke von 25 μ F und einem Widerstand von 400 Ω für 10 msec in 2 mm bzw. 4 mm Elektroporationsküvetten (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) ausgesetzt. Nach der Elektroporation konnten sich die Zellen 4 h - 8 h lang in MgCl₂ (25mM) haltigem RCM regenerieren, bevor sie auf selektive RCM/Ampicillin-(Amp) Agarplatten ausplattiert wurden. Der Wildtyp der zu transformierenden Stämme wurde als Amp-sensitiv (Amp^s) bestimmt [3.8.1]. Sobald die Zellen das Plasmid aufgenommen hatten, erhielten sie dadurch eine Resistenz bezüglich Amp (Amp^r). Die Transformanden waren somit in der Lage, unter selektiven Bedingungen zu wachsen.

2.8.2 Überprüfung der Transformation mittels PCR

Die Primerpaare Bs-V/Bs-R bzw. Pp-V/Pp-R [Tabelle 2.15] amplifizieren ein Fragment des jeweiligen *evoglow*-Gens innerhalb des jeweiligen Plasmids in den transformierten Stämmen. Daher kann überprüft werden, ob das *evoglow*-Gen tragende Plasmid durch die Elektroporation aufgenommen wurde.

Tabelle 2.15: Primer zur Überprüfung der Transformationseffizienz.

Primer	Target	Amplifikationsprodukt (Größe in bp)	Sequenz (5' - 3')
Bs-V	pGLOW-CK ^{XN} - Bs2	199	GGA ATA CCT GGA CAA CTT GAA G
Bs-R			CTG CAG GAT CTG TAT GTT TAC C
Pp-V	pGLOW-CK ^{XN} - Pp1	134	CAG GAA GGT AAC GAA AG
Pp-R			GCT ATT CCA GGT TGA TC

2.9 Mikroskopische Methoden

Innerhalb dieser Arbeit wurden verschiedene mikroskopische Techniken angewandt. Neben einem Durchlichtmikroskop (Axioplan, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), das aufgrund der Kopplung mit einer Quecksilberdampfampe auch für Fluoreszenzstudien verwendet werden konnte, wurde ein Binokular für die Untersuchung von Kolonien auf Agarplatten verwendet. Mittels des Binokulars (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) konnten Zellkolonien auf festen Medien hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht werden. Auch die Überprüfung der Fluoreszenz nach Elektroporation bzw. Transformation konnte hiermit durchgeführt werden. Darüber hinaus wurde vor allem für die Lokalisierung der inokulierten Bakterien in Pflanzenmaterial ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM, LSM-510 META, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Die zu mikroskopierenden Präparate wurden auf einem Objektträger in Citifluor-AF1 (Citifluor Ltd., London, Großbritannien) oder in Entellan (Merk Millipore, Deutschland) (*evoglow*-markierte Bakterien) eingebettet, mit einem Deckglas versehen und dunkel bei 4°C bis zur Analyse gelagert.

2.9.1 Durchlicht-Mikroskopie

Mittels eines Durchlichtmikroskops wurden Bakterien hinsichtlich ihrer Morphologie, Sporenbildung, Fluoreszenz und Zellzahl analysiert. Zur Mikroskopie wurde ein Ölimmersionsobjektiv (Plan-Neofluar Objektiv, numerische Apertur 1,3 Phasenkontrast 3) mit 100-facher oder ein Wasserimmersionsobjektiv (1,2 W) mit 63-facher Vergrößerung verwendet. Die bakterielle Gesamtzellzahl (GZZ) bzw. Anzahl an Sporen in Flüssigkulturen wurde mittels des Durchlichtmikroskops mit Hilfe eines Zähllokulars durch Auszählung in einem definierten Volumen bestimmt. Je Aussparung eines OT wurden gleichmäßig 10 µl Suspension aufgetragen und bei RT getrocknet bzw. hitzefixiert und bei Bedarf gefärbt [2.5.13]. Anschließend wurden in mindestens 10 verschiedenen Gesichtsfeldern jeweils das gesamte Gitternetz (126 µm x 126 µm), das sich im Zähllokular befindet, bei einer 100-fachen Vergrößerung und einer geeigneten Verdünnung ausgezählt. Da die Kantenlänge des Gitternetzes bei Verwendung des 100-fach Objektivs 126 µm entspricht und der Durchmesser der Aussparung des Objektträgers mit 6 mm bekannt ist, konnte die mittels Gitternetz bestimmte Anzahl an Zellen in Relation zur gesamten Fläche der Aussparung gesetzt werden und damit die GZZ bzw. Sporenzahl berechnet werden.

Die Bestimmung der GZZ erfolgte nach folgender Gleichung:

$$GZZ = MW * M_F * V$$

- MW Mittelwert der gezählten Zellen aus 10 Gitternetzen
 M_F Mikroskopier-Faktor
 V Verdünnungsfaktor

$$M_F = \frac{\text{Fläche Aussparung}}{\text{Fläche Gitternetz}} = \frac{\pi * r^2}{a^2} = \frac{3,14159 * 3^2}{0,126^2} = \frac{28,27431}{0,015876} = 1780,9467$$

- π Kreiszahl: 3,14159
 r Radius der Aussparung
 a Kantenlänge des Gitternetzes

Da die Gesamtzellzahl immer auf 1 ml angegeben wird, die Zellen jedoch in 10 µl ausgezählt wurden, ergibt sich ein Multiplikationsfaktor von 100.

$$GZZ/ml = MW * 1780,9467 * V * 100$$

2.9.2 Epifluoreszenz-Mikroskopie

Eine Überprüfung der Fluoreszenz hybridisierter Zellen (FISH) bzw. des Transformationserfolgs (*evoglow*) konnte mit demselben Mikroskop [2.9.1] durchgeführt werden, da eine für die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe nötige Quecksilberdampfampe (HBO50_{AC}, Carl Zeiss AG), die Licht spezifischer Wellenlänge erzeugt, an das Mikroskop gekoppelt war. Die verwendeten Fluoreszenzfiltersätze sind in Tabelle 2.16 dargestellt.

Tabelle 2.16: Kenndaten der verwendeten Filtersätze zur Epifluoreszenz-Mikroskopie.

Fluorochrom	Anregungsfilter	Farbteiler	Emissionsfilter
Cy3 (rot)	HQ 535/50	Q 565 LP	HQ 605/75
FITC / <i>evoglow</i> (grün)	HQ 480/40	Q 505 LP	HQ 535/50

2.9.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Das Kolonisierungsverhalten der verwendeten Bakterienstämme wurde mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) bzw. *evoglow* Markierung in Kombination mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht. Bei dieser Technik (Shotton und White, 1989; Shotton, 1989; Paddock, 1999; Paddock, 2000) wird die Probe mit einem fokussierten Laserstrahl abgerastert und die Fluoreszenzsignale werden von einem *photomultiplier* detektiert. Mittels eines konfokalen *pinhole* werden nur Signale aus der fokussierten Ebene detektiert. Für die dreidimensionale mikroskopische Analyse der Bakterienzellen auf / in Pflanzenmaterial, wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (C-Apochromat[®] 63x/1,2 W Korr) verwendet. Da von anderen Lichtquellen nicht genügend Licht für eine intensive Fluoreszenzanregung spezieller Markierungen auf einen Punkt konzentriert werden kann, werden zu diesem Zweck Laser bestimmter Wellenlängen eingesetzt. Das verwendete konfokale Laser-Scanning-Mikroskop ermöglicht das Erstellen von optischen Serienschnitten einer Probe (Bildserien, z-Stapel). Alle Lokalisierungsstudien wurden am CLSM durchgeführt, da aufgrund der konfokalen Mikroskopie genaue Aussagen über die Präsenz der inokulierten Bakterien im Pflanzenmaterial möglich waren. Die Fluoreszenz von FITC ist in grün, die von Cy3 in rot und die von Cy5 in blau dargestellt. Im Allgemeinen wurden immer nur 2 Kanäle gleichzeitig verwendet. Der verbleibende dritte Farbkanal wurde verwendet, um die Autofluoreszenz und damit die Struktur des Pflanzenmaterials detektieren zu können. Die Bilderzeugung bzw. Bildverarbeitung erfolgt mit der Software *Zeiss LSM Image Browser Version 2.80*. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, Filtersätze und Laser sind in Tabelle 2.17 aufgeführt.

Tabelle 2.17: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und der entsprechenden Filtersätze und Laser des CLSM.

Fluorochrom	Absorptionsmaxima (nm)	Emissionsmaxima (nm)	Laser (nm)	Strahlteiler	Filter
<i>evoglow</i>	498	516	Argon (488)	NFT 490 HFT 488/543	BP 500-550
FITC	490, 494	520, 525	Argon (488)	NFT 490 HFT 488/543	BP 500-550
Cy3	514, 552, 554	566, 570	Helium-Neon (543)	HFT 488/543	LP 560
Cy5	649	666, 670	Helium-Neon (633)	HFT UV 488/543/633	LP 650

Der Argon-Laser erzeugt Anregungswellenlängen von 488 nm (FITC, grüne Fluoreszenz) mit einem BP 500-550 Filter, während zwei Helium-Neon-Laser Anregungswellenlängen von 543 nm (Cy3, rote Fluoreszenz) und 633 nm (Cy5, blaue Fluoreszenz) mit einem LP 560 bzw. LP 650 Langpassfilter bereitstellen.

2.10 Beprobung von Fermentern zur Biogasproduktion

Vor der Überprüfung der entnommenen Proben wurde getestet, ob es für die beiden in dieser Arbeit verwendeten Clostridien-Stämme prinzipiell möglich ist, bei den in Fermentern vorherrschenden Temperaturen wachsen zu können [2.5.10]. Nach Abschluss dieser Versuche, wurden verschiedene Anlagen zur Biogasproduktion in Bayern [Tabelle 2.18], die mit unterschiedlichen Substraten beschickt wurden, stichprobenartig auf die Anwesenheit von *C. botulinum*-Stämmen, die in der Lage sind, BoNT-Typ A bis F zu produzieren, mittels der Detektions-PCR Systeme [2.6, S. 59] getestet.

Tabelle 2.18: Zusammensetzung und chemische Analyse der Fermenterproben.

	Bemerkung	NH ₄ ⁺ (g/kg)	NO ₃ ⁻ (mg/kg)	PO ₄ ³⁻ (g/kg)	pH-Wert
Probe 1	Fermenter, Gülle (Geflügel / Rind)	0,659	16,3	1,42	7,46
Probe 2	Rückstandsbehälter Gülle (Geflügel / Rind)	0,880	< 4,20	1,40	7,55
Probe 3	42°C, 60% Gülle (Schwein / Rind), 40% Silage (Mais, Gras) und Getreideabfälle, Fermenterdirektentnahme	1,99	< 0,602	0,428	n.b.
Probe 4	Silage (Mais, Gras) und Kornschrot, Rückstellbehälter (offen)	0,925	< 0,580	0,480	n.b.
Probe 5	Silage (Mais, Gras) und Triticaleschrot, Rückstellbehälter (abgepresst)	0,491	< 1,00	0,077	n.b.
Probe 6	Schweinegülle	3,17	0,93	9,69	8,05
Probe 7	Rindergülle	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Probe 8	Hühnergülle	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

An unterschiedlichen Stellen im Produktionsablauf, wie dem eigentlichen Fermenter und dem Rückstandsbehälter, wurde jeweils 1 l Probenmaterial entnommen. Die unterschiedlichen Fermenter, sowie die Parameter der durchgeführten Analytik sind in Tabelle 2.18 aufgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Wachstum der Clostridien

Um die optimale Wachstumstemperatur der Clostridien-Stämme zu ermitteln, wurde zunächst getestet, bei welchen Temperaturen *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* in der Lage ist, in RCM Medium zu wachsen. Darüber hinaus wurden Strategien entwickelt, um die obligat anaeroben *Clostridium*-Stämme optimal zu kultivieren [2.3.1] und Sporen zu produzieren.

3.1.1 Wachstumstemperatur von *C. botulinum* / *C. sporogenes*

Beide Clostridien-Stämme, *C. sporogenes* und *C. botulinum*, sind in der Lage, zwischen 18°C und 43°C zu wachsen [Abbildung 3.1 A und B]. *Clostridium botulinum* ist darüber hinaus auch in der Lage, bei 51°C zu wachsen [Abbildung 3.1 B].

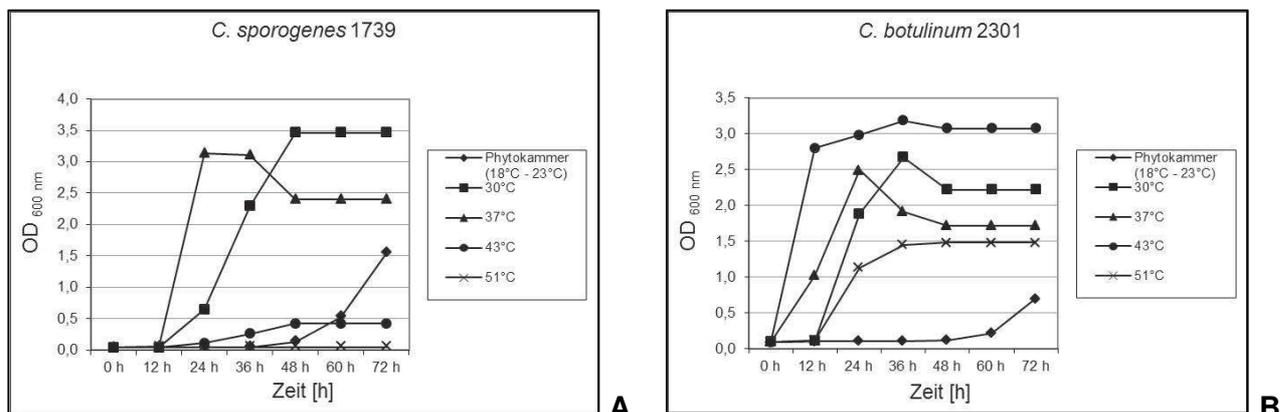


Abbildung 3.1: Wachstum der Clostridien bei unterschiedlichen Temperaturen in RCM [2.5.10].
A: Wachstumskurve von *C. sporogenes* 1739.
B: Wachstumskurve von *C. botulinum* 2301.

Auch durch den molekularen Nachweis kann ein Wachstum der beiden Clostridien-Stämme zwischen 18°C und 43°C nachgewiesen werden [Abbildung 3.2 A und B].

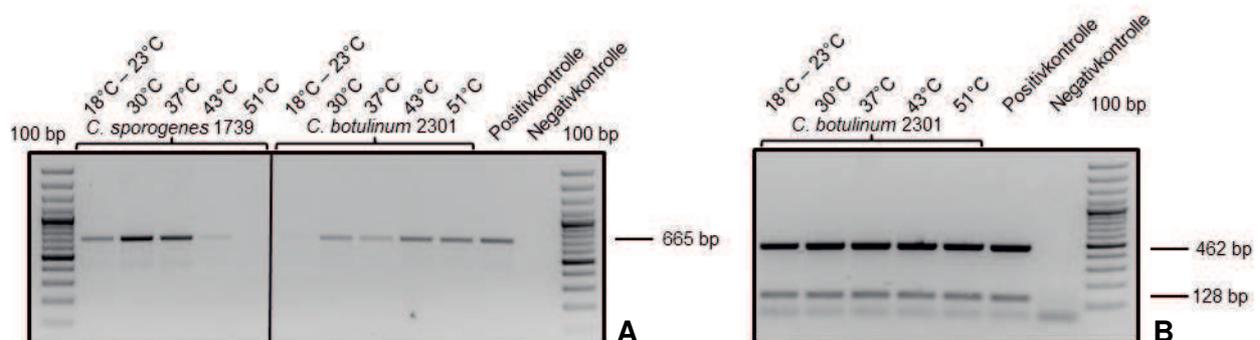


Abbildung 3.2: Nachweis der Clostridien bei unterschiedlichen Wachstumstemperaturen. Die Clostridien konnten anhand Ihrer 16S-rDNS nachgewiesen werden (A: P930/P932: 665 bp). *Clostridium botulinum* konnte zusätzlich anhand des vorhandenen Toxin-Gens (*bont D*) nachgewiesen werden (B: F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp).

Für die Darstellung in Abbildung 3.1 A und B wurde die optische Dichte im Vergleich zu unbewachsenem Medium ermittelt. Für die Abbildung 3.2 A und B wurden aus den Kulturen DNS isoliert und die Bakterien mittels PCR nachgewiesen.

3.1.2 Wachstumsphasen der Clostridien

Da mit zunehmendem Alter der Kulturen und je nach Wachstumsphase die Ausprägung der Zellwand Gram-positiver Bakterien zunimmt, wurde die Effizienz der DNS-Isolierung in den unterschiedlichen Wachstumsphasen untersucht. Hierzu wurden Wachstumskurven von *C. sporogenes* und *C. botulinum* in Triplikaten in RCM bei 37°C [2.5.10] erstellt [Abbildung 3.3] und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Fixierungen und DNS-Isolierungen durchgeführt. Die optische Dichte wurde bei 436 nm bestimmt. Eine Suspension mit einer $OD_{436\text{ nm}}$ von 0,7 entsprach dabei einer Gesamtzellzahl von ca. 10^7 Zellen/ml.

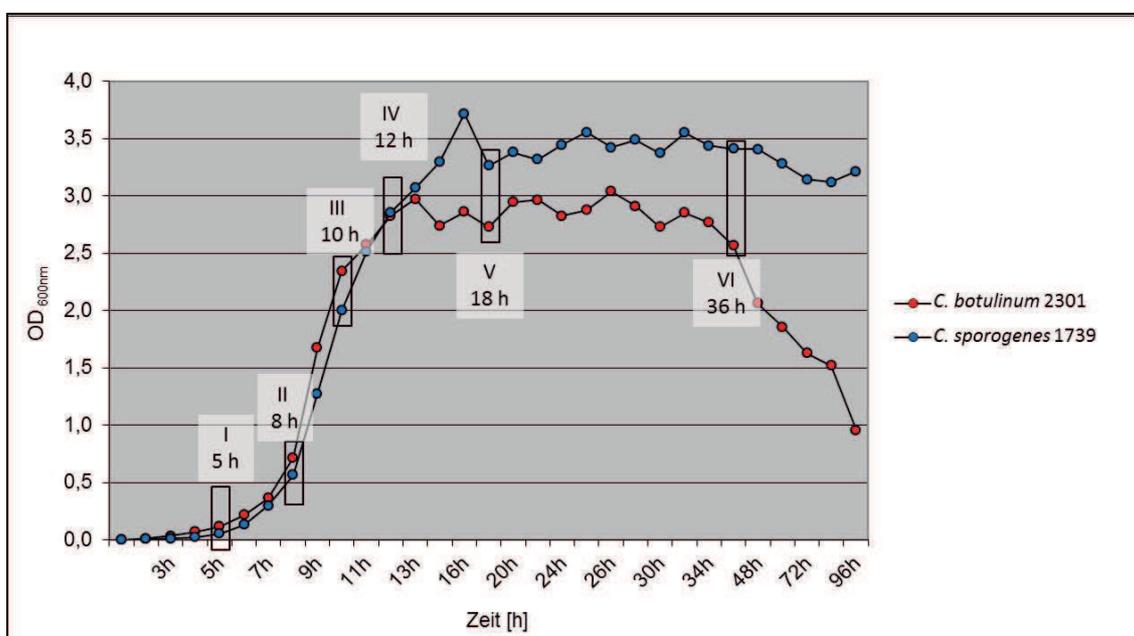


Abbildung 3.3: Wachstumskurve des *C. botulinum* (rot) und *C. sporogenes*-Stamms (blau) in RCM bei 37°C. Die Zeitpunkte der Fixierung und DNS-Isolierung sind markiert (I – VI).

Der pathogene, BoNT D produzierende *C. botulinum* 2301 Stamm wurde ebenso wie der Toxin-negative *C. sporogenes* 1739 Stamm kultiviert [2.5.10].

Die ersten 3 h – 5 h befanden sich die Kulturen in der lag-Phase [Abbildung 3.3 I], in der sich die Zellen an die neuen Wachstumsbedingungen adaptieren. Die sich anschließende Phase war durch ein exponentielles Wachstum gekennzeichnet [Abbildung 3.3 II-III]. Nach rund 12 h exponentieller Wachstumsphase wurde die stationäre Phase (frühe stationäre Phase: [Abbildung 3.3 IV]; späte stationäre Phase: [Abbildung 3.3 V]) erreicht, bevor ab ca. 34 h die Absterbephase [Abbildung 3.3 VI] einsetzte. Diese zeichnete sich durch die Abnahme der Zelldichte (Abnahme der OD) bzw. die Bildung von Überdauerungsformen (Endosporen)

aufgrund von Nährstoffmangel, Überdruck und der Akkumulation von toxischen Stoffwechselendprodukten aus.

Das Wachstum von *R. leguminosarum* wurde, wie das der Clostridien-Stämme, in gleicher Weise über ca. 4 Tage verfolgt; eine Wachstumskurve wurde angefertigt. Sobald die Flüssigkulturen eine Wachstumsdauer von rund 24 h überschritten, fand eine Phasenvariation der Zellen statt. Die freischwimmenden Einzelzellen agglomerierten zu Aggregaten und setzten sich am Boden des Kulturgefäßes ab, wodurch das bewachsene Medium mit der Zeit aufklarte. Daher wurden in den Versuchen stets Kulturen verwendet, die nicht älter als 24 h waren.

3.2 DNS-Isolierung in den verschiedenen Wachstumsphasen

Da bei Gram-positiven Bakterien mit zunehmendem Alter die Zellwand stärker ausgeprägt vorliegt und die Zellen zudem von einem vegetativem Stadium in ein Sporenstadium übergehen, wurde die Effizienz der DNS-Isolierung in den unterschiedlichen Wachstumsphasen ermittelt. Hierfür wurde zu den in Abbildung 3.3 markierten Zeitpunkten (I bis VI) jeweils (Triplikate) aus der gleichen Menge an Zellen DNS isoliert.

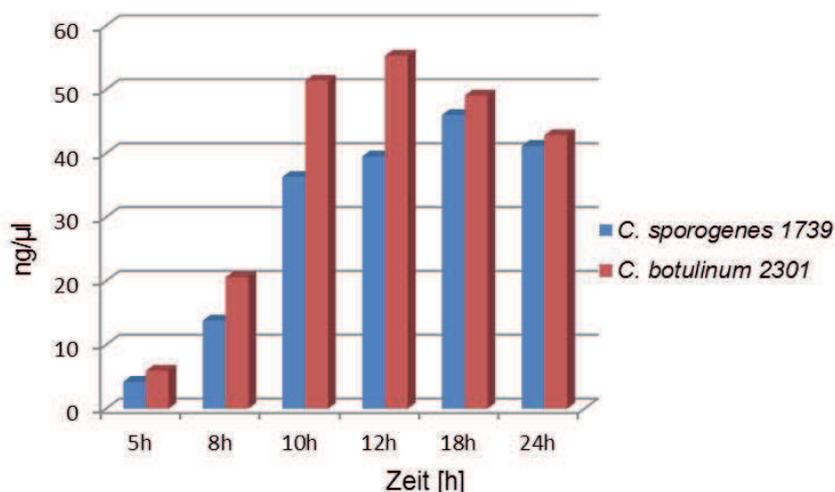


Abbildung 3.4: Menge an isolierter DNS in den unterschiedlichen Wachstumsphasen.

Zu Beginn des Wachstums sind in der angeimpften Flüssigkultur nur wenige Zellen vorhanden, wodurch auch nur wenig DNS isoliert werden konnte. Über die Zeit nimmt die Zellzahl durch das Wachstum zu und die Anzahl der in Kultur enthaltenen Zellen steigt. Bei einer etwa 12-stündigen Inkubationszeit ist die maximale Zellzahl erreicht und es kann prozentual die meiste DNS pro ml Kultur isoliert werden [Abbildung 3.4]. Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Dicke der Gram-positiven Zellwand zu, wodurch eine DNS-Isolierung zu späteren Zeitpunkten erschwert wird und eine geringere Konzentration an isolierter DNS erhalten wird [Abbildung 3.4].

3.3 Sporen

Die verwendeten Pflanzsysteme [2.4] wurden, neben Versuchen mit vegetativen Zellen, auch mit Sporen der *Clostridium*-Stämme inokuliert.

3.3.1 Sporulation von *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes*

Die Sporen der beiden Clostridien-Stämme wurden unter anaeroben Bedingungen in verschiedenen Sporulationsmedien generiert [2.3.1]. Abbildung 3.5 zeigt Durchlichtbilder mit 1000-facher Vergrößerung, in denen die extrem lichtbrechenden, runden Sporen [Abbildung 3.5 A] optisch gut erkennbar und von vegetativen Zellen [Abbildung 3.5 B] unterscheidbar sind.

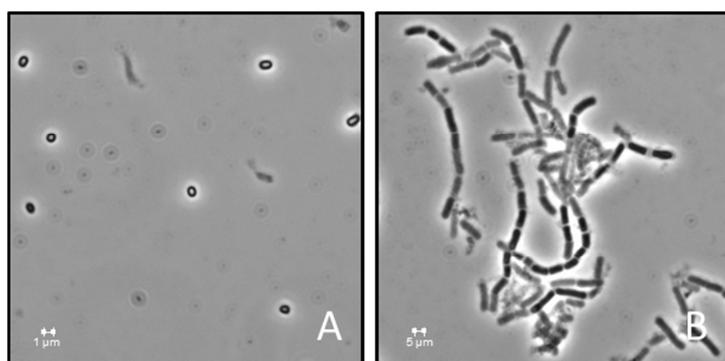


Abbildung 3.5: Lichtmikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast) mit 1000-facher Vergrößerung. In einer 5 Tage alten Kultur, die in CMM bei 37°C inkubiert wurde, sind die extrem lichtbrechenden, runden Sporen von *C. botulinum* optisch gut erkennbar (A). Die vegetativen Zellen von *C. botulinum* (B) wurden in RCM bei 37°C kultiviert (Alter der Kultur 24h).

Die höchste Sporulationsrate wurde für die beiden Stämme durch Verwendung unterschiedlicher Sporulationsmedien [2.3.1] erzielt [Abbildung 3.6].

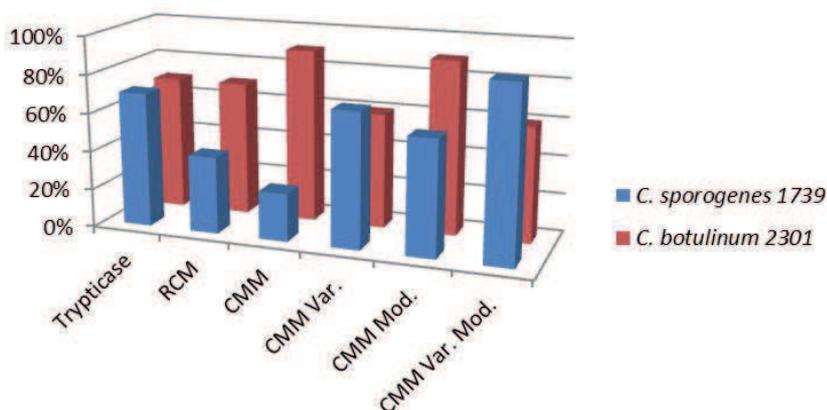


Abbildung 3.6: Sporulationsraten (in %) in verschiedenen Sporulationsmedien. Gesamtzellzahl (100%): Vegetative Zellen und Sporen.

Clostridium sporogenes sporulierte am besten in CMM Var. Mod., wohingegen *C. botulinum* in CMM Mod. die höchste Sporulationsrate aufwies [Abbildung 3.6]. Für die Generierung von Sporen wurden daher diese beiden Medien verwendet. Waren im Vergleich zur Gesamtzellzahl (100%) rund 90% Sporen, verglichen mit vegetativen Zellen, in den Sporulationsmedien vorhanden, so wurden die Sporen durch Zentrifugation geerntet und zur Reifung in SSS inkubiert. Anschließend wurden die Sporen in PBS bei 4°C gelagert [2.3.1].

3.3.2 DNS-Isolierung aus Sporen

Aufgrund der durch physikalische Eigenschaften bedingten Widerstandskraft der Sporen [1.2], wurden verschiedene Methoden zur DNS-Isolierung aus Sporen getestet. Hierfür wurden verschiedene enzymatische Schritte in Kombination mit verschiedenen Matrices (A, B, E) des DNS-Isolierungskits [2.5.1, S.49] getestet [Abbildung 3.7]. Matrix A enthielt Granatsplitter und eine 0,6 cm große Zirkoniumkugel. Matrix B bestand aus Siliziumkugeln (0,1 mm) und Matrix E bestand aus Keramikugeln (1,4 mm), Quarzkugeln (0,1 mm) und 4 mm großen Glasperlen.

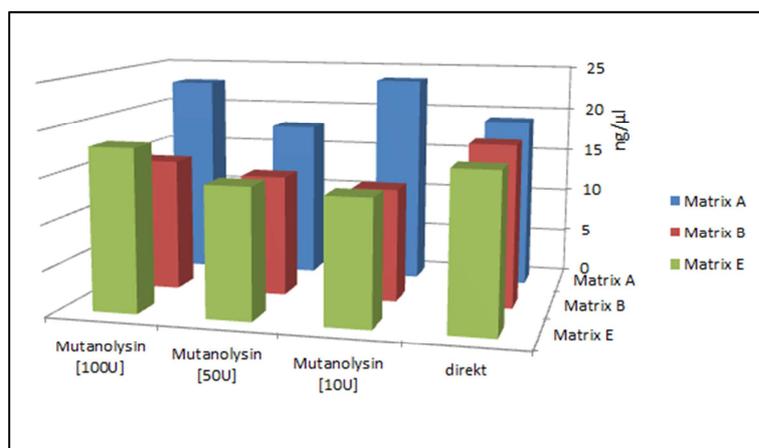


Abbildung 3.7: Enzymatische Vorbehandlung der Clostridien-Sporensuspension vor DNS-Isolierung.

Durch eine gezielte Vorbehandlung zum Abbau der Sporenhülle mit Mutanolysin wurde die Effizienz der DNS-Isolierung erhöht. Die Ausbeute an DNS aus Sporen konnte zudem durch den Einsatz verschiedener Matrices zum mechanischen Aufschluss der Zellen gesteigert werden. Wie aus Abbildung 3.7 deutlich wird, zeigte die Verwendung von Matrix A in Kombination mit einer Vorbehandlung mit Mutanolysin (10 U) zur DNS-Isolierung aus Sporen die besten Ergebnisse.

3.3.3 Widerstandsfähigkeit der Sporen

Um eine Inaktivierung des biologischen Materials zu gewährleisten und in Inokulationsexperimenten sicher mit Clostridien arbeiten zu können, wurden folgende Versuche durchgeführt.

Fixierung

Präparate wurden entweder mit PFA_{4%} oder EtOH_{50%} fixiert [2.5.11]. Nach monatelanger Lagerung bei -22°C in EtOH_{50%} wurden diese zur Überprüfung der Inaktivierung in Medium überführt und für 48 h unter optimalen Bedingungen inkubiert. Es zeigte sich bei allen Ansätzen ein Übergang der fixierten Kulturen in eine vegetative Wachstumsphase [Abbildung 3.8].

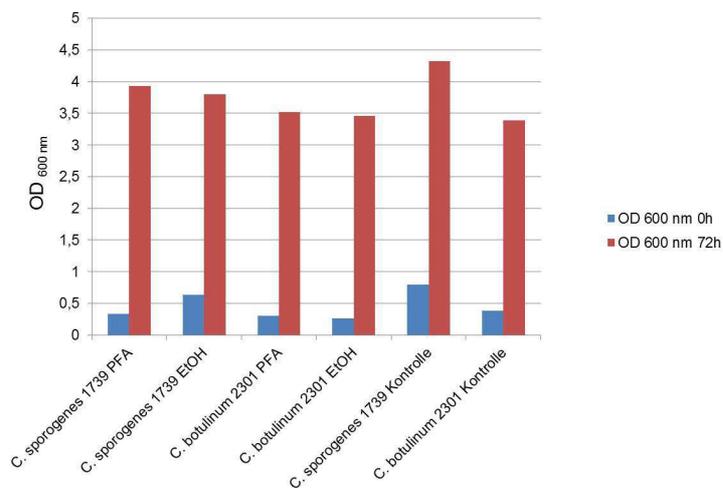


Abbildung 3.8: Nachdem fixierte Reinkulturen von *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* bei -22°C in $\text{EtOH}_{50\%}$ gelagert waren, wurden diese in RCM angeimpft und bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurde das Wachstum über die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ bestimmt. In jedem Ansatz waren die fixierten Kulturen in der Lage in eine vegetative Wachstumsphase überzugehen.

Durch eine Fixierung mit EtOH oder PFA werden die vegetativen Zellen inaktiviert. Fixierte Sporen können jedoch nach Überführung in Medium und anaerober Inkubation [Abbildung 3.8, rot, 72 h] auskeimen, in die vegetative Lebensform übergehen und proliferieren. Eine Fixierung genügt daher nicht, um Sporen abzutöten [Abbildung 3.8].

Desinfektion

Zur Abtötung von vegetativen Zellen und auch evtl. vorhandenen Clostridien-Sporen sind mehrere Methoden anwendbar. Zum einen eine Desinfektion mit speziellen sporoziden Desinfektionsmitteln wie Lysoformin (Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin, Deutschland) oder Bacillol (Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland) und zum anderen die Anwendung von Dampfsterilisation (Autoklavieren). Angereicherte Kulturen bzw. Sporensuspensionen der beiden Clostridien-Stämme wurden für unterschiedliche Verweilzeiten mit verschiedenen Desinfektionsmitteln inkubiert [Tabelle 3.1] und im Anschluss in RCM überführt.

Tabelle 3.1: Einwirkdauer der Desinfektionsmittel auf Sporensuspensionen.

+: Wachstum; -: kein Wachstum

	5 min	10 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h
Lysoformin (10%)	+	+	+	-	-	-	-
Bacillol	+	+	+	+	-	-	-

Nach einer Einwirkdauer der Desinfektionsmittel von 2 h waren die Kulturen und evtl. darin enthaltene Sporen in keiner getesteten Probe mehr in der Lage, unter optimalen Bedingungen zu keimen und zu wachsen. Da der Einsatz von Lysoformin (10%) innerhalb einer kürzeren Inkubationszeit (nach 1 h) zur Abtötung der Kulturen führte [Tabelle 3.1], wurde dieses zur Desinfektion verwendet.

Autoklavieren

Sporensuspensionen wurden bei 121°C für 20 min bzw. 34 min bei 1 atm Überdruck autoklaviert und im Anschluss angereichert. Nach Inkubation bei 37°C über mehrere Tage konnte in keiner Probe ein Wachstum festgestellt werden. Dies zeigt, dass durch den Vorgang des Autoklavierens die Kulturen einschließlich evtl. vorhandener Sporen abgetötet werden und nicht mehr in vegetative Zellen übergehen können.

3.4 Diagnostische PCR zur Detektion von Clostridien

Für den spezifischen molekularbiologischen Nachweis der inokulierten Clostridien innerhalb des Pflanzenmaterials mittels PCR wurden Polymerasen verschiedener Hersteller (Bioron, *TopTaq*, *Amplitaq*) in Kombination mit verschiedenen Primer-Paaren [Tabelle 2.10] verwendet. Die PCR gestützten Nachweissysteme wurden hinsichtlich der Variation der MgCl₂-Konzentration im Reaktionsansatz und der Annealing-Temperatur optimiert und auf das verwendete PCR System angepasst. Die Detektionsgrenzen für das *bont* D-Gen bzw. die 16S-rDNS wurden durch Einsatz verschiedener DNS Konzentrationen ermittelt.

3.4.1 Detektionslimit der verschiedenen PCR Systeme

Es wurden jeweils die gleichen DNS-Konzentrationen der gleichen Zellzahlen eingesetzt. Mit dem PCR-System *Amplitaq* war keine Amplifikation erfolgreich. Abbildung 3.9, 3.10, 3.11 zeigt die unterschiedliche Sensitivität der zwei getesteten Systeme (A: Bioron; B: *TopTaq*) bezüglich der verschiedenen Detektionssysteme.

3.4.1.1 Nachweis durch 16S-rDNS als Zielgen

Aufgrund der 16S-rDNS als Zielgen kann auf die Gattung *Clostridium* mittels des Primerpaares P930/P932 getestet werden [2.6.1]. Allerdings ist hiermit kein eindeutiger Nachweis der inokulierten Clostridien-Stämme möglich, da beispielsweise im Bodensystem auch natürlich vorkommende Stämme erfasst und nachgewiesen werden, wodurch falsch positive Ergebnisse auftreten können. Abbildung 3.9 zeigt das Ergebnis einer 16S-rDNS-PCR (P930/P932).

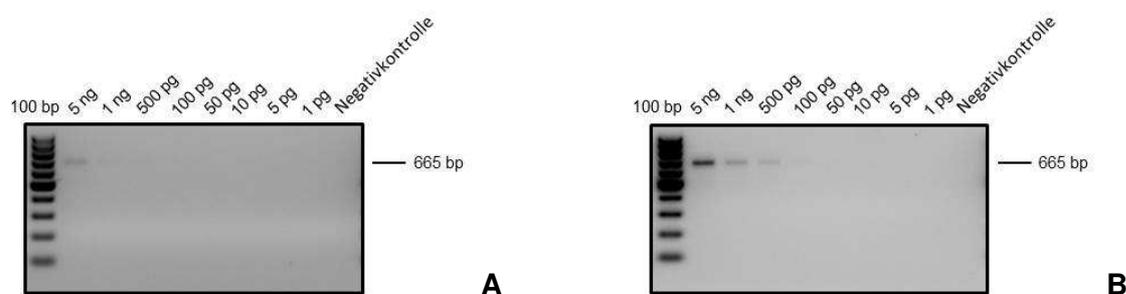


Abbildung 3.9: Nachweis von Clostridien durch 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp).
A: PCR-System Bioron. B: PCR-System *TopTaq*.

Das Detektionslimit der 16S-rDNS-PCR lag für das PCR System von Bioron bei **1 ng** [Abbildung 3.9 A]. Mit dem PCR-System von *Qiagen* (*TopTaq*) war die Sensitivität des Nachweises durch Amplifikation höher und lag bei **100 pg** [Abbildung 3.9 B].

Die niedrigste nachweisbare Menge an DNS von Clostridien, die erkennbare Amplifikationsprodukte auf einem Agarosegel nach horizontaler Gelelektrophorese zeigte, lag mit dem Primerpaar P930/P932 bei **100 pg**.

3.4.1.2 Nachweis des *bont D*-Gens von *C. botulinum*

Der *C. botulinum*-Stamm kann durch zwei verschiedene PCR Systeme zur Amplifikation von Fragmenten des für das *bont D* kodierenden Toxin-Gens detektiert werden [2.6.2]. Zum einen mit der Nachweismethode nach Takeshi (BoNT D-PCR) (Takeshi *et al.*, 1996) [2.6.2.1], zum anderen mit der BoNT/CD-Multiplex-PCR [2.6.2.2].

3.4.1.2.1 BoNT D-PCR

Das durch das Primerpaar DS11/DS22 amplifizierte *bont D*-Genfragment weist eine Größe von 497 bp auf. Wie in Abbildung 3.10 zu sehen ist, kann das *bont D*-Gen mittels BoNT D-PCR [2.6.2.1] nachgewiesen werden.

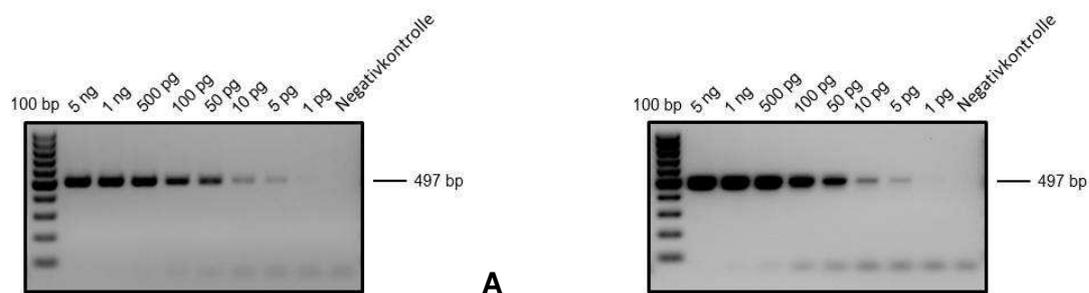
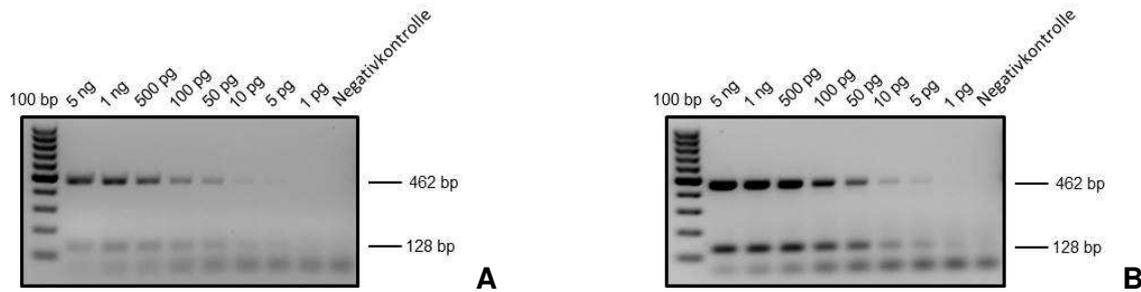


Abbildung 3.10: BoNT D-PCR: Nachweis von *bont D* (DS11/DS22: 497 bp) nach Takeshi *et al.*, 1996.
A: Detektionslimit PCR-System Bioron. B: Detektionslimit PCR-System *TopTaq*.

Durch das Färben der Amplifikationsprodukte nach erfolgter horizontaler Gelelektrophorese mittels eines Agarosegels konnten **5 pg** DNS detektiert werden, was in etwa **1650 Zellen** entspricht. Das Detektionslimit der BoNT D-PCR war für beide Systeme gleich. Die Sensitivität der PCR war somit vergleichbar mit der von Takeshi *et al.* (Takeshi *et al.*, 1996). Die Abbildung 3.10 zeigt die Sensitivität und Spezifität der BoNT D-PCR.

3.4.1.2.2 BoNT/CD-Multiplex-PCR

Mittels der BoNT/CD-Multiplex-PCR [2.6.2.2] kann *bont D* ebenfalls nachgewiesen werden. Der in dieser Arbeit verwendete *C. botulinum*-Stamm zeigt eine Doppelbänderung auf einer Laufhöhe von 462 bp bzw. 128 bp [Abbildung 3.11] eines typischen BoNT D-Stammes.



**Abbildung 3.11: BoNT/CD-Multiplex-PCR: Nachweis von *bont D* (F2/R2: 462 bp, F4/R4: 128 bp).
A: Detektionslimit PCR-System Bioron. B: Detektionslimit PCR-System *TopTaq*.**

Abbildung 3.11 zeigt das Detektionslimit der BoNT/CD-Multiplex-PCR, das bei 10 pg (Bioron, [Abbildung 3.11 A]) bzw. bei 5 pg (*TopTaq*, [Abbildung 3.11 B]) lag.

Mit den PCR-Systemen beider Hersteller ([Abbildung 3.11] A: Bioron; B: Qiagen) war eine Amplifikation möglich. Das Detektionslimit lag für die BoNT D-PCR [Abbildung 3.10] bei beiden Systemen bei 5 pg und für die BoNT/CD-Multiplex-PCR [Abbildung 3.11] bei 10 pg (A: Bioron) bzw. bei 5 pg (B: *TopTaq*). **5 pg** an DNS des Toxin-produzierenden *C. botulinum*-Stammes konnten sowohl durch das BoNT/CD-Multiplex-PCR System [Abbildung 3.11] als auch durch die BoNT D-PCR mit dem Primerpaar DS11/DS22 [Abbildung 3.10] detektiert werden.

Die Nachweisgrenze unterschied sich bei den eingesetzten Detektionssystemen (16S-rDNS-PCR, BoNT D-PCR und BoNT/CD-Multiplex-PCR). Mit dem PCR-System von *Qiagen* war die Sensitivität des Nachweises durch Amplifikation etwas höher. Daher wurde das *TopTaq* PCR-System für den Nachweis der Clostridien eingesetzt. Unterhalb der Detektionsgrenzen konnte eine eingesetzte Menge an DNS nicht mehr nachgewiesen werden.

Eine Datenbankrecherche zeigte, dass Regionen im Chloroplasten- und Mitochondriengenom von Weißklee in nur einer einzigen Base in der Zielsequenz der Detektionsprimer abwichen. Um daher die korrekte Amplifikation des jeweiligen bakteriellen Zielgenes zu überprüfen, wurden die Amplifikationsprodukte sequenziert [2.5.8].

3.4.2 Detektionslimit bei Anwesenheit von pflanzlicher DNS

Der eventuell auf die Sensitivität bzw. Nachweisgrenze der PCR Systeme störende Einfluss von pflanzlicher DNS und eventuell PCR-inhibierender Substanzen, die durch die DNS-Isolierung angereichert wurden, wurde getestet. Hierzu enthielt jeder Ansatz, neben einer definierten Menge bakterieller DNS, zusätzlich 200 ng reine Pflanzen-DNS.

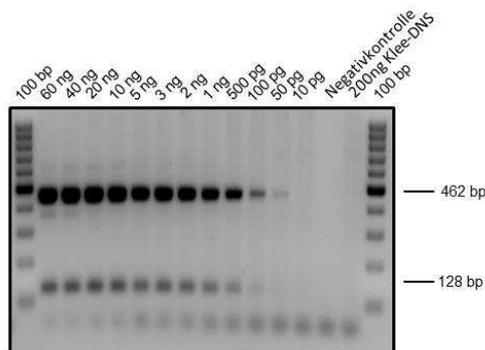


Abbildung 3.12: Detektionslimit BoNT/CD-Multiplex-PCR mit je 200 ng pflanzlicher DNS pro Reaktionsansatz (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp).

Abbildung 3.12 zeigt den Einfluss von Pflanzen-DNS im Reaktionsansatz. Die Sensitivität der BoNT/CD-Multiplex-PCR nimmt um den Faktor 10 ab (vgl. [Abbildung 3.11]). Das Detektionslimit liegt mit pflanzlicher DNS bei 50 pg DNS. Die Anwesenheit pflanzlicher DNS schränkt somit den spezifischen Nachweis des *bont* D-Gens ein.

3.4.3 Schwierigkeiten beim Nachweis des *bont* D Toxin-Gens

Das *bont* D-Gen kann nicht immer in allen Kulturen nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3.13 zu sehen ist, ist dies in diesem Experiment bei nur 80% der Kolonien möglich.

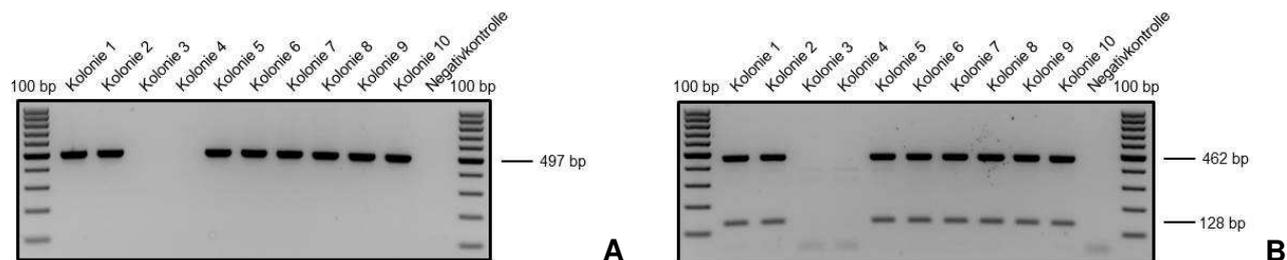


Abbildung 3.13: Nachweis von *bont* D in auf Platte gewachsenen Einzelkolonien.

A: BoNT D-PCR (DS11/DS22: 497 bp).

B: BoNT/CD-Multiplex-PCR (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp).

In Abbildung 3.13 wurden 10 auf Platte gewachsene Einzelkolonien auf die Anwesenheit von *bont* D getestet. Bei den auf festem Kulturmedium gewachsenen Einzelkolonien 3 und 4 ist das Toxin-Gen nicht nachweisbar [Abbildung 3.13]. Da das Toxin-Gen in Typ C und Typ D-Stämmen nicht chromosomal im Genom des Bakteriums kodiert ist, sondern extrachromosomal Phagen-kodiert vorliegt [1.5], zeigt sich eine Instabilität bezüglich der Anwesenheit. Möglicherweise ging es während der Kultivierung nach wiederholter Passagierung der Kulturen verloren. Ein Verlust des Phagen und somit auch des Toxin-Gens kann unterschiedlich häufig auftreten. Wird beispielsweise eine Glycerinkultur aus -80°C auf festem Kulturmedium ausgestrichen, so ist z.T. in den anwachsenden Einzelkolonien kein Nachweis des Toxins möglich [Abbildung 3.13, 3.14].

Abbildung 3.14 A zeigt den Nachweis des Toxin-Gens in 14 Einzelkolonien nach 10 Tagen Inkubationszeit, die auf festem Kulturmedium gewachsen sind. In den Kolonien 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 13 und 14 ist kein Toxin-Gen nachweisbar. In den restlichen Einzelkolonien (3, 4, 8, 10 und 12) ist das Toxin-Gen detektierbar.

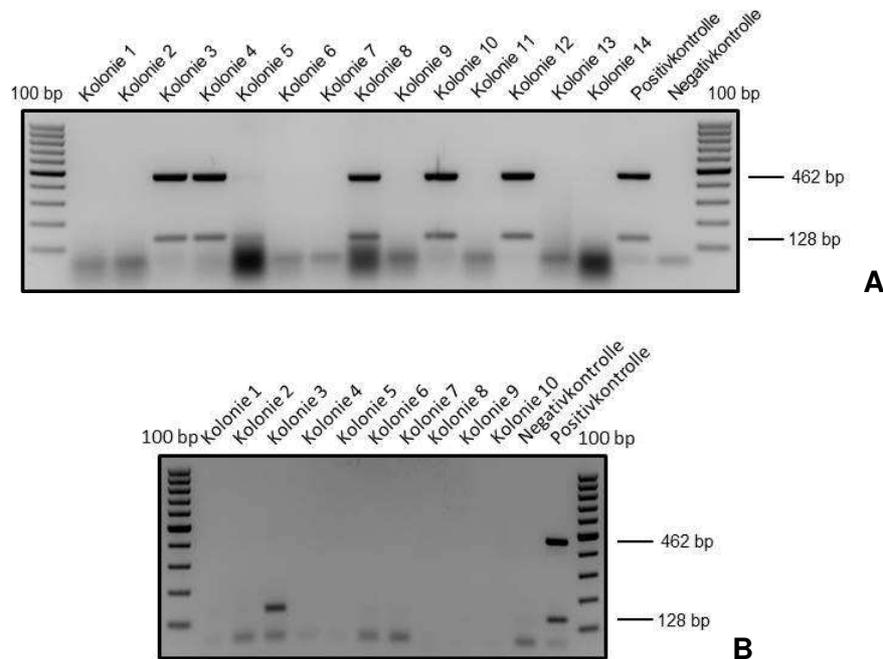


Abbildung 3.14: Nachweis des Toxin-Gens (*bont D*) (F2/R2: 462 bp, F4/R4: 128 bp) in Einzelkolonien, die auf festem Kulturmedium gewachsen sind.
A: 10 Tage Wachstum; B: 4 Wochen Wachstum.

Abbildung 3.14 B zeigt, dass alle Einzelkolonien nach ca. 4 Wochen Wachstum auf **festem Kulturmedium** das Toxin-Gen verloren haben. Je länger die Kulturen auf festem Kulturmedium gewachsen sind, desto geringer war offensichtlich die Nachweisbarkeit des Toxin-Gens. Daher wurden die aus der Glycerinkultur ausgestrichenen und auf festem Kulturmedium gewachsenen Einzelkolonien des Toxin-produzierenden Stammes stets vor Verwendung mittels der BoNT D-PCR bzw. der BoNT/CD-Multiplex-PCR hinsichtlich des Vorhandenseins des Toxin-Gens überprüft. War das Toxin-Gen nachweisbar, so wurden die Einzelkolonien in Flüssigmedium angeimpft und kultiviert.

Wurde *C. botulinum* 2301 jedoch in **Flüssigkultur** über einen längeren Zeitraum kultiviert, so war das Toxin-Gen auch nach mehreren Passagen stets eindeutig nachweisbar [Abbildung 3.15, 3.16]. Eine Flüssigkultur (RCM) wurde über 8 Wochen insgesamt 16-mal in neues Medium überimpft. Gleichzeitig wurde jeweils aus der zu überimpfenden Kultur DNS isoliert. Anschließend wurde auf die Anwesenheit von Clostridien mittels 16S-rDNS-PCR [Abbildung 3.15 A] getestet und versucht, das Toxin-Gen mittels BoNT/CD-Multiplex-PCR [Abbildung 3.15 B] zu detektieren.

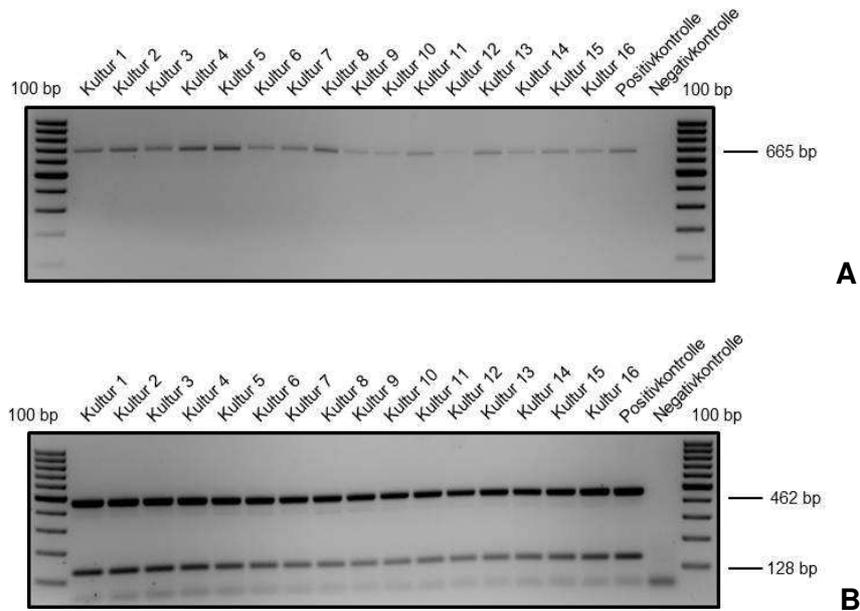


Abbildung 3.15: Nachweis von Clostridien nach 16-maligem Überimpfen.

A: 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp).

B: *bont D* (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp).

Wie in Abbildung 3.15 zu sehen ist, kann auch nach 16-maligem Überimpfen *C. botulinum* sowohl mittels 16S-rDNS-PCR (A) als auch auf Toxin-Ebene mittels BoNT/CD-Multiplex-PCR (B) konstant nachgewiesen werden. Durch wiederholtes Subkultivieren in Flüssigkultur, zeigte sich kein Verlust des Toxin-Gens und ein Nachweis war selbst nach mehreren Passagierungen möglich [Abbildung 3.15]. Da sich auf festem Kulturmedium nach ca. 4 Wochen in keiner einzigen Einzelkolonie das Toxin nachweisen ließ [Abbildung 3.14 B], wurde getestet, ob sich auch nach längerer Inkubation der Flüssigkulturen das Toxin-Gen noch detektieren lässt. Hierzu wurde in einer Langzeitkultur nach unterschiedlichen Tagen je ein Aliquot entnommen, daraus DNS isoliert und anschließend mittels PCR auf das Vorhandensein der Clostridien (16S-rDNS) und des Toxin-Gens (BoNT/CD-Multiplex-PCR) getestet.

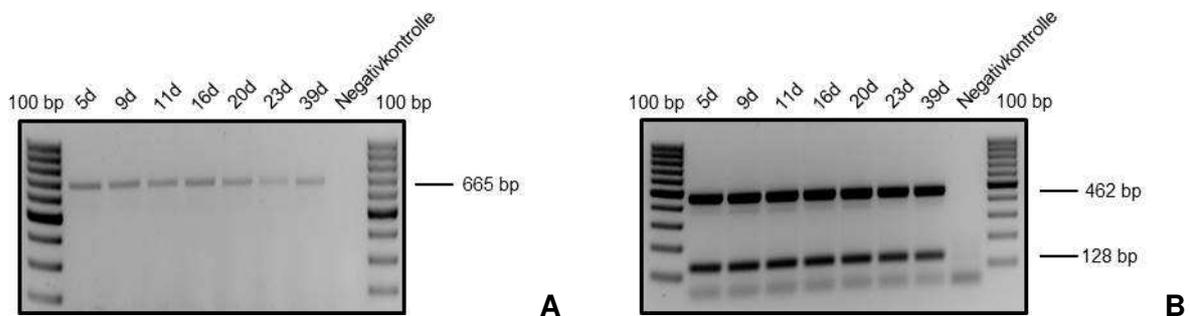


Abbildung 3.16: Nachweis von *C. botulinum* zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb einer Kultur.

A: 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp).

B: *bont D* (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp).

Wie aus Abbildung 3.16 hervorgeht, ist stets ein eindeutiger Nachweis der Clostridien (A) und des Toxin-Gens (B) in der Flüssigkultur, selbst nach 39 Tagen, möglich.

Da als Kulturmedium RCM verwendet wurde, fand eine Sporulation nur zu einem geringen Prozentsatz statt. Dies ermöglichte eine problemlose Isolierung der DNS.

3.4.4 Einfluss der Sporenbildung auf den Nachweis des *bont D*-Gens

Aufgrund der extremen Widerstandsfähigkeit der Sporenhülle, kann aus Sporen mit der eingesetzten Extraktionsmethode nur sehr wenig bis keine DNS isoliert werden, wodurch bei hoher Sporulationsrate im Medium keine Detektion möglich [Abbildung 3.17 A] war.

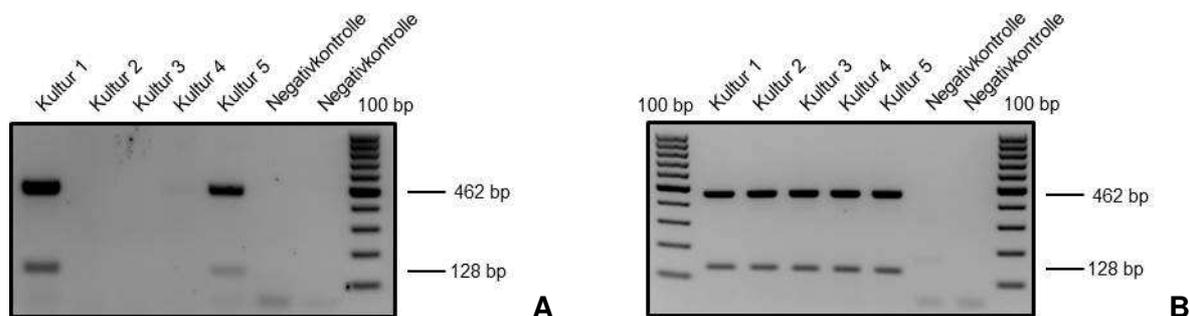


Abbildung 3.17: Detektion von *bont D* (F2/R2: 462 bp, F4/R4: 128 bp) in Sporensuspensionen.
A: nach abgeschlossener Sporulation.
B: nach erneuter Anreicherung.
 1: RCM, 2: CMM Mod., 3: CMM $\frac{1}{2}$ Mod., 4: CMM H₂O, 5: CMM $\frac{1}{2}$ H₂O.

In Kultur 1 (RCM) und Kultur 5 (CMM $\frac{1}{2}$ H₂O) war die Sporulationsrate gering. Daher gelang eine Detektion [Abbildung 3.17 A]. Bei Kultur 2 (CMM Mod.), 3 (CMM $\frac{1}{2}$ Mod.) und 4 (CMM H₂O) wurden hohe Sporulationsraten erreicht und somit war eine Detektion unmöglich [Abbildung 3.17 A]. Die vorhandenen Sporen wurden in frisches Medium überführt und gingen innerhalb von 24 h bis 48 h in die vegetative Form über, wodurch es bei allen 5 Kulturen (1 bis 5) möglich war, *bont D* nachzuweisen [Abbildung 3.17 B]. Somit ist das *bont D*-Gen im Laufe der Sporulation nicht verlorengegangen, sondern **im Sporenstadium nicht detektierbar**.

3.5 *In planta* PCR-Detektion der inokulierten Clostridien

Um eine systemische Ausbreitung von Toxin-produzierenden *C. botulinum*-Stämmen von der Wurzel in verschiedene Pflanzenkompartimente zu überprüfen, wurde ein spezifischer PCR-basierter Ansatz verwendet [2.6]. Mit dieser Methode war es möglich, bakterielle DNS sowohl in der Wurzel, als auch im Spross zu detektieren. Nach Abschluss der jeweiligen ca. 4-wöchigen Wachstumsphasen wurden die inokulierten Pflanzen geerntet [2.4.6]. Für die Detektion der inokulierten Bakterien im Pflanzenmaterial wurde aus den Pflanzenproben DNS isoliert [2.5.1] und mittels PCR gestütztem Nachweis [2.6] untersucht. Um die inokulierten Bakterien direkt im Pflanzenmaterial nachzuweisen, wurden verschiedene Methoden gewählt [2.4.6].

3.5.1 Detektion ohne Aktivierung/Anreicherung der Clostridien

Nach Stickstoffaufschluss des Pflanzenmaterials wurde unmittelbar DNS isoliert und als Matrize in die PCR-Reaktionen zur Detektion der inokulierten Clostridien eingesetzt [Abbildung 3.18].

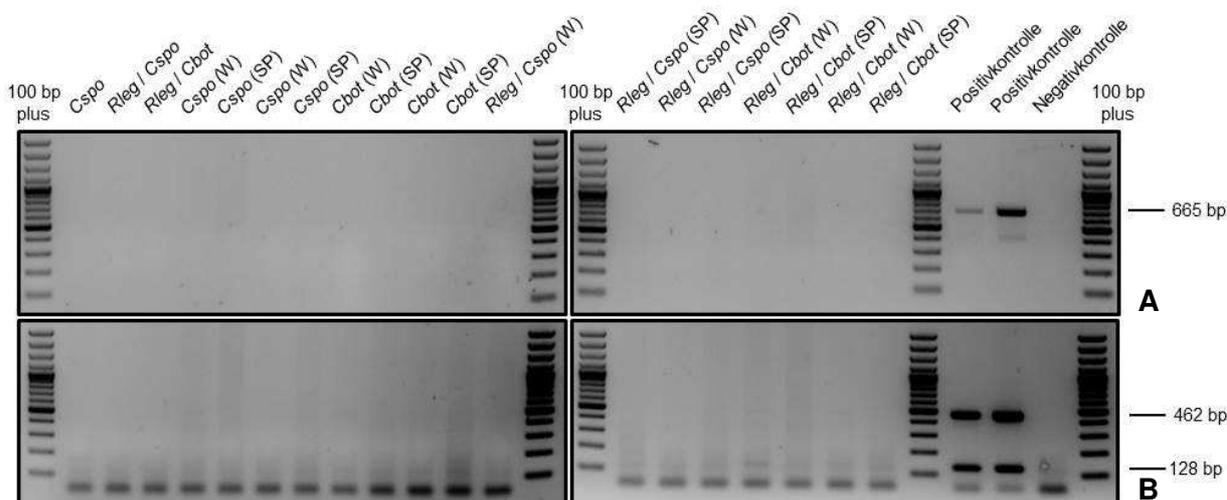


Abbildung 3.18: Detektion der bakteriellen DNS nach Aufschluss des Pflanzenmaterials mit Flüssigstickstoff und anschließender DNS-Isolierung. SP: Spross; W: Wurzel. Cbot: *C. botulinum*; Cspo: *C. sporogenes*; Rleg: *R. leguminosarum*.
A: 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp).
B: *bont D* (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp).

Durch eine direkte Isolierung der bakteriellen DNS aus mit Flüssigstickstoff aufgeschlossenem Pflanzenmaterial konnten jedoch in keinem der verschiedenen Detektionsansätze [2.6], weder in der Wurzel (W) noch im Spross (SP), Amplifikate erhalten werden. Eine Detektion der inokulierten Bakterien mittels der extrahierten DNS war nicht möglich [Abbildung 3.18]. Daher wurde diese Methode durch eine vorgeschaltete spezifische Anreicherung/Aktivierung der Clostridien in RCM für 24 h – 48 h bei 37°C, wie unter 2.4.6 beschrieben, modifiziert.

3.5.2 Detektion nach spezifischer Aktivierung/Anreicherung der Clostridien

Da eine Detektion der inokulierten Bakterien in extrahierter DNS aus Pflanzen ohne vorgeschaltete Anreicherung von *C. botulinum* zu keinem Ergebnis führte [Abbildung 3.18], wurde das Pflanzenmaterial nach der Ernte in RCM überführt und für 24 h - 48 h bei 37°C anaerob inkubiert [2.4.6]. Es wurde zunächst ermittelt, ob eine DNS-Isolierung aus den Bakterienkulturen für eine erfolgreiche Detektion notwendig ist, oder der Einsatz der Bakterienkultur als DNS-Matrize in einer PCR genügt. Abbildung 3.19 zeigt die Detektion der inokulierten Clostridien nach Anreicherung.

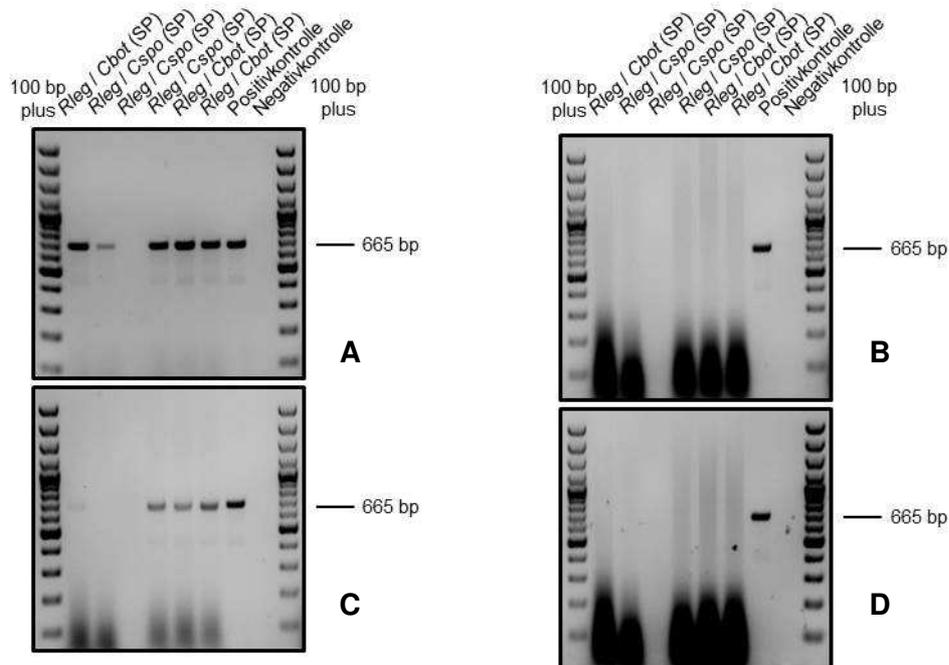


Abbildung 3.19: Detektion der Clostridien mittels 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp). SP: Spross.
Cbot: *C. botulinum*; *Cspo*: *C. sporogenes*; *Rleg*: *R. leguminosarum*.
 A: 1 µl DNS. B: 1 µl Kultur C: 5 µl Kultur D: 5 µl einer in PBS gewaschenen Kultur.

Wurde die bewachsene Anreicherungskultur nach 48 h direkt als Matrize in der PCR zur Detektion der bakteriellen DNS, ohne DNS-Isolierung, verwendet [Abbildung 3.19 B - D], so reduzierte sich die Detektionsrate. Daher wurde stets DNS aus den Anreicherungskulturen isoliert und in die Detektions-PCR eingesetzt [Abbildung 3.19 A].

3.5.2.1 Detektion der inokulierten Bakterien aus Weißklee im axenischen System

Wurden die inokulierten Pflanzen in einem axenischen System angezogen, so gelang sowohl in Wurzel- (W) als auch in Sprossmaterial (SP) die Detektion der inokulierten Bakterien [Abbildung 3.20] bei Anwendung der Anreicherungsmethode.

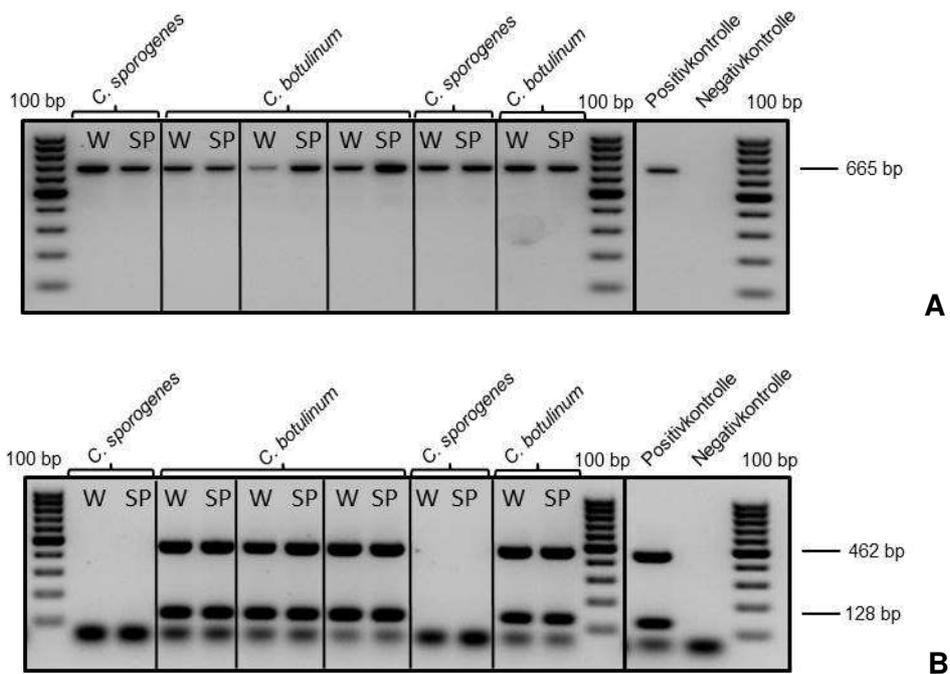


Abbildung 3.20: Detektion von *C. botulinum* in der Wurzel (W) und im Spross (SP) der inokulierten Weißklee-Pflanzen nach 4-wöchigem Wachstum im axenischen System.
A: 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp).
B: *bont D* (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp).

Wie in Abbildung 3.20 zu sehen ist, konnten die inokulierten Clostridien-Stämme (*C. sporogenes* und *C. botulinum*) in jeder Probe, sowohl in der Wurzel (W) als auch im Spross (SP) der inokulierten Pflanzen, nach 4-wöchigem Wachstum im axenischen System, nachgewiesen werden. Neben der Detektion auf 16S-rDNS-Ebene (P930/P932: 665 bp) [Abbildung 3.20 A] gelang auch der Nachweis durch Amplifikation von *bont D* (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp) [Abbildung 3.20 B].

Um zu überprüfen, ob sich die inokulierten Bakterien oberflächlich auf den Pflanzen befinden und daher abgewaschen werden können, wurden Wurzel und Spross der Pflanzen getrennt geerntet, separat gewaschen und das Washwasser angereichert. Darüber hinaus wurden auch Proben des MS-Pflanzennährmediums und des Kondenswassers entnommen und Clostridien spezifisch angereichert. Anschließend wurde aus den Anreicherungskulturen DNS isoliert und auf die Anwesenheit von Clostridien mittels PCR untersucht. Abbildung 3.21 zeigt die Detektion der inokulierten angereicherten Clostridien-Stämme.

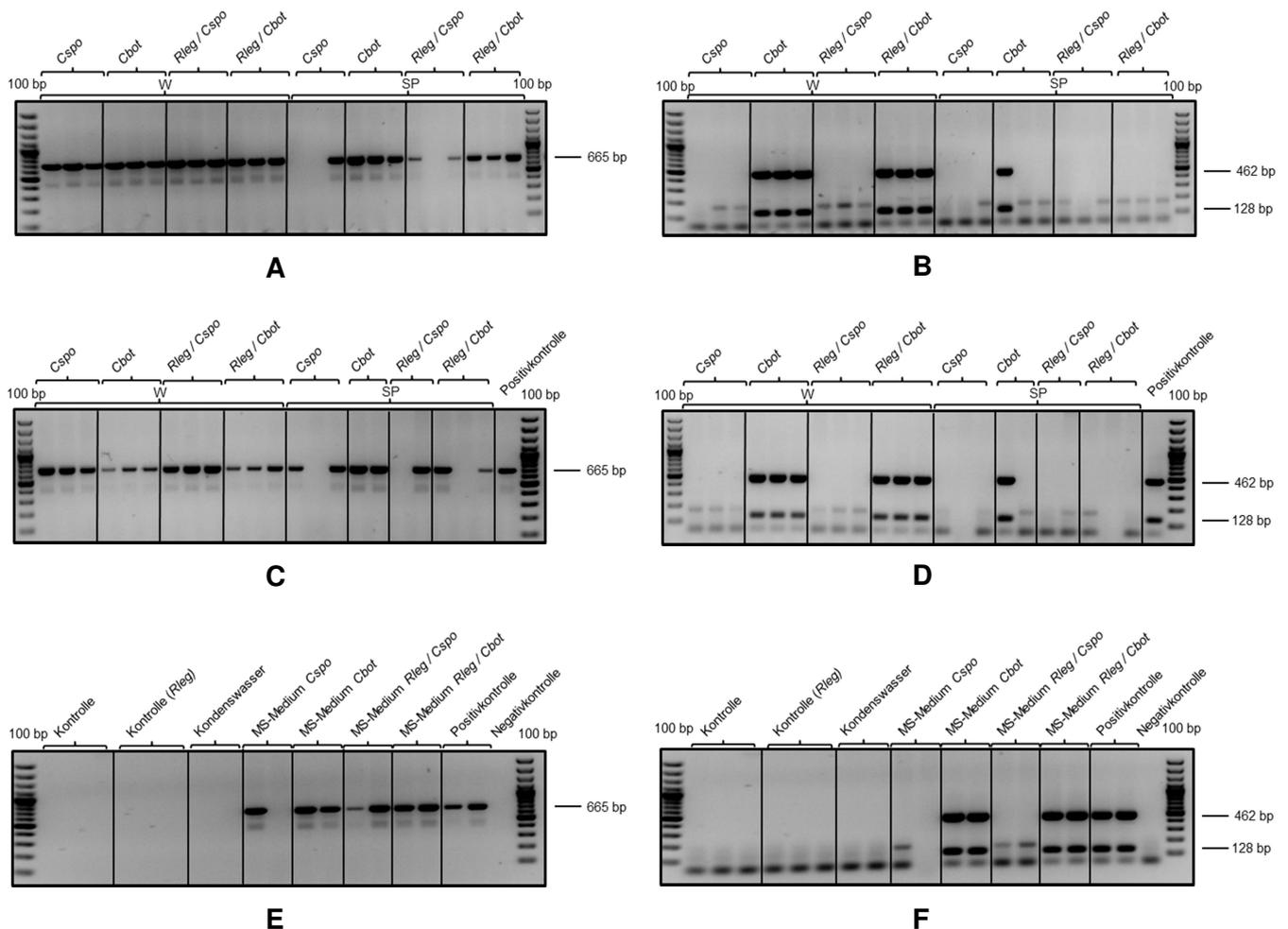


Abbildung 3.21: Detektion der bakteriellen DNS nach Anreicherung von *C. botulinum* in RCM aus Wurzelmaterial (W) bzw. Sprossmaterial (SP). Axenisches System. Cbot: *C. botulinum*; Cspo: *C. sporogenes*; Rleg: *R. leguminosarum*. A, C, E: 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp). B, D, F: *bont D* (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp). A, B: Detektion der Clostridien im Waschwasser. C, D: Detektion der Clostridien im Pflanzenmaterial nach dem Waschen. E, F: Detektion der Clostridien im Kondenswasser und MS-Medium.

Auch bei diesem Experiment konnten Clostridien in den Proben inokulierter Pflanzen nach 4-wöchigem Wachstum im axenischen System mittels der Detektion auf 16S-rDNS-Ebene (P930/P932: 665 bp) nachgewiesen werden [Abbildung 3.21 A, C, E]. In den meisten Fällen war stets eine Detektion der inokulierten Clostridien, sowohl im Waschwasser, als auch im Pflanzenmaterial, möglich. Durch die Amplifikation von *bont D* (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp) konnte *C. botulinum* nicht in jedem Ansatz [Abbildung 3.21 B, D, F] detektiert werden. In Wurzelproben (W) gelang stets der Nachweis des inokulierten *C. botulinum*-Stammes [Abbildung 3.21 A - D (W)]. In den Sprossproben (SP) war nur in einer der 2 bzw. 3 Proben *C. botulinum* nachweisbar [Abbildung 3.21 B und D SP]. In den jeweiligen Negativkontrollen und Ansätzen, die nur mit *R. leguminosarum* inokuliert wurden, sowie im Kondenswasser, konnte in keiner der getesteten Proben eine Kontamination durch Clostridien

nachgewiesen werden [Abbildung 3.21 E, F]. In den Proben des jeweiligen MS-Mediums konnten Clostridien detektiert werden [Abbildung 3.21 E, F].

In den mono-axenischen Modellsystemen konnte mittels spezifischen, optimierten PCR-Nachweisen mit aus Anreicherungskulturen isolierter DNS aus verschiedenen Teilen der Pflanzen (Wurzel bzw. Spross) gezeigt werden, dass nach einer Versuchsdauer von 4 Wochen sowohl apathogene (*C. sporogenes*) als auch pathogene Clostridien-Stämme (*C. botulinum*) sowohl die Wurzel als auch den Spross von inokulierten Weißkleepflanzen besiedeln können [Abbildung 3.20, 3.21].

3.5.2.2 Detektion der inokulierten Bakterien in im Boden gewachsenem Weißklee

Clostridium botulinum konnte in Sprossproben inokulierter Weißkleepflanzen nach 4-wöchigem Wachstum im Bodensystem (CL-T Substrat) mittels der Detektion auf 16S-rDNS-Ebene (P930/P932: 665 bp) nach Anreicherung zuverlässig nachgewiesen werden [Abbildung 3.22 A]. *Clostridium sporogenes*-Stämme wurden in einer von 4 Proben erfasst. Durch die Amplifikation von *bont* D (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp) konnte *C. botulinum* in 2 von 3 Ansätzen [Abbildung 3.32 B] detektiert werden. Sowohl die Negativkontrolle als auch das Kondenswasser zeigten keine Kontamination mit Clostridien [Abbildung 3.22].

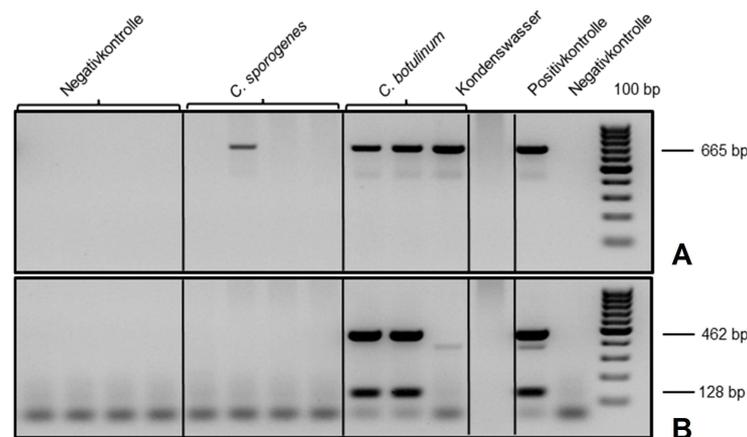


Abbildung 3.22: Detektion der Clostridien in Sprossproben von Weißklee nach Wachstum im Bodensystem (CL-T).
A: 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp); B: *bont* D (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp).

Im nachfolgenden Versuch wurden die Pflanzen, nach Abschluss der Wachstumsversuche, geerntet und angereichert. Zudem wurde aus jedem der Ansätze etwas Bodensubstrat entnommen, angereichert und auf Clostridien hin untersucht.

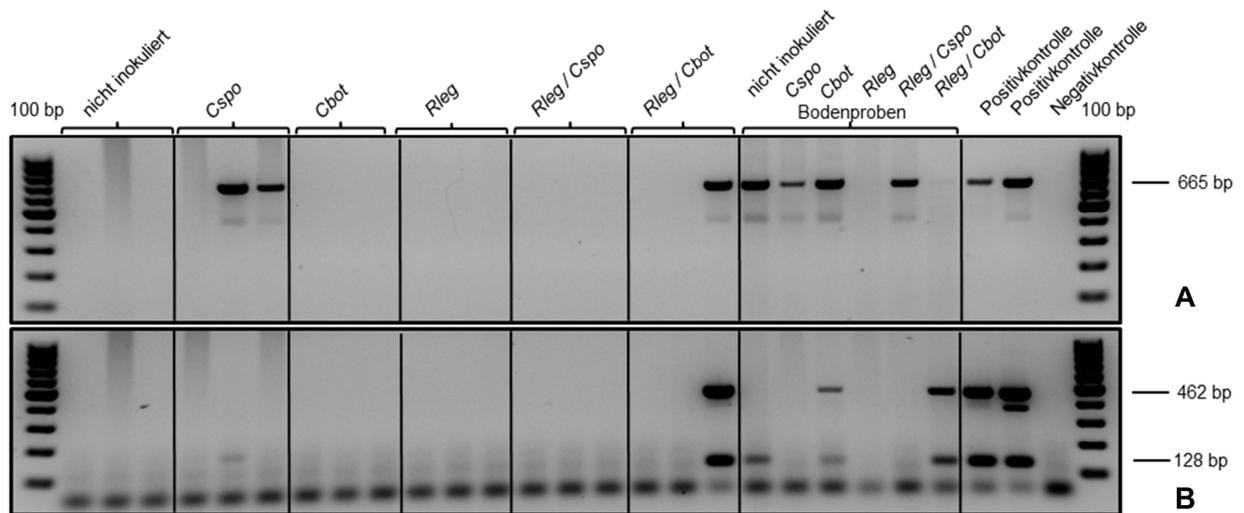


Abbildung 3.23: Nachweis von *C. botulinum* im Spross von inokulierten Pflanzen nach Anreicherung. *Cbot*: *C. botulinum*; *Cspo*: *C. sporogenes*; *Rleg*: *R. leguminosarum*.
A: 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp); B: *bont D* (F2/R2: 462 bp, F4/R4: 128 bp).

Wie in Abbildung 3.23 zu sehen ist, kann der *C. botulinum*-Stamm nur in einer von sechs Proben eindeutig nachgewiesen werden, wenn der Wurzelraum der im natürlichen Boden wachsenden Pflanzen mit Sporen inokuliert wurde. Im verwendeten Boden [Abbildung 3.23 „Bodenproben“] konnten Clostridien in 4 von 6 Proben auf 16S-rDNS-Ebene nachgewiesen werden. Da der verwendete Boden nicht sterilisiert wurde, konnten darüber hinaus auch in dem Ansatz, in dem keine Bakterien inokuliert wurden [Abbildung 3.23 „Bodenproben“, „nicht inokuliert“] Clostridien-Stämme mittels der 16S-rDNS (P930/P932) nachgewiesen werden.

In Abbildung 3.24 ist das Ergebnis einer PCR zur Detektion von *C. botulinum* in inokulierten Pflanzen gezeigt. Abbildung 3.24 A und B zeigt den Nachweis im Wurzelmaterial, Abbildung 3.24 C und D im Waschwasser der Wurzeln.

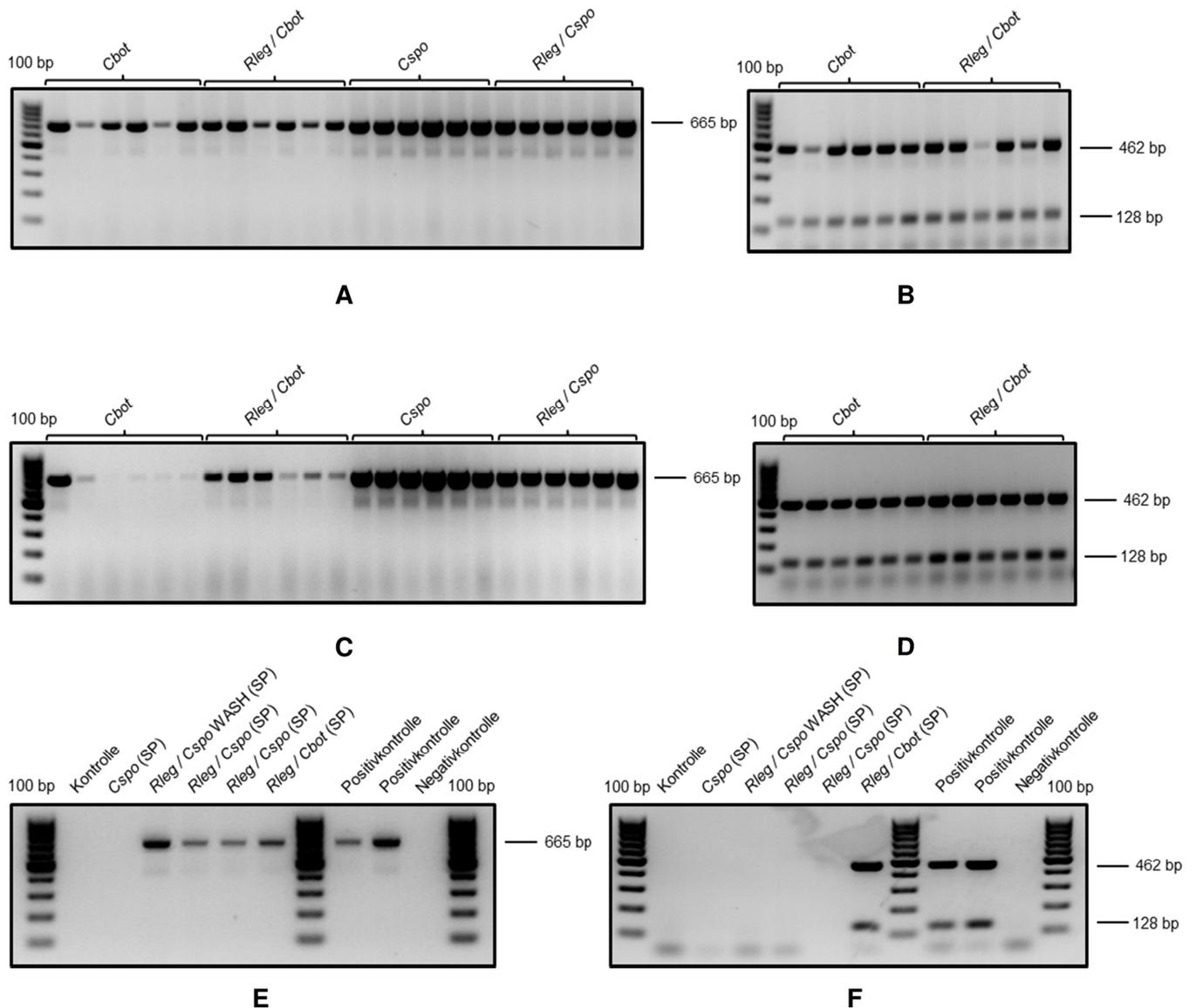


Abbildung 3.24: Detektion der bakteriellen DNS nach Anreicherung des Wurzelmaterials.

Cbot: *C. botulinum*; *Cspo*: *C. sporogenes*; *Rleg*: *R. leguminosarum*.

A, C, E: Nachweis der Clostridien 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp).

B, D, F: Nachweis von *bont* D (F2/R2: 462 bp, F4/R4: 128 bp).

A, B: Detektion der Clostridien im Wurzelmaterial.

C, D: Detektion der Clostridien im Washwasser der Wurzeln.

E, F: Detektion der Clostridien im Spross.

Um zu überprüfen, ob die inokulierten Clostridien oberflächlich lokalisiert sind und durch Waschen vom Pflanzenmaterial entfernt werden können, wurden die Pflanzen mit PBS gewaschen [2.4.6]. Wie in Abbildung 3.24 C und D zu sehen ist, gelang die Detektion der bakteriellen DNS nach Anreicherung in RCM von *C. botulinum* im Washwasser der Wurzeln. Die aus den Kulturen isolierte DNS wurde als Matrize in die PCR-Reaktionen eingesetzt. Abbildung 3.24 A und B zeigt die erfolgreiche Detektion der inokulierten Clostridien nach Anreicherung von *C. botulinum* in den Wurzeln selbst und Abbildung 3.24 C und D im Washwasser der Wurzeln. Abbildung 3.24 E und F stellt die Detektion in den Sprossproben dar. Hier konnte *C. botulinum* nur im inokulierten Ansatz detektiert werden

[Abbildung 3.24 E]. Im Waschwasser vom Spross der mit *C. botulinum* inokulierten Pflanzen wurden keine Bakterien gefunden (nicht gezeigt).

Durch Experimente in den verschiedenen Modellsystemen [2.4] und dem spezifischen, molekularbiologischen PCR-gestütztem Nachweis [2.6] mit DNS aus Anreicherungskulturen konnte gezeigt werden, dass sowohl pathogene (*C. botulinum*) als auch apathogene (*C. sporogenes*) *Clostridium*-Stämme in verschiedenen Kompartimenten von Weißklee vorkommen und zum Teil auch in pflanzlichen Geweben persistieren können. Clostridien wurden durch PCR sowohl in der Wurzel als auch im Spross der axenisch gewachsenen, inokulierten Weißkleepflanzen detektiert. Für die Detektion von *C. botulinum* wurden mit beiden Primerpaaren identische Ergebnisse erreicht. Ein Amplifikationsprodukt eines *bont* D-Fragments konnte z.T. amplifiziert werden. Durch die Verwendung von DNS, die aus Anreicherungskulturen von inokulierten Pflanzen isoliert wurde, konnte der *C. botulinum*-Stamm zuverlässig nach 4 Wochen Wachstum in Wurzeln (W) und Sprossen (SP) von Weißklee in einem axenischen System [Abbildung 3.20] sowie im Spross von Weißklee in einem Bodensystem [Abbildung 3.22] erfasst werden.

3.6 Pflanzenwachstumsfördernder Effekt

Wie sich in dem Freilandversuch zeigte, besitzt *C. botulinum* augenscheinlich die Fähigkeit, Klee in seinem Wachstum zu fördern [1.10]. Um diese Erkenntnis genauer zu untersuchen, wurden Wachstumsversuche unter kontrollierten Bedingungen im Labor durchgeführt.

Für die Inokulationsexperimente wurden Sporensuspensionen (10^5 – 10^8 Sporen pro Keimling) des nicht toxischen *C. sporogenes*-Stammes und des toxischen *C. botulinum* Typ D-Stammes eingesetzt. Vor der Inokulation der Pflanzen wurden die Clostridien-Sporen mit *R. leguminosarum* (1×10^7 CFU pro Keimling), einem Symbionten und guten Kolonisierer von Weißklee, der eine Nodulation auslöst, gemischt und auf die axenischen Keimlinge appliziert. Hierbei wurden die Wurzeln der Keimlinge zu einem Zeitpunkt inokuliert, zu dem keinerlei Sprossanlage sichtbar war. Eine Co-Inokulation mit *R. leguminosarum* wurde gewählt, weil unter natürlichen Bedingungen *R. leguminosarum* bei Weißklee die Knöllchenbildung zur N_2 -Fixierung hervorruft [1.8]. Abbildung 3.25 zeigt beispielhaft den wachstumsfördernden Effekt der inokulierten Clostridien auf Weißklee nach 4 Wochen Wachstum im Bodensystem.



Abbildung 3.25: Wachstumsfördernder Effekt der inokulierten Clostridien auf Weißklee nach 4 Wochen Wachstum im Bodensystem (Zeiller *et al.*, 2015).

A: Inokulation mit *R. leguminosarum* (Negativkontrolle).

B: Inokulation mit *C. botulinum* und *R. leguminosarum*.

C: Inokulation mit *C. sporogenes* und *R. leguminosarum*.

Wie auch im Feldversuch [1.10], zeigten sich bei Weißklee (und Weidelgras [Abbildung 3.28]) vor allem bei den mit *C. botulinum* / *R. leguminosarum* inokulierten Pflanzen optische Unterschiede im Wachstum [Abbildung 3.25]. Der Wachstumsunterschied tritt sowohl bei der Wurzel als auch beim Spross auf. So ist das Wurzelsystem größer, die Wurzeln sind länger und auch die Anzahl der Wurzeln und deren Verzweigungen sind erhöht. Der Spross inokulierter Pflanzen ist größer (Sprossgröße) und schwerer (Feucht- und Trockengewicht), trägt größere Blätter und insgesamt wirken die Pflanzen vitaler (satteres Blattgrün), was sich wiederum in einer höheren Biomasse widerspiegelt [Abbildung 3.25]. Die sowohl bei Weidelgras als auch bei Weißklee durch Clostridien-Inokulation auftretenden optischen Wachstumsunterschiede [Abbildung 3.25] wurden hinsichtlich einer Signifikanz ($p < 0.05$) untersucht. Die Abbildung 3.26, 3.27, 3.28 zeigen jeweils signifikante Wachstumsunterschiede zwischen den *C. botulinum* und *C. sporogenes* inokulierten Pflanzen. Der signifikante pflanzenwachstumsfördernde Effekt von *C. botulinum* auf Weißklee und Weidelgras wurde nach 4 Wochen Wachstum im Bodensubstrat festgestellt.

3.6.1 Axenisches Pflanzsystem

Zunächst wurden in einem mono-axenischen System Keimlinge von Weißklee angezogen, die mit je 1 ml Bakteriensuspension (*C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* 10^5 - 10^8 /ml, *R. leguminosarum* 10^7 /ml) beimpft waren [Abschnitt 2.4.2]. Die inokulierten Keimlinge [2.4.4] wuchsen ca. 4 Wochen in einer Phytokammer unter definierten Klimabedingungen [Tabelle 2.5]. Das Substrat bestand aus feinkörnigem, autoklaviertem Quarzsand. Als Nährmedium wurde MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) verwendet. Im axenischen Pflanzsystem zeigte sich auch nach wiederholten Versuchen mit unterschiedlichen Inokulationsdosen und der Verwendung von Sporen oder vegetativen Zellen **kein** signifikanter Wachstumsunterschied bei den Weißkleepflanzen in Abhängigkeit von einer Inokulation.

3.6.2 Bodensysteme

Um Pflanzen unter möglichst natürlichen Bedingungen zu kultivieren, wurden Keimlinge in verschiedene Bodensubstrate eingepflanzt [2.4.3] und mit einer definierten Menge an Bakterien (*C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* 10^5 - 10^8 /ml, *R. leguminosarum* 10^7 /ml) [2.4.4] inokuliert. Für die wachstumsstimulierenden Effekte erwies sich die CL-T Topferde als optimal. Weißkleekeimlinge wurden sowohl mit Sporen der Clostridien (10^6 /ml) als auch mit Rhizobien (10^7 /ml) inokuliert. Die Negativkontrolle wurde nur mit Rhizobien inokuliert. Abbildung 3.26 zeigt einen signifikanten Unterschied bezüglich des Wachstums zwischen den mit Clostridien inokulierten Pflanzen und den Kontrollpflanzen. Die statistische Berechnung der Signifikanz erfolgte mit der Software *graph Pad Prism* [2.4.7].

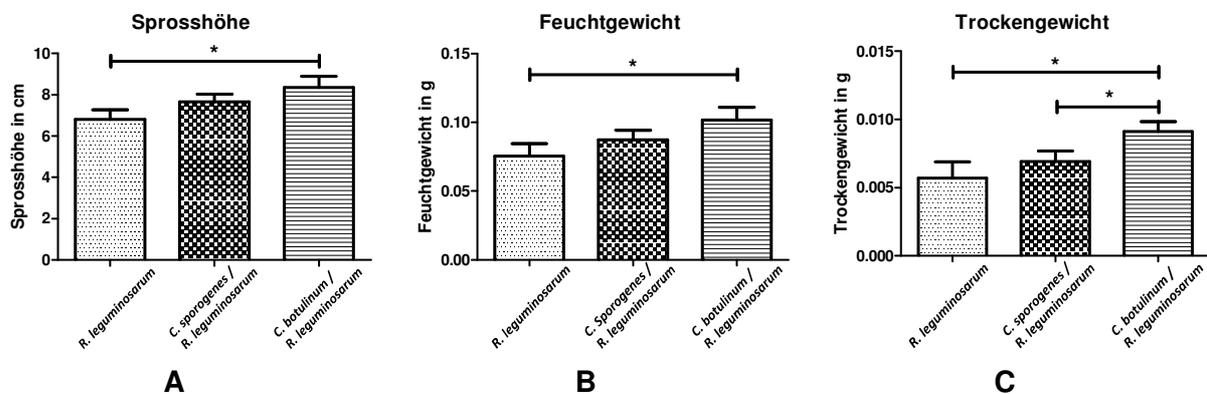


Abbildung 3.26: Pflanzenwachstumsfördernder Effekt der Clostridien auf Weißklee im natürlichen Bodensystem mit Topferde (CL-T) nach 4 Wochen Wachstum. Die Pflanzen wurden mit Sporen von *C. sporogenes* bzw. *C. botulinum* (10^6) zusammen mit *R. leguminosarum* (10^7) inokuliert.

Cbot: *C. botulinum*; *Cspo*: *C. sporogenes*; *Rleg*: *R. leguminosarum*.

*: Signifikanz ($p < 0,05$).

A: Sprosshöhe in cm (*Rleg* / *Rleg* & *Cbot*: $p = 0,0348$).

B: Feuchtgewicht in g (*Rleg* / *Rleg* & *Cbot*: $p = 0,0463$).

C: Trockengewicht in g (*Rleg* / *Rleg* & *Cbot*: $p = 0,0281$;

Rleg & *Cspo* / *Rleg* & *Cbot*: $p = 0,0458$).

Wie aus Abbildung 3.26 hervorgeht, zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den mit *C. botulinum* inokulierten Weißkleepflanzen und den Kontrollpflanzen sowohl in der Größe der Pflanzen [Abbildung 3.26 A] als auch im Feucht- [Abbildung 3.26 B] und Trockengewicht [Abbildung 3.26 C] des Sprosses. Beim Trockengewicht war auch der Inokulationseffekt von *C. sporogenes* signifikant ($p < 0,05$). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Inokulation mit *R. leguminosarum* / *C. sporogenes* und *R. leguminosarum* / *C. botulinum*.

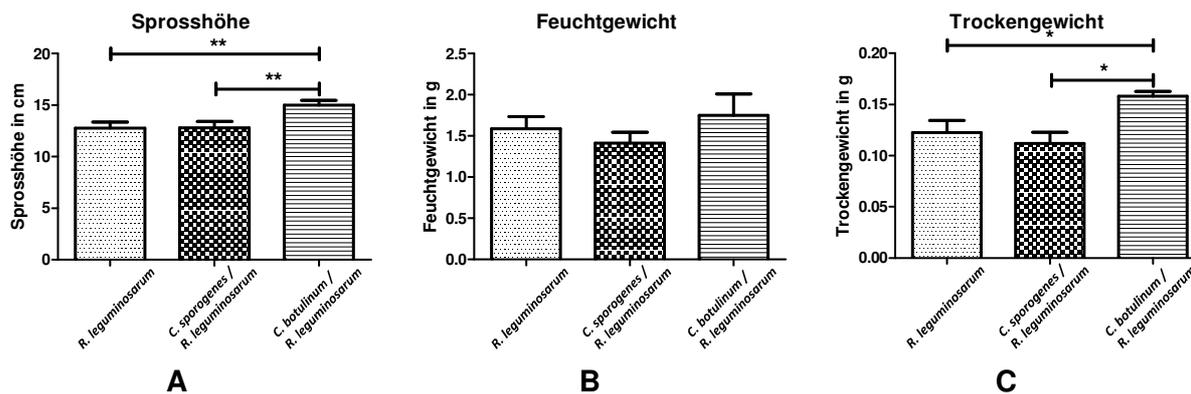


Abbildung 3.27: Pflanzenwachstumsfördernder Effekt der Clostridien auf Weißklee im natürlichen Bodensystem (CL-T) nach 4 Wochen Wachstum. Die Pflanzen wurden mit Sporen von *C. sporogenes* bzw. *C. botulinum* (10^8) zusammen mit *R. leguminosarum* (10^7) inokuliert. *Cbot*: *C. botulinum*; *Cspo*: *C. sporogenes*; *Rleg*: *R. leguminosarum*.

*: Signifikanz ($p < 0,05$); **: Signifikanz ($p < 0,005$).

A: Sprosshöhe in cm (*Rleg* / *Rleg* & *Cbot*: $p = 0,0048$;

Rleg & *Cspo* / *Rleg* & *Cbot*: $p = 0,0061$).

B: Feuchtgewicht in g.

C: Trockengewicht in g (*Rleg* / *Rleg* & *Cbot*: $p = 0,0496$;

Rleg & *Cspo* / *Rleg* & *Cbo*: $p = 0,0180$).

Wurden die Weißkleepflanzen mit einer höheren Konzentration an Sporen von *C. botulinum* ($10^8/\text{ml}$) als auch mit *R. leguminosarum* ($10^7/\text{ml}$) inokuliert, so zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied sowohl in der Größe der Pflanzen [Abbildung 3.27 A] als auch im Trockengewicht [Abbildung 3.27 C] zwischen den mit *C. botulinum* und *C. sporogenes* inokulierten Pflanzen und den Kontrollpflanzen.

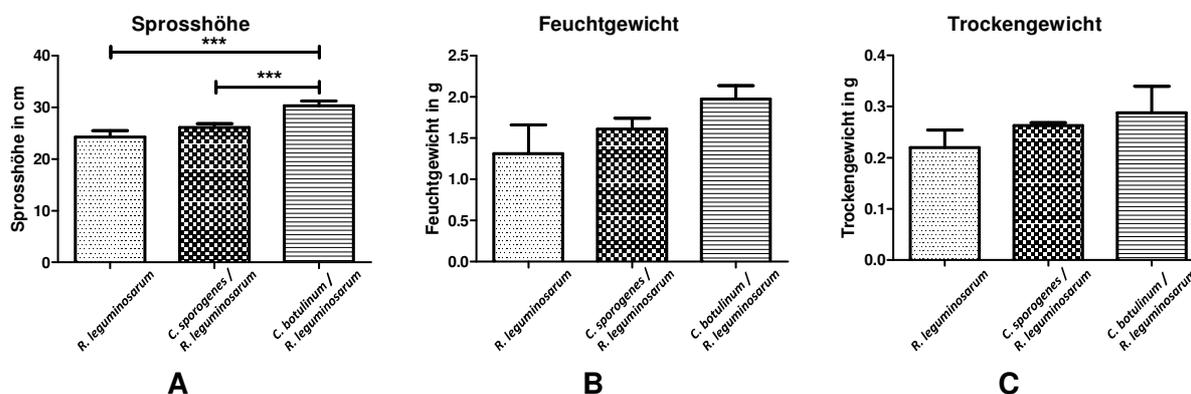


Abbildung 3.28: Pflanzenwachstumsfördernder Effekt der Clostridien auf *L. perenne* im natürlichen Bodensystem (CL-T) nach 4 Wochen Wachstum. Die Pflanzen wurden mit Sporen von *C. sporogenes* bzw. *C. botulinum* (10^7) zusammen mit *R. leguminosarum* (10^7) inokuliert. *Cbot*: *C. botulinum*; *Cspo*: *C. sporogenes*; *Rleg*: *R. leguminosarum*.

*: Signifikanz ($p < 0,05$); **: Signifikanz ($p < 0,005$); ***: Signifikanz ($p < 0,0005$).

A: Sprosshöhe in cm. (*Rleg* / *Rleg* & *Cbot*: $p = 0,0002$;

Rleg & *Cspo* / *Rleg* & *Cbot*: $p = 0,0007$).

B: Feuchtgewicht in g. C: Trockengewicht in g.

Da im Feldversuch [1.10] eine Klee-Gras-Mischung verwendet wurde, sollte auch der Effekt auf Weidelgras untersucht werden. Bei Weidelgras (*L. perenne*) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den *C. botulinum* inokulierten Pflanzen und den Kontrollpflanzen in der Sprosshöhe der Pflanzen [Abbildung 3.28 A]. Bezüglich des Feucht- und Trocken-

gewichts zeigte sich ein Trend, jedoch waren die Unterschiede aufgrund einer starken Standardabweichung nicht signifikant [Abbildung 3.28 B, C].

Nachdem entsprechende Protokolle für die Anzucht der Pflanzen [2.4] im axenischen [2.4.2] bzw. im Bodensystem [2.4.3], sowie für die Inokulation [2.4.4], erarbeitet und optimiert wurden, konnte der pflanzenwachstumsfördernde Effekt analog zu den Ergebnissen im Freilandexperiment auch innerhalb der Wachstumsversuche dieser Arbeit bei Verwendung von Boden als Substrat (CL-T) demonstriert werden.

3.7 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Bei Gram-positiven Bakterien, wie *C. botulinum*, erfordert der Nachweis durch fluoreszenzmarkierte phylogenetische Gensonden mittels FISH eine vorangehende Optimierung der Fixierungs- und Hybridisierungsbedingungen [2.7]. Die Ursache liegt vor allem in der unterschiedlichen Ausprägung und somit Permeabilität der Gram-positiven Zellwand für Gensonden, bezogen auf die verschiedenen Wachstumsphasen (lag-, log-, stationäre- und Absterbe-Phase) der Organismen, begründet. Zu den unterschiedlichen Zeiten des Wachstums [2.5.10, Abbildung 3.29] wurden Fixative erstellt [2.5.11], welche zur Optimierung der Gensondenpermeabilität dienen.

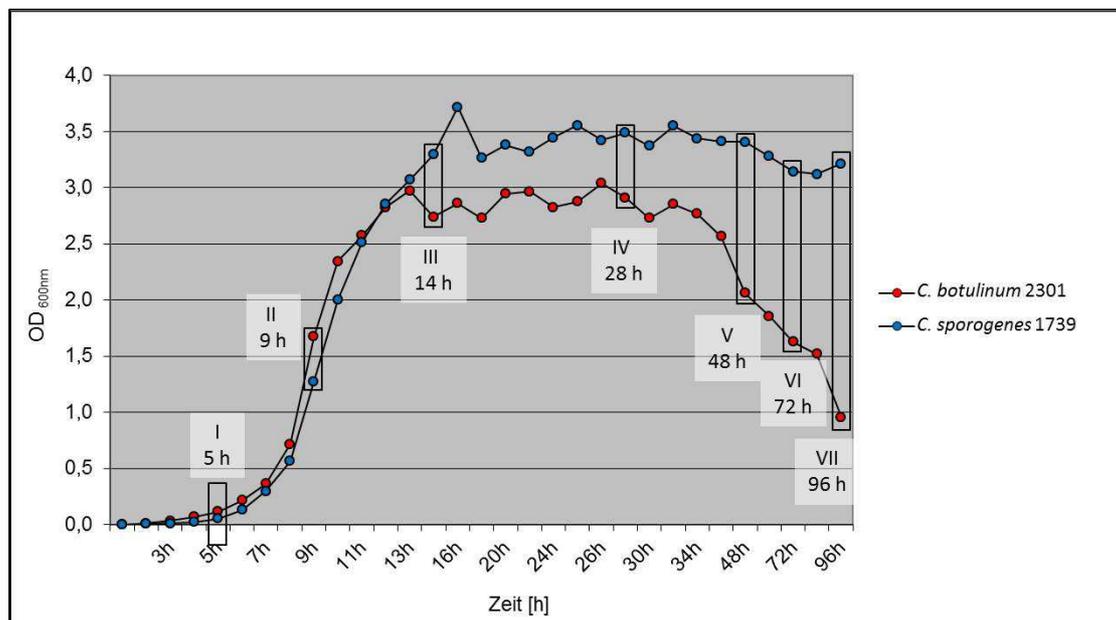


Abbildung 3.29: Wachstumskurve von *C. botulinum* 2301 (rot) und *C. sporogenes* 1739 (blau) in RCM bei 37°C [2.3.1]. I bis VII: Zeitpunkte der Probenahme zur Fixierung.

Neben dem Design spezifischer Sonden bedarf ein sicherer Nachweis Gram-positiver Bakterien oft einer enzymatischen Vorbehandlung, um die Zellwand für die verwendeten Gensonden permeabel zu machen [2.5.12]. Für den Nachweis der Clostridien mittels FISH wurde die Oligonukleotid-Sonde CHIS150 verwendet [Tabelle 2.11, S. 62]. Nach mikroskopischem Befund trat bei einer Kultivierung mit RCM nur selten Sporenbildung auf [Abbildung 3.6].

Es zeigte sich, dass die Sonde bei 35% Formamid im Hybridisierungspuffer für den Nachweis von *C. botulinum* 2301 am besten geeignet war [Abbildung 3.30, 3.31]. Anhand der in Abbildung 3.30 dargestellten Schmelzkurve lässt sich die optimale FA-Konzentration bestimmen.

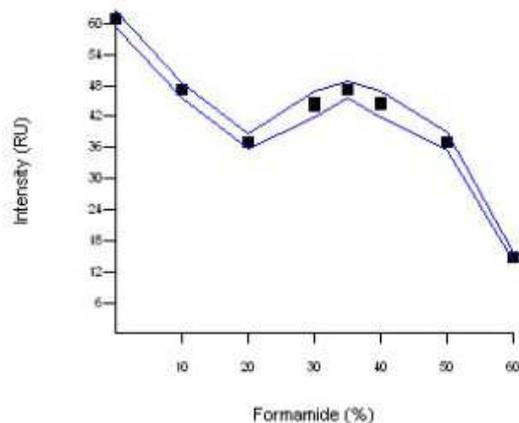


Abbildung 3.30: Schmelzkurve der CHIS150 Sonde. Höchste Stringenz bei 35% Formamid im Hybridisierungspuffer.

Die stringentesten Bedingungen für die Hybridisierung der CHIS150 Sonde an seine komplementäre Zielsequenz in der 16S-rRNS der Zellen wurden bei einer Konzentration von 35% FA im Hybridisierungspuffer erzielt [Abbildung 3.30].

Abbildung 3.31 zeigt die Fluoreszenzausprägung der CHIS150-Cy3 Sonde (rot) bzw. der EUB338-I, II, III-FITC Sonde (grün) bei unterschiedlichen FA-Konzentrationen.

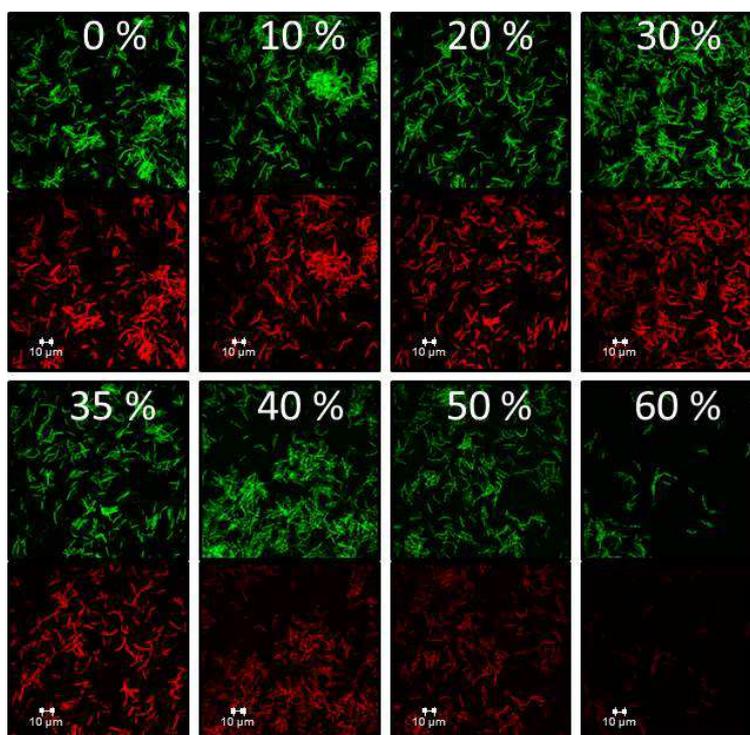


Abbildung 3.31: Fluoreszenzausprägung nach FISH bei unterschiedlichen FA-Konzentrationen (0% - 60%) von *C. botulinum* 2301. Sonden: EUB338-I, II, III-FITC (grün); CHIS150-Cy3 (rot).

Zur Bestimmung der optimalen FA-Konzentration wurde in diesem Experiment eine Reinkultur von *C. botulinum* 2301 aus der exponentiellen Phase (Phase II, 9 h, [Abbildung 3.29]) verwendet, die mit EtOH_{50%} fixiert wurde. Wie deutlich in Abbildung 3.31 erkennbar ist, wird die Fluoreszenz mit zunehmender FA-Konzentration schwächer, bis sich ab einer FA-Konzentration von 60% kein stabiles Hybrid zwischen Sonde und komplementärer Zielsequenz mehr ausbildet und somit keine Fluoreszenz detektierbar ist. Nach diversen Optimierungsschritten konnte die Methodik der FISH erfolgreich zur Detektion der inokulierten Bakterien in Pflanzenmaterial eingesetzt werden.

Abbildung 3.32 zeigt die aufgrund der Permeabilität der Clostridien-Zellwand unterschiedliche Effizienz der Markierung für Gensonden, bezogen auf die verschiedenen Wachstumsphasen. Hierfür wurde die Clostridien-spezifische Sonde CHIS150-Cy3 (rot) verwendet und die Zellen im Anschluss an die Hybridisierung zusätzlich mit DAPI (blau) gegengefärbt.

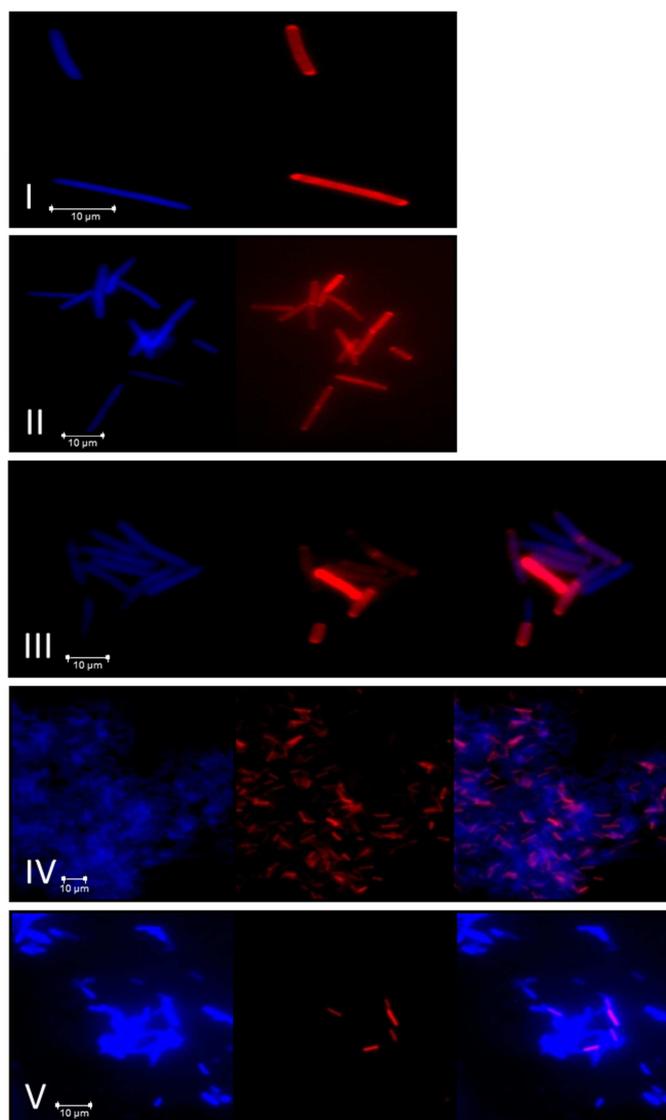


Abbildung 3.32: Detektionsrate von *C. botulinum* 2301 mit der Sonde CHIS150-Cy3 (rot) verglichen mit der vorhandenen Gesamtzellzahl (DAPI, blau) in den verschiedenen Wachstumsphasen (I bis V). Zeitpunkte (I bis V) [Abbildung 3.29].

In der lag- und log-Phase können 100% der Zellen mittels der FISH-Sonde CHIS150 detektiert werden [Abbildung 3.32 I, II]. In den späteren Wachstumsphasen (stationäre und Absterbephase) nimmt die Detektionseffizienz jedoch stark ab [Abbildung 3.32 III-V].

Um die Gram-positive Zellwand für die verwendeten Gensonden permeabel zu machen und somit die Effektivität der Penetranz zu erhöhen, wurden die zu den unterschiedlichen Zeiten des Wachstums eingesetzten Fixative [Abbildung 3.29] enzymatisch vorbehandelt [2.5.12], wodurch die Effizienz der Detektion erhöht werden konnte [Abbildung 3.33].

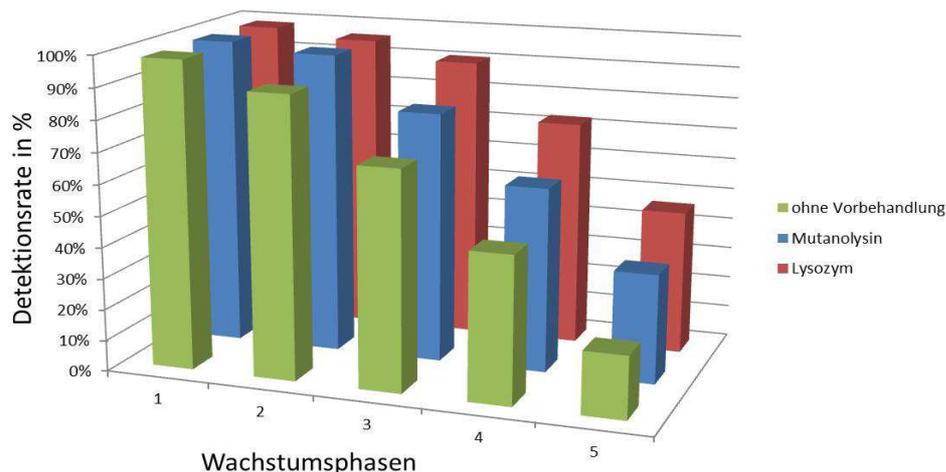


Abbildung 3.33: Enzymatische Vorbehandlung der Fixative (oder Zellen) mit Mutanolysin oder Lysozym [2.5.12, S. 58] um die Durchdringung der FISH-Sonden durch die Gram-positive Zellwand in der Effizienz zu steigern.

Da eine Vorbehandlung mit Lysozym [Abbildung 3.33 rot] den größten Effekt bezüglich der Detektionsrate zeigte, wurde eine Lysozym-Behandlung ins FISH-Protokoll für Clostridien aufgenommen.

Für die Detektion des inokulierten *R. leguminosarum*-Stammes wurde die Sonde RH11247 [Tabelle 2.11] verwendet. Auch für die Sonde RH11247 war eine 35%ige FA-Konzentration im Hybridisierungspuffer als optimal bestimmt worden.

Nach erfolgreichem Abschluss diverser Optimierungen einzelner Parameter, konnten die inokulierten Bakterien in Pflanzenmaterial mit fluoreszierenden Sonden hybridisiert und nach Anregung der Sonden am Mikroskop [2.9.2, 2.9.3] detektiert werden [3.9.1].

3.8 Markierung mit *evoglow*

Um für die Lokalisierungsstudien der Clostridien in Pflanzenmaterial fluoreszierende Stämme verwenden zu können, wurden beide Stämme mit einem Plasmid transformiert, welches ein Gen für ein Fluoreszenz hervorrufendes Protein (*evoglow*) trägt [2.8]. Das Gen wurde in den *C. botulinum*- bzw. *C. sporogenes*-Stämmen exprimiert; eine Fluoreszenz war detektierbar. Die Transformation der Fluoreszenzmarkierung (*evoglow*) wurde mittels Elektroporation erreicht. Die Transformationseffizienz konnte nicht genau ermittelt werden, da die Anzahl an transformierten Einzelkolonien auf festem Medium sehr schwankte.

3.8.1 Sensitivität der Clostridien auf verschiedene Antibiotika

Um Nährmedien für eine Selektion von Transformanten nach der Transformation des *evoglow*-Plasmids zur Verfügung zu haben, wurde die Sensitivität bzw. Resistenz der Stämme bezüglich verschiedener Antibiotika getestet [Tabelle 3.2].

Tabelle 3.2: Resistenz / Sensitivität auf Antibiotika.

Antibiotikum	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. botulinum</i>
Ampicillin [100ng/l]	sensitiv	sensitiv
Tetracyclin [20ng/l]	sensitiv	sensitiv
Kanamycin [50ng/l]	resistent	resistent
Gentamycin [20ng/l]	resistent	resistent

Wurde dem Kulturmedium Gentamycin oder Kanamycin zugegeben, so konnte ein Wachstum der Clostridien-Stämme stattfinden, was auf eine Resistenz hindeutete [Tabelle 3.2]. Es wurde jedoch eine **Sensitivität bezüglich Ampicillin und Tetracyclin** festgestellt. Die beiden Clostridien-Stämme unterschieden sich bezüglich ihrer Sensitivität hinsichtlich der verwendeten Antibiotika nicht voneinander. Bei der Selektion von Transformanten wurde aufgrund der Beschaffenheit des *evoglow*-Plasmids [2.8] Ampicillin zur Generierung eines Selektionsdrucks verwendet.

3.8.2 Überprüfung der Transformationseffizienz

Um die Aufnahme des *evoglow*-Plasmids zu überprüfen, sollte ein Fragment des für die Fluoreszenzausprägung verantwortlichen Gens mittels PCR amplifiziert werden [2.8.2]. Hierfür wurden spezifische Primer [Tabelle 2.15] entworfen und ein geeignetes PCR-Programm entwickelt. Als erstes wurde mittels Gradienten-PCR die optimale Annealing-Temperatur für das jeweilige Primerpaar ermittelt. Als DNS-Matrize wurde *evoglow*-Plasmid DNS verwendet.

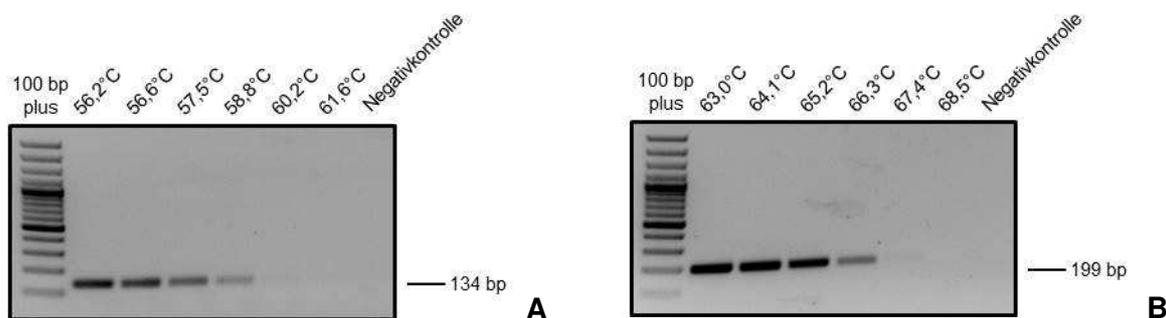


Abbildung 3.34: Optimierung der Annealing-Temperatur für PCR-gestützten Nachweis der verschiedenen *evoglow*-Plasmide.

A: *evoglow*-Plasmid pGLOW-CK^{XN}-Pp1. Pp-V/Pp-R: 134 bp.

B: *evoglow*-Plasmid pGLOW-CK^{XN}-Bs2. Bs-V/Bs-R: 199 bp.

Wie aus Abbildung 3.34 hervorgeht, wurde die höchste Stringenz der Anlagerung der Primer an die Zielsequenz des *evoglow*-Gens von *P. putida* (*evoglow*-Pp) bei 57°C und des *evoglow*-Gens von *B. subtilis* (*evoglow*-Bs) bei 65°C erreicht. Diese Annealing-Temperaturen wurden für die sich anschließenden PCR-Reaktionen verwendet.

Als nächstes wurde das Detektionslimit der PCR-Reaktionen ermittelt [Abbildung 3.35].

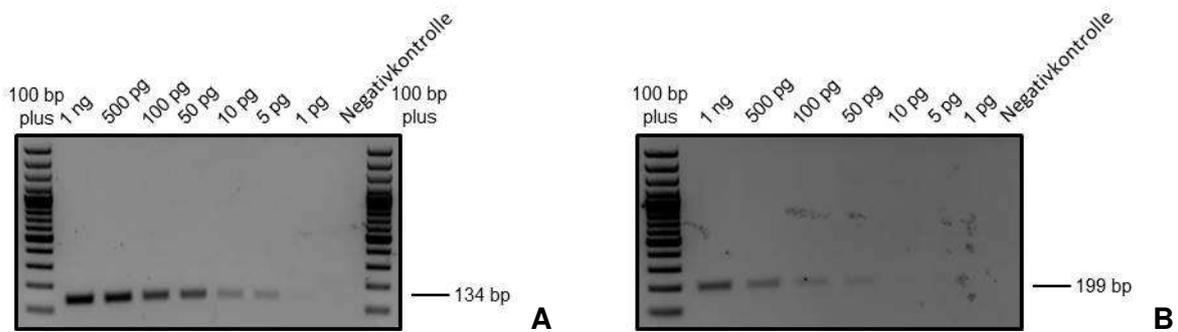


Abbildung 3.35: Detektionslimit der PCR für die *evoglow*-Plasmide.

A: *evoglow*-Plasmid pGLOW-CK^{XN}-Pp1. Pp-V/Pp-R: 134 bp.

B: *evoglow*-Plasmid pGLOW-CK^{XN}-Bs2. Bs-V/Bs-R: 199 bp.

Abbildung 3.35 A zeigt das Detektionslimit des Nachweises von *evoglow*-Pp, welches bei **5 pg** und Abbildung 3.35 B zeigt das von *evoglow*-Bs, welches bei **50 pg** lag.

Nach erfolgter Transformation durch Elektroporation wurde überprüft, ob das *bont* D-Gen noch vorhanden ist [Abbildung 3.36].

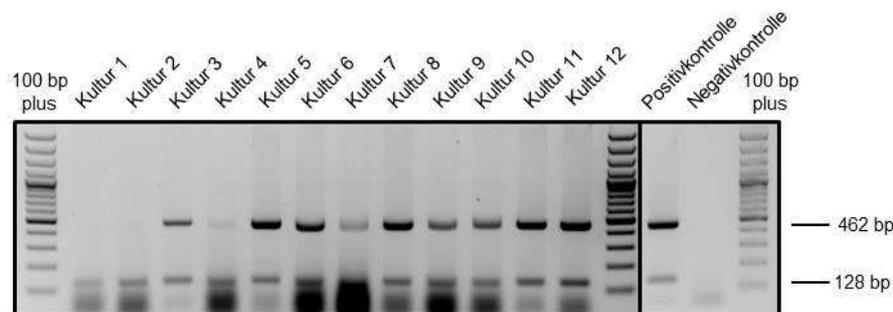


Abbildung 3.36: Nachweis von *bont* D (F2/R2: 462 bp, F4/R4: 128 bp) in 12 Kulturen nach Transformation des *evoglow*-Plasmids.

Nur in den Kulturen 1 und 2 war *bont* D nicht mehr eindeutig nachweisbar. In den Kulturen 3 bis 12 war es mittels BoNT/CD-Multiplex-PCR detektierbar [Abbildung 3.36].

Aus diesen 10 Kulturen (3 bis 12) der transformierten Bakterien, die *bont* D positiv getestet worden waren [Abbildung 3.36] und einen fluoreszierenden Phänotyp zeigten, wurde DNS und Plasmid-DNS isoliert.

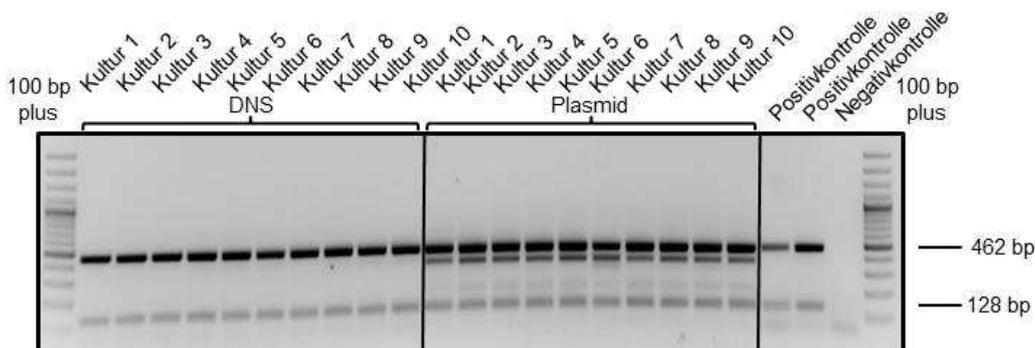


Abbildung 3.37: BoNT/CD-Multiplex-PCR zum Nachweis von *bont D* in 10 verschiedenen Kulturen nach erfolgreicher Transformation des *evoglow*-Plasmids. (F2/R2: 462 bp, F4/R4: 128 bp).

Wie in Abbildung 3.37 zu sehen ist, konnte *bont D* unabhängig, ob DNS oder Plasmid-DNS in die PCR eingesetzt wurde, in allen Proben eindeutig nachgewiesen werden.

Mittels PCR wurde auf das Vorhandensein der *evoglow*-Gene innerhalb der transformierten Bakterien, sowohl mit isolierter DNS als auch Plasmid-DNS, getestet [Abbildung 3.38].

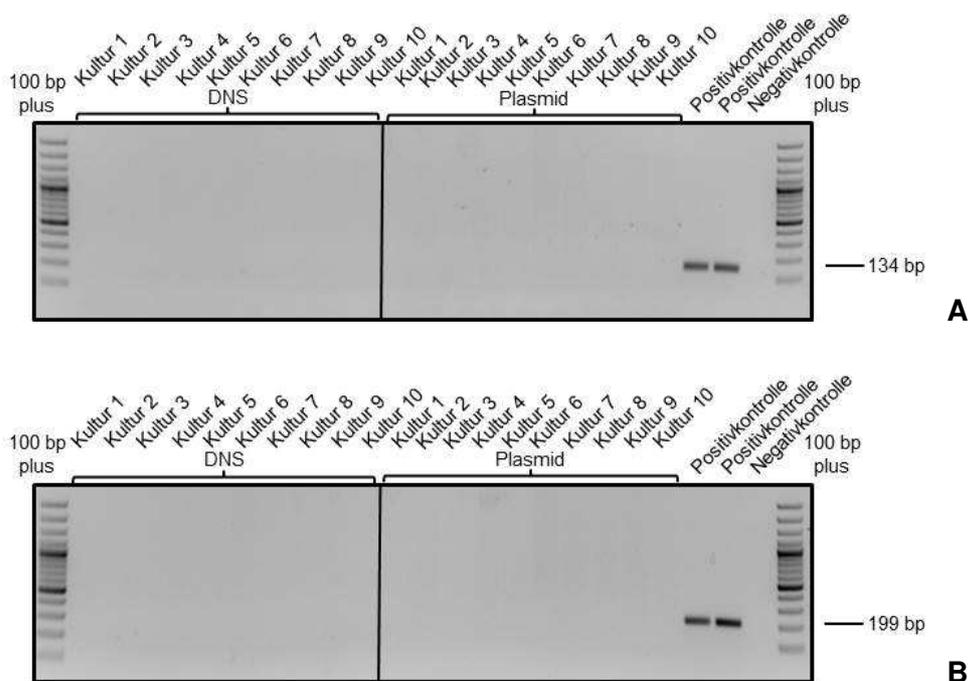


Abbildung 3.38: Detektion der verschiedenen *evoglow*-Plasmide in 10 verschiedenen fluoreszierenden Kulturen nach erfolgreicher Transformation.

A: *evoglow*-Plasmid pGLOW-CK^{XN}-Pp1. Pp-V/Pp-R: 134 bp.

B: *evoglow*-Plasmid pGLOW-CK^{XN}-Bs2. Bs-V/Bs-R: 199 bp.

In keiner der Kulturen konnte das transformierte Plasmid detektiert werden, obwohl diese Kulturen durch die Aufnahme des jeweiligen *evoglow*-Plasmids resistent bezüglich Ampicillin geworden sind [Tabelle 3.2], eine deutliche Fluoreszenz aufwiesen [3.8.3] und auch sedimentiertes Zellmaterial bei visueller Betrachtung grün fluoreszierend erschien.

3.8.3 Erworbene Fluoreszenz

Nach erfolgreicher Transformation zeigten die Clostridien-Stämme in Reinkultur bei einer Anregung im Bereich von 449 nm eine Fluoreszenz im grünen Bereich (495 nm). Die Stämme wurden unter selektiven Bedingungen (Amp) in RCM angezogen. Abbildung 3.39 zeigt den Nachweis der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 495 nm mittels verschiedener Mikroskope [2.9] bei verschiedenen Vergrößerungen. Abbildung 3.39 A und B zeigt Einzelkolonien von *C. botulinum* unter einem Binokular. Die transformierte Kolonie (A) zeigt im Vergleich zur Kontrolle (B) eine deutliche Fluoreszenz. Auch in Abbildung 3.39 C (Epifluoreszenz-Mikroskop) und Abbildung 3.39 D (CLSM) kann eine deutliche Fluoreszenz beobachtet werden.

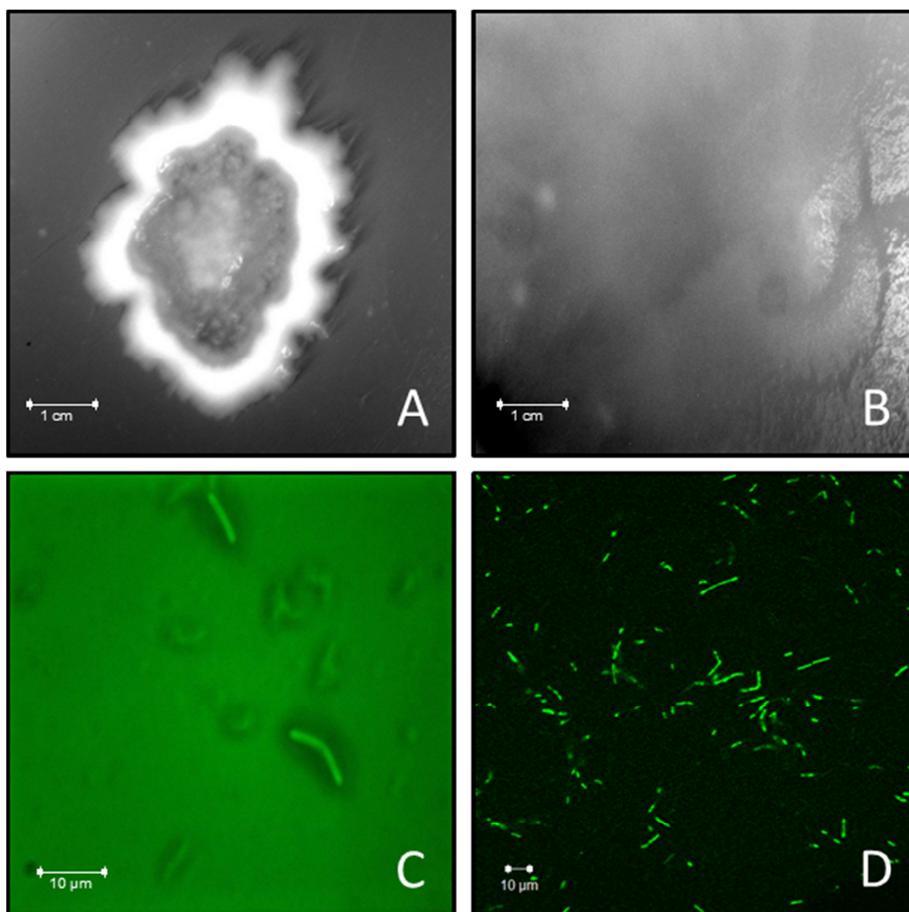


Abbildung 3.39: Fluoreszenz im grünen Bereich (495 nm) der mit dem *evoglow*-Plasmid transformierten Kulturen. A und B: Binokular. C: Epifluoreszenz-Mikroskop. D: CLSM. A: nach Transformation (Kolonie-Fluoreszenz). B: vor Transformation. C und D: Fluoreszenz auf Einzelzellebene der transformierten Zellen.

Die auftretende Fluoreszenz zeigt, dass die Transformation erfolgreich war. Die mittels *evoglow* fluoreszenzmarkierten Stämme wurden zur Inokulation der Pflanzen in Wachstumsversuchen verwendet. Nach der Ernte der Pflanzen wurden die Wurzelproben in Entellan eingebettet und die inokulierten Clostridien konnten am Mikroskop aufgrund ihrer erworbenen Fluoreszenz im Pflanzenmaterial lokalisiert werden [3.9.2].

3.9 Lokalisierungsstudien

Innerhalb dieser Arbeit sollte geklärt werden, in wie weit *C. botulinum* in der Lage ist, Pflanzen systemisch zu besiedeln. Um das Besiedlungsverhalten, die Effizienz und die Ausprägung der Wurzelbesiedlung durch die verwendeten *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes*-Stämme auf Weißkleeplanzen *in situ* zu untersuchen, wurden die Pflanzen sorgfältig nach etwa 4 Wochen Wachstum geerntet [2.4.6]. Aus den beschriebenen Wachstumsexperimenten wurden von den gleichen Pflanzen sowohl EtOH- und PFA-Fixative von Wurzelproben angefertigt, als auch Proben zur DNS-Isolierung entnommen [2.4.2, 2.4.3]. Zur Lokalisierung der Bakterien innerhalb des Pflanzenmaterials wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

Zum einen konnten sie mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) [2.7] mit art- und domänen-spezifischen Oligonukleotid Sonden (CHIS150 und EUB338-I, II, III) in Kombination mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in fixierten Wurzelproben nachgewiesen werden [3.9.1]. Zum anderen konnten Bakterien, die mittels eines Reporter-Gen-Plasmids (*evoglow*) markiert worden waren [2.8], direkt am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop detektiert werden [3.9.2]. Aufgrund des stark autofluoreszierenden Wurzelraumes bzw. Pflanzenmaterials bedarf eine Lokalisierung neben der Vorbehandlung [Abbildung 3.33] und Optimierung der Hybridisierungsbedingungen [Abbildung 3.30, 3.31] unter Verwendung eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM) weiterer Optimierungen, wie die Optimierung der Parameter der Bildaufnahme.

3.9.1 Lokalisierung der Clostridien in Pflanzenmaterial mit FISH

Die fixierten Wurzelproben wurden mit art- und domänen-spezifischen Oligonukleotidsonden hybridisiert. Die eingesetzten Sonden sind in Tabelle 2.11 dargestellt.

Abbildung 3.40 zeigt Wurzeln von Weißklee nach ca. 4 Wochen Wachstum im axenischen System. Innerhalb dieses Versuchs wurden die Pflanzenkeimlinge mit Sporen von *C. botulinum* zusammen mit *R. leguminosarum* inokuliert. Bei Verwendung der spezifischen Clostridien-Sonde CHIS150-Cy3 (rot) und der allgemeinen bakteriellen Sonde EUB338-I, II, III-FITC (grün) zeigten Clostridien bei erfolgreicher Hybridisierung mit beiden Sonden und durch Überlagerung der aufgenommenen Kanäle ein gelbes Fluoreszenz-Signal im RGB-Bild des CLSM. *Rhizobium leguminosarum* zeigte aufgrund der alleinigen Bindung der allgemeinen bakteriellen Sonde EUB338-I, II, III-FITC eine Fluoreszenz im grünen Bereich. Der dritte Fluoreszenzkanal (Cy5) diente der Aufnahme der Autofluoreszenz. In diesem Kanal zeigte sich die Gewebestruktur der Pflanzen [Abbildung 3.40].

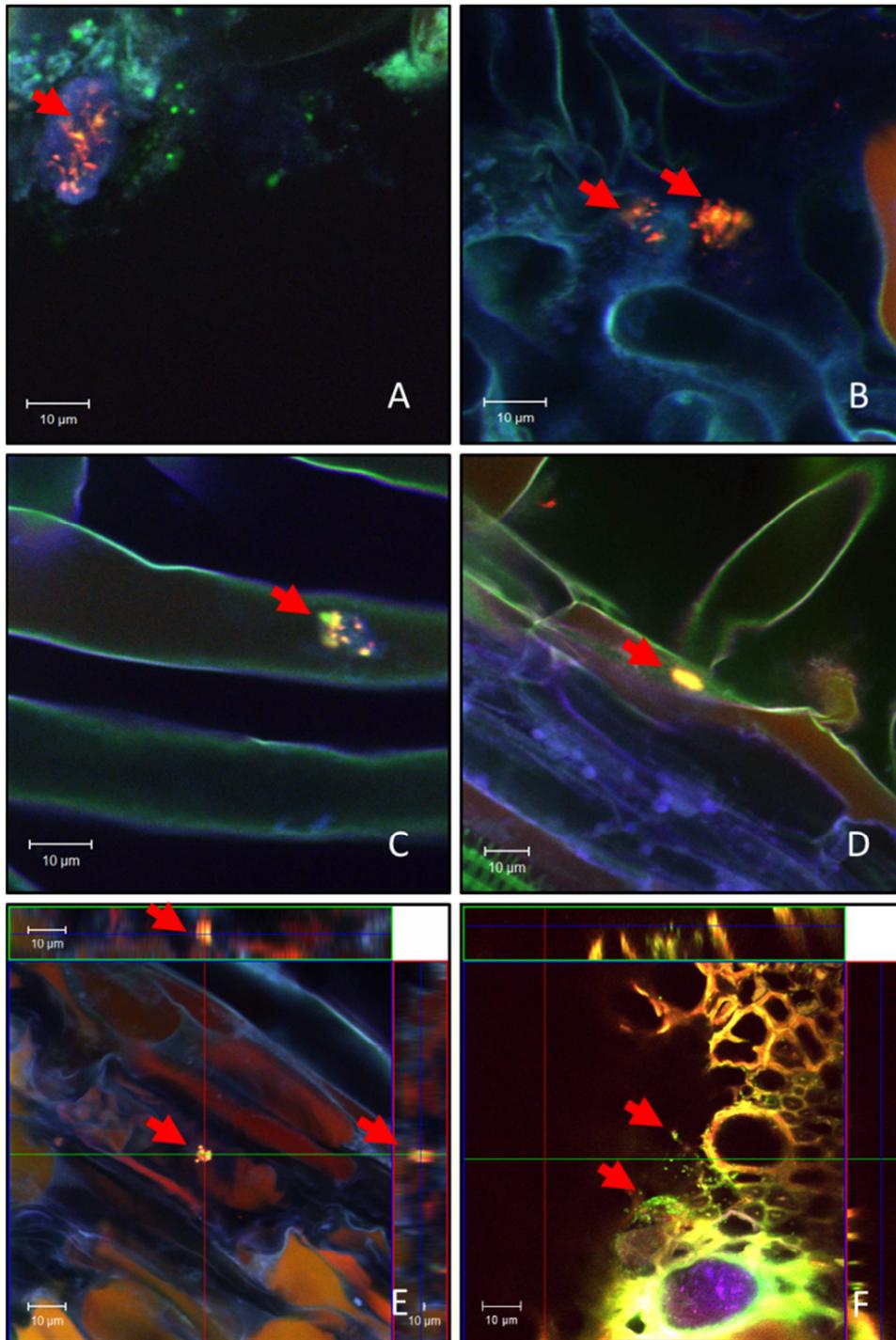


Abbildung 3.40: Konfokale Bilder von Sektionen fixierter Wurzeln von Weißklee inokuliert mit *R. leguminosarum* und Sporen von *C. botulinum* nach ca. 4 Wochen Wachstum im axenischen System. Für die *in situ*-Hybridisierung wurde die Clostridien-spezifische Sonde CHIS150-Cy3 (rot) und die allgemeine, bakterielle Sonde EUB338-I, II, III-FITC (grün) verwendet. *Clostridia* des Subcluster I konnten durch ein gelbes Fluoreszenz-Signal im RGB-Bild (rote Pfeile) detektiert werden, wohingegen *R. leguminosarum* eine Fluoreszenz im grünen Bereich zeigte (Zeiller *et al.*, 2015).

A, B, C, D und E: Longitudinale Wurzelschnitte; F: Lateraler Wurzelschnitt.

E und F: Dreidimensionale, orthogonale Ansicht eines konfokalen Bildes, das durch einen z-Stapel von xy-Scans generiert wurde.

Abbildung 3.40 zeigt konfokale Bilder von Sektionen fixierter Wurzelproben von Weißklee nach 4 Wochen Wachstum im axenischen System nach FISH Analyse mit den Sonden CHIS150-Cy3 und EUB338-I, II, III-FITC.

Mit dem angewendeten FISH-CLSM Ansatz zeigten detaillierte mikroskopische Analysen des Besiedelungsverhaltens, dass Zellen von *C. botulinum* 2301 nach 4 Wochen axenischen Wachstums primär **epiphytisch** auf der Wurzeloberfläche der Rhizosphäre von Weißklee nachweisbar waren [Abbildung 3.40 A – D]. Es konnten Zellen von *C. botulinum* jedoch auch **endophytisch** detektiert werden [Abbildung 3.40 E, F]. Durch die Anfertigung dreidimensionaler orthogonaler Bilder von z-Stapeln (**optische Schnitte**) aus xy-Scans war die präzise Lokalisierung der das pflanzliche Material kolonisierenden Zellen möglich. Clostridien wurden in interzellulären Räumen des Wurzelcortex von Weißklee gefunden [Abbildung 3.40 E, F]. Die Bakterien kolonisierten primär laterale Wurzeln. Generell war die Anzahl an detektierten Bakterien gering. Die höchste Kolonisierungsdichte wurde an Wurzelhaaren an der Hauptwurzel beobachtet. *Clostridium botulinum* 2301 zeigte hauptsächlich ein Kolonisierungsverhalten in **Einzelzellen** und größeren Mikrokolonie-ähnlichen **Zellclustern**, die aus Clostridien und anderen Bakterien bestanden. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl pathogene als auch apathogene *Clostridium*-Stämme in der Lage sind, Weißklee zu kolonisieren und zum Teil auch endophytisch in pflanzlichen Geweben persistieren können. Darüber hinaus gab es keinen Unterschied im Besiedlungsmuster der beiden Stämme. Analog wurden Experimente auch für die *in situ*-Lokalisierung von *R. leguminosarum* durchgeführt.

Neben Lokalisierungsexperimenten mit FISH konnten Stämme für die Inokulation verwendet werden, die mittels eines fluoreszierenden Reporter-gen-Plasmids (*evoglow*) markiert worden waren [2.8], und direkt am CLSM detektiert werden konnten [3.9.2].

3.9.2 Lokalisierung der *evoglow*-markierten Stämme in

Pflanzenmaterial

Nach Transformation und Expression des fluoreszierenden *evoglow*-Proteins [2.8] konnten die Clostridien nach dessen spezifischer Anregung am CLSM detektiert werden. Zunächst wurde getestet, ob es aufgrund der hohen Autofluoreszenz der Pflanzenwurzeln möglich ist, die fluoreszierenden Signale der Bakterien zu detektieren. Axenisch gewachsene Pflanzen wurden in einer Reinkultur von Clostridien für 1 h inkubiert und anschließend am CLSM untersucht. Wie in Abbildung 3.41 zu sehen ist, können die grün fluoreszierenden Clostridien im Wurzelraum der Pflanzen identifiziert bzw. lokalisiert werden.

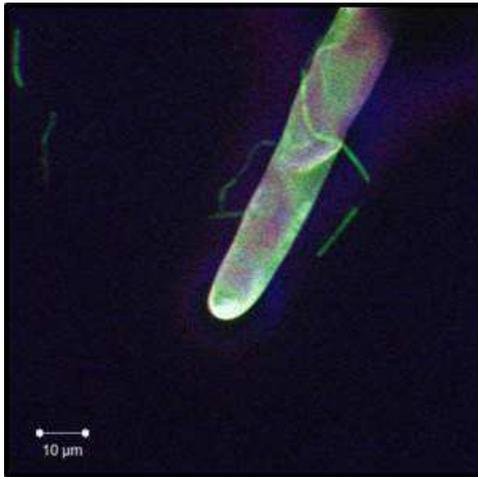


Abbildung 3.41: Wurzeln von Weißklee nach ca. 2 Wochen Wachstum im axenischen System und Inkubation mit vegetativen Zellen einer Reinkultur des *evoglow*-markierten *C. botulinum*-Stammes für 1 h. Die markierten Zellen zeigten bei Anregung der *evoglow*-Fluoreszenz bei 449 nm ein grünes Fluoreszenzsignal bei 495 nm im RGB-Bild. In den beiden anderen Fluoreszenzkanälen (Cy3, Cy5) zeigte sich die Autofluoreszenz der Gewebestruktur der Pflanze.

In Abbildung 3.41 ist eine Wurzel von Weißklee nach ca. 4 Wochen Wachstum im axenischen System dargestellt, die für 1 h mit vegetativen Zellen einer Reinkultur des *evoglow*-markierten *C. botulinum*-Stammes inkubiert wurde. Die markierten Zellen zeigen am CLSM bei Anregung der *evoglow*-Fluoreszenz bei 449 nm ein grünes Fluoreszenzsignal bei 495 nm im RGB-Bild. In den beiden anderen Fluoreszenzkanälen (Cy3, Cy5) zeigt sich die Autofluoreszenz der Gewebestruktur der Pflanze. Dieses Experiment diente der Überprüfung der Möglichkeit einer Detektion mittels *evoglow*-markierter Clostridien.

Nach erfolgreicher Detektion der Clostridien auf den Pflanzenwurzeln wurden Wachstumsexperimente im axenischen System durchgeführt [2.4.2], in dem sterile Pflanzenkeimlinge mit vegetativen Zellen der transformierten Bakterien inokuliert wurden. Nach ca. 4 Wochen Wachstum wurden die Proben geerntet und am CLSM auf die Besiedlung und Lokalisierung der Bakterien hin untersucht.

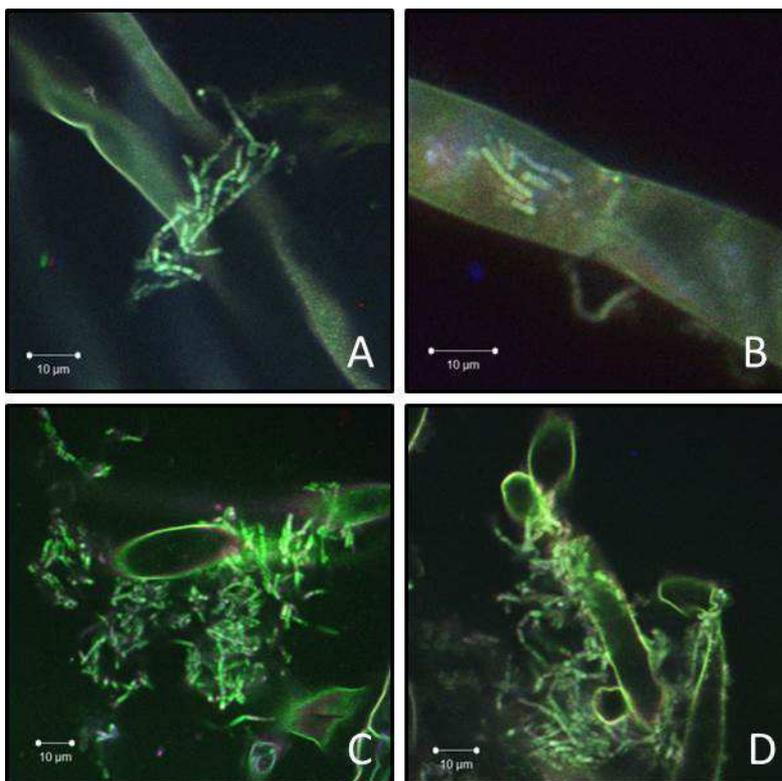


Abbildung 3.42: Wurzeln von Weißklee nach ca. 4 Wochen Wachstum im axenischen System und Inokulation mit vegetativen Zellen des *evoglow*-markierten *C. botulinum*-Stammes [2.8, S. 65]. Die markierten Zellen zeigten im RGB-Bild bei Anregung der *evoglow*-Fluoreszenz bei 449 nm ein grünes Fluoreszenzsignal bei 495 nm. In den beiden anderen Fluoreszenzkanälen (Cy3, Cy5) zeigte sich die Autofluoreszenz der Gewebestruktur der Pflanze.

Abbildung 3.42 zeigt Wurzeln von Weißklee nach ca. 4 Wochen Wachstum im axenischen System, die mit vegetativen Zellen des *evoglow*-markierten *C. botulinum*-Stammes inokuliert wurden. Die markierten Zellen zeigten bei Anregung der *evoglow*-Fluoreszenz bei 449 nm ein grünes Fluoreszenzsignal bei 495 nm im RGB-Bild. In den beiden anderen Fluoreszenzkanälen (Cy3, Cy5) zeigte sich die Autofluoreszenz der Gewebestruktur der Pflanze.

Durch den *in situ*-Nachweis und die Lokalisierung der Clostridien mit Hilfe der FISH mit spezifischen Oligonukleotid-Sonden und der *evoglow*-Markierung in Kombination mit CLSM konnte gezeigt werden, dass sowohl apathogene (*C. sporogenes*) als auch pathogene Clostridien (*C. botulinum*) Weißklee in verschiedenen Teilen der Pflanze besiedeln können.

3.10 Beprobung von Biogasproduktionsanlagen

Da die Biogasproduktion aus Pflanzenmaterial (als nachwachsender Rohstoff) als mögliche Ursache für den Eintrag von *C. botulinum* in die Landwirtschaft diskutiert wird [1.9], wurden Anlagen zur Biogasgewinnung auf das Vorhandensein von Toxin-produzierenden Clostridien-Stämmen stichprobenartig getestet [2.10]. Aufgrund der Tatsache, dass *C. botulinum* in einem Temperaturbereich von 18°C bis hin zu 51°C wächst [3.1.1], könnte *C. botulinum* in ca. 85% der Fermenter zur Erzeugung von Biogas in Bayern [1.9] gedeihen. Gelangen vegetative Zellen oder Sporen von Clostridien-Stämmen durch evtl. zu geringe Sterilisation des beschickten Substrates in einen Fermenter, so ist eine Kontamination möglich.

Die aus Biogasproduktionsanlagen stichprobenartig entnommenen Materialien wurden hinsichtlich ihres Ammonium-, Nitrat- und Phosphatgehalts analysiert [Tabelle 2.18] und auf die Anwesenheit von *bont* A – F kodierenden Genen durch Toxin-produzierende Clostridien getestet. Hierfür wurde einerseits direkt aus der entnommenen Matrix DNS isoliert und in die PCR-Reaktionen eingesetzt. Um die eventuell vorhandenen *C. botulinum*-Stämme auch in geringen Konzentrationen nachweisen zu können, wurden andererseits Proben zunächst für ca. 48 h bei 37°C in RCM aktiviert/angereichert und anschließend DNS isoliert und in den PCR-Reaktionen verwendet [2.6].

Abbildung 3.43 zeigt den Nachweis der verschiedenen *bont* (A - F) nach Takeshi (Takeshi *et al.*, 1996). Hierbei wurde nach Anreicherung des entnommenen Materials aus dem beprobten Fermenter DNS isoliert und auf die Anwesenheit von *bont* (A - F) getestet.

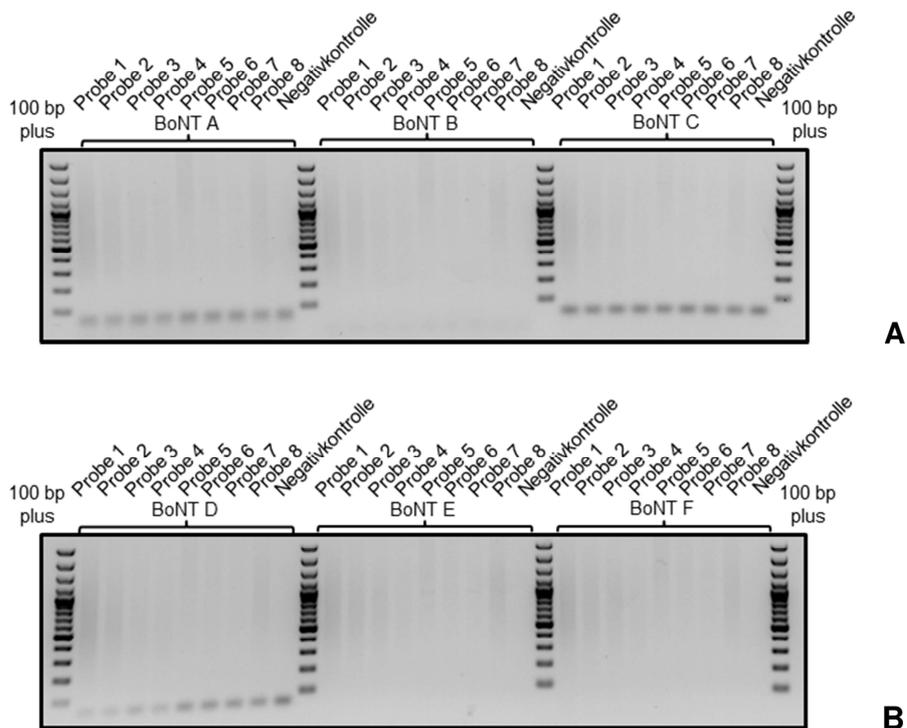


Abbildung 3.43: DNS aus Fermenter (Beprobung) nach Anreicherung in RCM [2.10, S. 70]. Nachweis der verschiedenen *bont* (A - F) nach Takeshi (Takeshi *et al.*, 1996) [2.6, S. 59].
A: *bont* (A - C); **B:** *bont* (D - F).

Wie aus Abbildung 3.43 deutlich wird, war der Nachweis der *bont*-Gene (A - F) mit den verwendeten Methoden stets negativ.

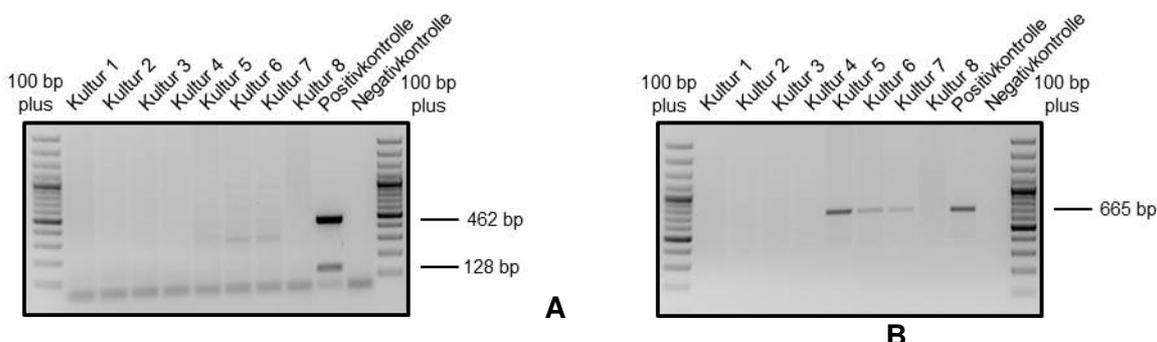


Abbildung 3.44: DNS aus Fermenter (Beprobung) nach Anreicherung in RCM [2.10, S. 70].

A: Nachweis von *bont* D (F2/R2: 462 bp. F4/R4: 128 bp) [2.6.2.2, S. 60].

B: Nachweis von Clostridien 16S-rDNS (P930/P932: 665 bp) [2.6.1, S. 60].

BoNT C und D produzierende Stämme konnten mittels der BoNT/CD-Multiplex-PCR allerdings in keiner Probe nachgewiesen werden [Abbildung 3.44 A]. Auf 16S-rDNS-Ebene ließ sich ein allgemeiner Nachweis vorhandener Clostridien-Arten erbringen [Abbildung 3.44 B]. Dies war zu erwarten, da Clostridien in anaerob geführten Fermentern einen wesentlichen Aspekt bei der Umsetzung der Biomasse zur Herstellung von Biogas darstellen.

Mit den verwendeten Methoden konnte in keinem der beprobten Fermentern *C. botulinum bont* (A - F) nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1 Nachweis/Lokalisierung der inokulierten Clostridien

in planta

Mittels spezifischer PCR-basierter, molekularbiologischer Nachweismethoden mit unterschiedlichen Primerpaaren, welche sowohl gegen das *bont D* kodierende Gen als auch gegen die 16S-rDNS von Clostridien als Zielgen gerichtet waren, sowie mit Hilfe von *in situ*-Lokalisierungsstudien (FISH / CLSM) war es möglich, *C. botulinum* im Pflanzenmaterial spezifisch nachzuweisen. Eine systemische Kolonisierung von Weißklee (*T. repens*) und „Deutschem Weidelgras“ (*L. perenne*) konnte gezeigt werden. Die Clostridien konnten sich von inokulierten Wurzeln in oberirdische Sprosssteile ausbreiten [Abbildung 3.20, 3.22].

4.1.1 Nachweis mittels PCR

Für den molekularbiologischen, PCR-gestützten Nachweis der inokulierten Clostridien innerhalb des Pflanzenmaterials wurde zum einen das Primerpaar P930/P932 verwendet, das ein Fragment der 16S-rDNS amplifiziert und die gesamte Gattung *Clostridium* erfasst. Daher kann nicht zwischen inokulierten Stämmen und ubiquitär im Boden vorkommenden Clostridien unterschieden werden, wodurch falsch positive Ergebnisse auftreten können. Um spezifisch auf *C. botulinum* testen zu können, wurden zwei verschiedene PCR-Systeme verwendet [2.6.2], die das *bont D*-Gen als Zielgen haben. Mittels des PCR Systems von Takeshi *et al.* (1996) war es möglich, das Toxin-Gen von *C. botulinum* spezifisch nachzuweisen, wobei jedoch unter nicht-stringenten Reaktionsbedingungen auch unspezifisch Fragmente pflanzlicher Gene amplifiziert werden (nicht gezeigt). Sequenzanalysen in verfügbaren Datenbanken ergaben, dass Genbereiche von pflanzlichen Plastiden, wie Chloroplasten und Mitochondrien, nur eine Basenfehlpaarung in der Zielsequenz der Primer zum eigentlichen Zielgen aufweisen. Um sichere Aussagen treffen zu können, wurden daher alle in dieser Arbeit amplifizierten Fragmente sequenziert und nach umfangreichen Optimierungen konnte eine Fehlamplifikation unterdrückt werden. Um zwischen den verschiedenen Mosaiktoxinen der BoNT C und D-Subtypen (BoNT Chimären: CD / DC) unterscheiden zu können, wurde eine BoNT/CD-Multiplex-PCR verwendet [2.6.2.2].

Die detaillierte Durchführung der Aufarbeitung des Pflanzenmaterials spielt für die Detektion der inokulierten Clostridien eine entscheidende Rolle. Durch den Aufschluss des Pflanzenmaterials mit Flüssigstickstoff und anschließender DNS-Isolierung erhält man einen deutlich höheren Anteil an pflanzlicher DNS im Vergleich zu bakterieller DNS, wodurch bei einer geringen Kolonisationsrate der inokulierten Bakterien die DNS Konzentration unterhalb des Detektionslimit der Nachweismethode liegt und daher eine Detektion misslingt [Abbildung 3.18]. Auch durch das Auftreten von Sporen, aus denen keine oder nur wenig

DNS isoliert werden kann, misslingt der Nachweis [Abbildung 3.17] ebenso. Daher ist eine Anreicherung der Clostridien im Pflanzenmaterial vor der Detektion der spezifischen Ziel-DNS nötig, denn die daraus resultierende DNS enthält einen höheren Prozentsatz an bakterieller DNS. Durch eine Inkubation des Pflanzenmaterials in RCM für 24 h bis 48 h kann neben einer Anreicherung der Clostridien auch ein Auskeimen von Sporen erfolgt sein. Diese Vorgehensweise ermöglicht allerdings nur eine qualitative Aussage über die Anwesenheit von Clostridien. Es ist keine quantitative Aussage über beispielsweise die Besiedlungsdichte möglich. Die Anreicherung von *C. botulinum* in geerntetem Pflanzenmaterial vor der DNS-Isolierung gewährleistet einen zuverlässigen, empfindlichen, nicht-quantitativen Nachweis von *C. botulinum* im Pflanzenmaterial [Abbildung 3.20 - 3.24].

Durch Experimente in den verschiedenen Modellsystemen und dem spezifischen, molekularbiologischen PCR-gestützten Nachweis mit DNS der angereicherten inokulierten Clostridien konnte gezeigt werden, dass Clostridien in verschiedenen Teilen des Pflanzenmaterials von *T. repens* vorkommen können. Clostridien wurden mit Hilfe der Kombination von Anreicherung und PCR sowohl in der Wurzel als auch im Spross und in den Blättern der axenisch gewachsenen inokulierten Weißkleepflanzen detektiert [3.5]. Waren die Pflanzen im Bodensystem gewachsen, gestaltete sich die erfolgreiche Detektion der inokulierten Clostridien im Pflanzenmaterial schwieriger. Aufgrund der Verwendung von nicht-sterilem Boden als Wachstumssubstrat waren die inokulierten Clostridien einer natürlich vorkommenden, konkurrierenden Mikroflora ausgesetzt. Die Besiedlungseffizienz war dadurch schlechter und folglich war die Kolonisierungsrate (Bakterien pro Pflanze) der inokulierten Bakterien geringer. Es ist daher wahrscheinlich, dass in einigen Fällen die aus dem angereicherten Pflanzenmaterial extrahierte bakterielle DNS unterhalb der Nachweisgrenze der *Clostridium*-PCR Detektionssysteme lag und somit *C. botulinum* nicht in allen Proben eindeutig nachgewiesen werden konnte [Abbildung 3.22 - 3.24].

Obwohl der PCR-gestützte Nachweis viele Vorteile, wie Schnelligkeit, Spezifität, Sensitivität und den Verzicht des Mausmodells als Nachweis der Toxizität der Clostridien hat, zeigt die Amplifikation eines Genfragments nur die Anwesenheit des Neurotoxin-Gens und erlaubt keine Aussage darüber, ob das Gen auch exprimiert und das Neurotoxin gebildet wird.

4.1.2 Lokalisierung der inokulierten Clostridien mit FISH/CLSM

Durch kultivierungsabhängige Methoden wie beispielsweise der Anreicherung von Mikroorganismen (MO) aus natürlichen Umwelt- und Pflanzenproben und anschließender DNS-Isolierung ist die wahre Zusammensetzung und Abundanz verschiedener MO dramatisch verändert (Amann *et al.*, 1995). Während die gezielte Anreicherung spezifischer Mikroben aus Umweltproben die Nachweisgrenze deutlich verbessert, sind traditionelle mikrobiologische Verfahren mittels Anreicherung für eine detaillierte Lokalisierung und Interaktion von Pflanzen mit Clostridien-Arten innerhalb der Rhizosphäre nicht geeignet

(Wagner *et al.*, 1993; Torsvik *et al.*, 1990). Es kann nur eine qualitative Aussage über die vorkommenden Mikroorganismen getroffen werden (Ward *et al.*, 1990). Oft wird auch der tatsächliche Beitrag einer bestimmten Bakteriengruppe zur Leistung der gesamten bakteriellen Gemeinschaft verfälscht, wenn keine Lokalisierung bekannt ist. Mikroskopische Untersuchung mit Färbemethoden wie DAPI zeigen die Organismen zwar in ihrem natürlichen Lebensraum, aber die taxonomische Zugehörigkeit der beobachteten Bakterienzellen bleibt dabei unbekannt. Um die *in situ*-Identifizierung von Bakterien zu ermöglichen, die noch nie zuvor kultiviert werden konnten (Amann *et al.*, 1991), wurden in der mikrobiellen Ökologie, in aquatischen Ökosystemen (Hicks *et al.*, 1992) und Sedimenten (Spring *et al.*, 1993) fluoreszenzmarkierte, rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden (Amann *et al.*, 1990) eingesetzt. In dieser Arbeit wurden spezifische Oligonukleotidsonden (FISH) in Kombination mit CLSM für eine *in situ*-Detektion eingesetzt, mit deren Hilfe die erfolgreiche Lokalisierung der inokulierten Clostridien im Pflanzenmaterial gelang. Es konnte eine endophytische Kolonisierung der inokulierten Bakterien (*C. botulinum* bzw. *C. sporogenes*) auf und in Weißkleewurzeln demonstriert werden [3.9.1]. Mittels dreidimensionaler Bilder aus einem z-Stapel optischer Schnitte (orthogonale Bilddarstellung) war eine exakte Lokalisierung der kolonisierenden Zellen in pflanzlichem Material möglich. Die Clostridien-Zellen konnten endophytisch nachgewiesen werden und schienen im Gewebe der Pflanzenwurzeln lokalisiert zu sein. Im Boden wurde diese Technik bis heute allerdings nur begrenzt eingesetzt (Hahn *et al.*, 1992). Da Clostridien-Stämme, darunter *C. botulinum*, weitgehend in der Natur allgegenwärtig sind [1.4], werden *C. botulinum*-Typen häufig auch in landwirtschaftlich genutztem Boden nachgewiesen (Smith and Sugiyama, 1988). Aufgrund der vorgelegten Lokalisierungsergebnisse besiedeln Clostridien (u.a. *C. botulinum*) primär die seitlichen Wurzeln (laterale Wurzeln), wobei sie auch in den interzellulären Räumen der Wurzelrinde von Weißkleepflanzen gefunden wurden. Über nicht näher bekannte Eintrittsstellen gelangen sie in die Leitgefäße der Pflanzen und somit zu höherliegenden Kompartimenten der Pflanzen (Miyamoto *et al.*, 2004). Sobald die Clostridien den Perizykel überwunden haben und beispielsweise in den Leitgefäßen der Pflanze präsent sind, kann im Folgenden der Spross infiziert werden (Minamisawa *et al.*, 2004). Eine systemische Ausbreitung der Bakterien in der gesamten Pflanze ist daher möglich (Gaiero *et al.*, 2013). Im Allgemeinen waren die Zahlen der erfassten Clostridien-Zellen gering. Die höchste Kolonisationsdichte wurde an lateralen Wurzeln und in der Wurzelhaarzone beobachtet, wo Wurzelhaare von der Hauptwurzel gebildet werden. Ein Grund hierfür liegt womöglich an der in diesen Bereichen erhöhten Nährstoffverfügbarkeit und an einer gut verfügbaren Oberfläche für die Besiedlung (Hartmann *et al.*, 2008). *Clostridium botulinum* zeigt dabei vorwiegend ein Kolonisationsverhalten in einzelnen Zellen und nicht, wie bei anderen Organismen, in großen Zellclustern. Gelegentlich konnten allerdings auch kleinere Cluster

von Zellen, bestehend aus Clostridien und anderen Bakterienstämmen, die an Mikrokolonien oder eine Biofilmstruktur erinnern, beobachtet werden [Abbildung 3.40 A - D]. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl pathogene als auch apathogene *Clostridium*-Stämme Pflanzen kolonisieren und zum Teil auch endophytisch in pflanzlichen Geweben vorkommen können [Abbildung 3.40 E, F]. Ein möglicher Grund für die geringen Zahlen an erfassten Clostridien-Zellen durch die FISH-Analyse ist eine, wie bei vielen Bodenorganismen vorkommende, geringe physiologische Aktivität der Zellen, die in einen Ruhezustand verfallen oder als Sporen vorliegen können, was mit einem niedrigen Gehalt an Ribosomen bzw. schlechter Zugänglichkeit für Sonden einhergeht (Amann und Fuchs, 2008). Die durch die fluoreszenzmarkierten, rRNS-gerichteten Sonden verliehene Fluoreszenz ist direkt mit der Menge an rRNS in der Zelle korreliert (DeLong *et al.*, 1989). Daher kann eine geringe physiologische Aktivität, wie sie z.B. auch in Sporen vorliegt, zu einem schwachen oder nicht nachweisbaren Signal führen. Dies könnte auch ein Grund für den schwierigen Nachweis von Clostridien-Zellen *in planta* sein. Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung hat tiefgreifend das Wissen über die Ökologie und Biodiversität der Bakterien in natürlichen Habitaten verbessert (Wagner *et al.*, 2003). Allerdings gibt es viele technische Herausforderungen einschließlich der Möglichkeit von falsch positiven Ergebnissen aufgrund der Bindung von Sonden an nicht-Ziel-rRNS-Sequenzen. Es konnte gezeigt werden, dass Zielsequenzen von Sonden, die Einzelbaseninsertionen oder Deletionen aufweisen, als Ergebnis der Hybridisierung mit einer Ausbuchtung um die fehlende Base zu falsch positiven Ergebnissen führen können (McIlroy *et al.*, 2011). Die Tatsache, dass die eingesetzte FISH-Sonde (CHIS150) gattungsspezifisch Clostridien erfasst und somit nicht zwischen natürlich im Boden vorkommenden und inokulierten Stämmen unterschieden werden kann, stellt eine Schwierigkeit des eindeutigen Nachweises dar und kann zu einer falsch positiven Detektion führen. Daher ist der PCR-Nachweis des Neurotoxin D kodierenden Gens (*bont D*) die sicherste Methode zur Detektion von *C. botulinum* in komplexen Bodensystemen.

Eine weitere Herausforderung bei der mikroskopischen Untersuchung von Boden- oder Pflanzen-assoziierten Mikroorganismen mit Fluoreszenzsonden ist die enorme Auto-fluoreszenz von Pflanzenmaterial oder von im verwendeten Bodensubstrat enthaltenen mineralischen Partikeln (Hahn *et al.*, 1992). Darüber hinaus bleibt eine genaue Lokalisierung der Bakterien aufgrund von Problemen mit der begrenzten Tiefenschärfe, oft schwierig. In der mikrobiell dicht besiedelten natürlichen Rhizosphäre können anoxische oder mikroaerobe *hot spots* vorkommen, in denen die Clostridien-Sporen beste Bedingungen zur Auskeimung vorfinden (Minamisawa *et al.*, 2004). Somit können sich Clostridien erfolgreich im Wurzelraum und endophytisch etablieren und auch schließlich den Spross besiedeln (Miyamoto *et al.*, 2004).

4.2 Nachweis und Instabilität der Botulinumtoxin-Gene

Die Analyse des Genoms von *C. botulinum* ergab neue interessante Aspekte über die Lebensweise von *C. botulinum* und unterstützt die Ansicht, dass *C. botulinum* im Wesentlichen einen saprophytischen Organismus darstellt, der sein Toxin verwendet, um einen Wirt zu töten und anschließend saprophytisch zu nutzen (Sebahia *et al.*, 2007). Als Folge einer Vergiftung mit dem potenten Botulinum-Neurotoxin (BoNT) ergibt sich die schwere paralytische Krankheit Botulismus [1.6]. BoNT ist Teil eines Komplexes, der aus dem Neurotoxin und mehreren assoziierten Komponenten besteht, die alle vom *bont*-Gencluster kodiert werden [1.5]. Beim molekularbiologischen Nachweis von *C. botulinum* ergab sich im Verlauf der Doktorarbeit jedoch unter bestimmten Bedingungen ein Verlust des Toxin kodierenden *bont* D-Gens [3.4.3]. Dies führte zu einem Verlust der Toxizität des Stammes und somit zu einer falsch negativen Diagnostik. Die Analyse von Genomen der Gruppe I, II und III hat ergeben, dass Toxin-Gene, einschließlich des BoNT-Clusters, oft durch ein Plasmid bzw. einen Bakteriophagen kodiert werden [1.5] und Genome der Gruppe III eine ungewöhnlich hohe Zahl von Plasmiden enthalten, die unterschiedliche Toxin-Gene tragen (Rogers, 1986). Die Fülle von mobilen Elementen, vor allem in Genomen der Gruppe III, ist verantwortlich für eine große Genomplastizität und Gentransferereignisse (Skarin und Segerman, 2011). So wurde gezeigt, dass bezüglich des Toxin-Gen-Clusters horizontaler Transfer innerhalb und zwischen verschiedenen Gruppen und Arten von *Clostridium* stattfindet, was zu einer genetischen Vielfalt der Art *C. botulinum* geführt hat [1.3]. Mehrere *C. botulinum*-Stämme können durch Toxin-Gen tragende Bakteriophagen pseudo-lysogenisiert werden (Sakaguchi *et al.*, 2005). Verschiedene Bakteriophagen können Stämme befähigen, ein Typ C oder Typ D-Toxin zu produzieren und somit potenziell zu toxigenen Stämmen werden, wobei sich die Bakterienstämme in ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem gleichen Phagen unterscheiden (Skarin und Segerman, 2011). Das Ergebnis einer Studie von Marshall *et al.* war, dass die BoNT kodierenden Plasmide von *C. botulinum* zur Konjugation befähigt sind (Marshall *et al.*, 2010). Woudstra *et al.* stellten 2012 fest, dass unter 292 Proben, die von Wildvögeln, Geflügel und Rindern stammten, 144 positiv für entweder ein *bont* C-D oder *bont* D-C-Gen waren. Interessant war, dass nur *bont*-Mosaikgene (C-D und D-C Typen) in natürlichen Proben, unabhängig vom tierischen Ursprung oder ihrer geographischen Lage, gefunden wurden (Woudstra *et al.*, 2012). Um den gleichzeitigen Nachweis von *C. botulinum*-Subtypen (C, C-D, D und D-C) zu erbringen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Multiplex-PCR [2.6.2.2] verwendet, mit der Fragmente der jeweiligen *bont*-Sequenzen amplifiziert werden konnten. Die Nachweise wurden mit dem verwendeten BoNT D produzierenden *C. botulinum*-Stamm durchgeführt und zeigten eine hohe Spezifität. Die Nachweisgrenze der PCR-Reaktionen war 5 pg, entsprechend 1650 Genomkopien. Künstlich kontaminierte Proben von Pflanzenmaterial

zeigten eine Nachweisgrenze von weniger als 50 pg [3.4.2]. Im Gegensatz zu auf festem Kulturmedium gewachsenen Einzelkolonien, die von einer einzigen Zelle stammen, hält sich in Flüssigkultur ein Gleichgewicht zwischen Zellen, die den Phagen verlieren und Zellen, die den Phagen aufnehmen [3.4.3].

4.3 Variabilität der Sporulation

Die Gattung *Clostridium* umfasst ein breites Spektrum von Gram-positiven, obligat anaeroben Bakterienstämmen, die in der Lage sind, unter ungünstigen Umweltbedingungen Endosporen als Überdauerungsformen zu bilden [1.2]. Aufgrund der Sporulation und der extremen Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen äußere Einflüsse war es zum Teil schwierig, einen Nachweis der Bakterien im Sporenstadium zu erbringen [3.4.4]. Auch durch gezielte Vorbehandlungen [2.5.12], die darauf abzielten, die Gram-positive Zellwand abzubauen, gelang nicht immer ein eindeutiger Nachweis der Clostridien.

Die Sporenproduktion [2.3.1] von *C. botulinum* ist oft aufgrund der Variabilität des Prozentsatzes der Sporenbildung innerhalb einer Kultur von einem Typ bzw. Stamm zum anderen schwer prognostizierbar. Werden zwei Stämme des gleichen Typs im gleichen Medium bei der gleichen Temperatur für die gleiche Zeitdauer kultiviert, so können fast alle Zellen des einen Stammes sporulieren, während weniger als eine von 10.000 Zellen des anderen Stammes eine Spore bildet (Woods und Jones, 1986). Die Behandlung der Kulturen vor der Inokulation in Medium durch Hitze ist für die Sporenproduktion oft hilfreich, wobei eine Überhitzung vermieden werden muss (Whitmer und Johnson, 1988). Das verwendete Sporulationsmedium sollte keine nennenswerte Natriumchlorid Konzentration enthalten, da dadurch die Sporenbildung gehemmt wird (Smith und Sugiyama, 1988b). *Cooked meat Medium* (CMM) zeigte sich daher als optimal zur Kultivierung von *C. botulinum* und *C. sporogenes* geeignet (Roberts, 1967) [3.3.1]. Als Nachteil der Verwendung von CMM stellte sich jedoch die Schwierigkeit heraus, aufgereinigte Sporensuspensionen ohne Partikel des Mediums zu produzieren (Roberts, 1967).

4.4 Axenisches System vs. Bodensystem

Die kontrollierte Umgebung eines axenischen Systems kann die verschiedenen biotischen und abiotischen Umwelteinflüsse in der Natur nicht nachstellen und entspricht somit nicht den natürlichen Wachstumsbedingungen von Pflanzen (Klerks *et al.*, 2007a). So sind die Faktoren, die Einfluss auf die Internalisierung von Bakterien in pflanzliches Gewebe haben, in mono-axenisch wachsenden Pflanzen im Vergleich zu Pflanzen, die in natürlichem Boden wachsen, unterschiedlich (Klerks *et al.*, 2007a). Die Strukturen und die Form der Wurzeln unterscheiden sich beispielsweise in den beiden Systemen, was sich auf das Verhalten der kolonisierenden Bakterien auswirken kann (Cooley *et al.*, 2003). Axenische Systeme bieten

dennoch eine einzigartige Möglichkeit, das Potenzial der Kolonisierung durch ein bestimmtes Bakterium ohne störende externe biotische und chemische Einflüsse zu untersuchen (Kutter *et al.*, 2006). Die Anzucht und die Einstellung der Wachstumsbedingungen für die inokulierten Pflanzen waren z.T. schwierig, da aufgrund von Sicherheitsbestimmungen die Versuche nur in luftdicht verschlossenen Pflanzgefäßen durchgeführt werden durften. Dies bedeutete, dass die Pflanzen in hoher Luftfeuchtigkeit (Kondenswasser) und eventuell O₂-Mangel wuchsen.

Bei in Boden gewachsenen Pflanzen ist die erfolgreiche Detektion der inokulierten Clostridien innerhalb des Pflanzenmaterials schwieriger, da geringere Zellzahlen auftreten. *Clostridium sporogenes* konnte nicht in allen untersuchten Pflanzenproben nachgewiesen werden [Abbildung 3.22]. Aufgrund der Verwendung von nicht-sterilem Boden als Wachstumssubstrat waren die inokulierten Clostridien einer natürlich vorkommenden, um die Besiedelung konkurrierenden Mikroflora ausgesetzt, was die Überlebenswahrscheinlichkeit und Etablierung von *C. botulinum* in der Rhizosphäre beeinflusst. Aus diesem Grund ist eine geringere Effizienz der Besiedelung der Pflanzen, im Vergleich zu den im mono-axenischen System wachsenden Pflanzen, erklärbar. Dies wurde z.B. auch für die Besiedelung von Salatpflanzen durch *Salmonella enterica* gezeigt, die, im Vergleich zu axenisch kultivierten Pflanzen, in Boden wuchsen (Hofmann *et al.*, 2014).

4.5 Reporter-gen-Markierung der Clostridien-Stämme

Die Tatsache, dass Pflanzenzellen durch die FISH-Technik aufgrund harscher Bedingungen während der Hybridisierung in ihrer morphologischen Integrität zerstört werden, stellte ein Problem bezüglich der exakten Lokalisierung der inokulierten Bakterien dar. Eine optimierte physiko-chemische Vorbehandlung zur Verbesserung der Sonden zugänglichkeit kann zu einer besseren Detektionseffizienz führen, jedoch andererseits auch zu einer starken Beeinträchtigung des zu untersuchenden Habitats (Pflanzengewebe). Um Lebensmittelvergiftende Krankheitserreger in komplexen Umgebungen überwachen zu können, erfordern viele auf die Lebensmittelsicherheit bezogene Studien die exakte Nachverfolgung bzw. Lokalisierung der pathogenen Erreger (Brandl, 2006). Um die Besiedelung der inokulierten Bakterien an einer möglichst morphologisch intakten Matrix durchführen zu können, sind bei der Auswahl an Vorbehandlungsprotokollen Kompromisse zu schließen, die jedoch oft mit einer Verminderung der Hybridisierungseffizienz einhergehen. Umfangreiche Experimente mit phylogenetischen Oligonukleotidsonden (FISH) und die anschließende mikroskopische Untersuchung (CLSM) zeigten Schwierigkeiten, *C. botulinum in situ* nachzuweisen. Dies liegt an der massiven bakteriellen Zellwand dieser Gram-positiven Bakterien und die dadurch stark verminderte Sondenpermeabilität gegenüber Gram-negativen Bakterien.

4.5.1 Fluoreszenzmarkierung der Clostridien

Das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) (*gfp*) wird oft verwendet, um eine Vielzahl von Mikroorganismen zu markieren (Remington, 2011). Ma *et al.* (2011) markierten Stämme wichtiger lebensmittelbedingten Krankheitserreger wie *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Salmonella* und *Escherichia coli* O157:H7 mit GFP und zeigten, dass das GFP-Plasmid keine Beeinträchtigung auf das Bakterienwachstum zur Folge hat und in einigen Isolaten über viele Generationen stabil sein kann (Ma *et al.*, 2011). Die Proteine der (GFP)-Familie können als Reporterproteine jedoch nur in aeroben Mikroorganismen verwendet werden. Die Fluoreszenzsignalintensität von GFP oder GFP-analogen Proteinen wird unter Sauerstofflimitierung negativ beeinflusst bzw. stark vermindert, da Sauerstoff zur Ausbildung der Fluoreszenz notwendig ist (Ma *et al.*, 2011). Für die Markierung von anaeroben Bakterien eignen sich stattdessen Flavinmononucleotid (FMN)-bindende Fluoreszenzproteine (FbFP), die O₂-unabhängig fluoreszieren (Drepper *et al.*, 2010). In einer Studie von Lobo *et al.* (2011) wurde gezeigt, dass die Expression von FMN-basiertem, fluoreszierendem Protein als Marker für die Genexpression im opportunistisch-humanpathogenen, anaeroben Erreger *Bacteroides fragilis* verwendet werden kann (Lobo *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnten mittels FbFP sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen *C. botulinum*-Zellen nachgewiesen werden, wodurch die einzigartigen Eigenschaften der FbFP-Fluoreszenzsignale in Clostridien in Gegenwart eines Selektionsdrucks mittels Antibiotika bestätigt werden. Darüber hinaus konnte die intrazelluläre Expression von FbFP in den Clostridien-Zellen nachgewiesen werden [3.9.2]. Somit zeigte sich, dass nach Expression der FbFPs diese ein geeignetes Werkzeug für die *in situ*-Detektion der inokulierten anaeroben Clostridien in Pflanzenmaterial sind. Die Einbringung einer *in situ*-Markierung war erfolgreich und inokulierte Bakterien konnten in Kombination mit CSLM auf oder in Weißkleewurzeln lokalisiert werden [3.9.2].

4.5.2 Elektroporation: Transformation der Clostridien mit *evoglow*

In dieser Arbeit wurde das *evoglow*-Expressionsplasmid mittels Elektroporation zur Fluoreszenzmarkierung in *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* eingebracht. Da es viele Faktoren gibt, welche die Transformationseffizienz stark beeinflussen, werden in der Literatur verschiedene Protokolle für die Elektroporation von *C. botulinum* diskutiert (Brigidi *et al.*, 1990). Neben den Parametern der Reaktionsführung des elektrischen Pulses und der Temperatur während der Erzeugung der Kompetenz, spielt auch der verwendete Elektroporationspuffer sowie das eingesetzte Volumen und der Abstand zwischen den beiden Elektroden innerhalb der verwendeten Elektroporationsküvette eine große Rolle (Jirásková *et al.*, 2005). Da der Wachstumszyklus der Bakterien mit einer unterschiedlichen Ausprägung der bakteriellen Zellwand einhergeht, war es für den Erfolg der Transformation

wichtig, Zellen aus der frühen exponentiellen Wachstumsphase mit nur schwach ausgeprägter Zellwand zu verwenden. Die Zellen wurden des Weiteren in RCM kultiviert, das 1% (w/v) Glycin enthielt, da dadurch die Permeabilität für das zu transformierende Plasmid erhöht wurde. Auch die Tatsache, dass die Kulturen nach Erreichen der gewünschten $OD_{660nm} = 0,7$ bei 4°C zentrifugiert wurden und die gesamte Prozedur der Elektroporation auf Eis durchgeführt wurde, erhöhte die Transformationseffizienz (Information *et al.*, 1988). Als Elektroporationspuffer wurde 10% PEG 8000 verwendet. Entscheidend für den Erfolg der Reportermarkierung ist, neben einer hohen Zelldichte ($10^8 - 10^{10}$ Zellen/ml) auch eine hohe Konzentration an Plasmid-DNS (1 µg) einzusetzen. Die elektrokompenten Zellen wurden mit einem Elektroporator, einem elektrischen Puls von 10 kV/cm bei einer Feldstärke von 25 µF und einem Widerstand von 400 Ω für 10 msek in 2 mm bzw. 4 mm Elektroporationsküvetten ausgesetzt, da diese Parameter die höchste Ausbeute an Transformanten bot. Nach der Elektroporation spielte die sich anschließende Gestaltung der Versuchsführung zur phänotypischen Expression eine weitere große Rolle. Zur Regeneration wurde dem RCM $MgCl_2$ (25mM) zugegeben, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, durch den Stromimpuls entstandene Schäden schneller kompensieren zu können.

4.6 Systemische Ausbreitung von Clostridien in Pflanzen

In den Pflanzversuchen wurden die Keimlinge zu einem Zeitpunkt inokuliert, zu dem sie nur aus dem Samenkorn und einer daraus keimenden ca. 1 - 2 cm langen Wurzel bestanden. Da eine Kontamination (durch z.B. Kondenswasser) ausgeschlossen werden konnte, deutet der Nachweis von pathogenen (*C. botulinum*) als auch apathogenen (*C. sporogenes*) *Clostridium*-Stämmen sowohl in interzellulären Räumen der Rhizodermis, dem inneren Wurzelcortex, als auch im Spross von Weißklee [3.4, 3.5] auf eine systemische und somit endophytische Besiedlung hin. Eine Voraussetzung für eine systemische Ausbreitung von Bakterien in Pflanzen ist die Durchdringung des inneren Marks des Perizykels der Wurzeln, um vaskuläres Gewebe und das Gefäßsystem der Leitbündel zu erreichen, in denen der Transport von Wasser und mineralischen Nährsalzen (Xylem) in Richtung oberirdischer Teile stattfindet. Alternativ ist auch eine aktive Bewegung und Kolonisierung der Clostridien möglich (Miyamoto *et al.*, 2004). Die Clostridien-Zellen konnten endophytisch in Pflanzengewebe lokalisiert und nachgewiesen werden [Abbildung 3.40 E, F]. Eine Unterscheidung, ob die Clostridien in Xylem oder in Phloem-Kompartimenten innerhalb der Pflanzenwurzeln vorhanden waren, war jedoch nicht möglich. Die Clostridien-Zellen traten zumeist als Zellgruppen auf. Die beobachtete, endophytische Kolonisierung von Weißkleewurzeln und die Persistenz der Besiedlung von Pflanzengewebe ohne offensichtliche nachteilige Wirkung auf die Wirtspflanze spiegelt offensichtlich eine gegenseitige vorteilhafte Beziehung zwischen *C. botulinum* und Weißklee wider. Eine endo-

phytische Besiedlung von stickstofffixierenden Clostridien-Stämmen wurde von Miyamoto *et al.* (2004), Minamisawa *et al.* (2004) und Ye *et al.* (2005) in *Miscanthus* beschrieben. Eine mögliche Erklärung für die systemische Ausbreitung könnte der Wassertransport im Gefäßsystem sein, wobei Clostridien aber auch aktiv die Pflanzen kolonisieren könnten. Als Erstes besiedelten diese Bakterien die Seitenwurzeln und benutzen spezielle Areale (*hot spots*), um in die Wurzelrinde einzudringen und schließlich die gesamte Pflanze über die Kolonisierung des Xylems zu infizieren. Ein Eindringen von Bakterien in das Xylem führt zu systemischer Kolonisierung und daher zur Gegenwart in den oberirdischen Sprosskompartimenten der Pflanzen. Die bakteriellen Zellen scheinen das innere Mark der Wurzel durchdringen zu können und in der Lage zu sein, die Leitbündel zu erreichen, die für den Transport von Wasser und mineralischen Nährsalzen in der Pflanze verantwortlich sind. Ein Nachweis der intrazellulären Clostridien-Zellen im Phloem bzw. Xylem Gewebe der Pflanzenwurzeln konnte jedoch nicht erbracht werden. Dass Clostridien als einzelne Zellen wohl eher in pflanzlichem Gewebe mit entsprechend reduzierter Sauerstoffkonzentration lokalisiert sind, wie beispielsweise in den Phloemzellen, spricht eher gegen einen Aufenthalt im Xylem. Eine Invasion von *Medicago truncatula* und *M. sativa* durch *Enterobacteriaceae* und auch durch *E. coli*, *S. enterica* und *Klebsiella pneumoniae*-Stämme wurde von Dong *et al.* (2003) gezeigt. Es wurde nachgewiesen, dass eine umfangreiche Besiedlung von Verletzungen der lateralen Wurzeln, ähnlich der Besiedlung durch Stickstofffixierende Endophyten, zu einem Eindringen der Bakterien in die Pflanze führte. Eine Infektion der Wurzelhaare, wie bei Rhizobien mit Leguminosen beobachtet wurde, gilt als wahrscheinlich, da im Inneren der Pflanze eine höhere Nährstoffkonzentration vorliegt als in der Rhizosphäre. Um die Mechanismen dieser auffallenden Bakterien-Pflanzen-Interaktionen besser zu verstehen, sind jedoch weitere Studien notwendig, denn obwohl Clostridien ubiquitär im Boden vorkommen, sind deren möglicher Lebensstil als mit Pflanzen assoziierte oder endophytisch lebende Bakterien in Pflanzen nicht im Detail geklärt. Forschungen zeigen, dass zur Gattung *Clostridium* zählende Isolate Pflanzen kolonisieren und in ihnen existieren können. So wurde ein anaerobes Stickstofffixierendes Konsortium (ANFICO) bestehend aus Stickstofffixierenden Clostridien und nicht-diazotrophen Bakterien in Süßgraspflanzen beschrieben (Minamisawa *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2005). Eine phylogenetische Analyse von 40 anaeroben N₂-fixierenden Clostridien-Isolaten, die aus den verschiedenen pflanzlichen Habitaten isoliert werden konnten, zeigte, dass die Bakterien mehrheitlich, wie auch *C. botulinum*, zu Cluster I (Collins *et al.*, 1994) zugehörig waren. Die getesteten Clostridien-Isolate konnten eine Vielzahl von Zuckern, wie Glukose, Cellobiose und Mannose als Kohlenstoffquelle verwenden, was auf eine saccharolytische Lebensweise hinweist und für ein Leben in Pflanzen sehr geeignet erscheint. In einer Studie von Miyamoto *et al.* (2004) wurde die Existenz von neuartigen, endophytischen, stickstofffixierenden Clostridien im Süßgras

Miscanthus sinensis demonstriert. Clostridien stellten in Blättern, Stängel und Wurzeln von *M. sinensis* einen großen Anteil der diazotrophen Bakterien dar und konnten in allen Teilen der Pflanzen, einschließlich der oberirdischen Sprosskompartimente, nachgewiesen werden. Obwohl Clostridien generell eine anaerobe Lebensweise aufweisen, zeigen diese Studien (Minamisawa *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2004) eindeutig, dass bestimmte Clostridien eine gewisse O₂-Toleranz zu haben scheinen und erfolgreich Pflanzen kolonisieren können und auch in der Lage sind, in pflanzlichem Gewebe zu persistieren bzw. zu proliferieren. Die aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse der Mechanismen, die zur Besiedlung von Pflanzen beitragen, sind erst am Anfang. Um die mikrobielle Ökologie von pathogenen Erregern auf / in beispielsweise Obst und Gemüse zu verstehen, wird zukünftige Forschung nötig sein (Critzler und Doyle, 2010). Für ein besseres Verständnis der Mechanismen dieser Bakterien-Pflanzen-Interaktionen werden weitere Studien benötigt, da, obwohl Clostridien ubiquitär im Boden vorkommen, ihr Lebensstil als Pflanzen assoziierte oder endophytischen Bakterien bisher nicht im Detail verstanden wird.

4.7 Wachstumsstimulierungseffekt durch Clostridien

Pflanzenwachstumsfördernde Effekte wurden bei einer Vielzahl von PGPB (*plant growth promoting bacteria*, pflanzenwachstumsfördernden Bakterien) festgestellt (Gaiero *et al.*, 2013). Diese können auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen, wie die Produktion von Phytohormonen, z.B. Auxinen, welche die Proliferation des Wurzelsystems stimulieren und somit die Aufnahme von limitierenden Nährelementen verbessern (Richardson *et al.*, 2009; Franche *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist die Aufnahme von Nährstoffen mit geringer Löslichkeit, wie Phosphat oder Eisen-III (Jin *et al.*, 2006) durch PGPB erhöht.

Es zeigte sich, dass im Vergleich zu den nicht inokulierten Kontrollpflanzen, die mit *C. sporogenes* bzw. *C. botulinum* inokulierten Pflanzen ein besseres Wachstum aufwiesen [Abbildung 3.25]. Die beobachteten Wachstumseffekte von Weißklee nach Inokulation mit *C. botulinum* [Abbildung 3.26 – 3.28] könnten aufgrund einer Änderung des Phytohormonstatus zustande kommen. Dies bleibt Gegenstand weiterer Experimente. Im axenischen Pflanzsystem zeigte sich innerhalb dieser Arbeit jedoch auch nach wiederholten Versuchen mit unterschiedlichen Inokulationsdosen und der Verwendung von Sporen und vegetativen Zellen bei inokulierten Pflanzen kein signifikanter Wachstumsunterschied. Dies mag zum einen an aeroben Verhältnissen im MS-Medium liegen, zum anderen an generell ungünstigen Bedingungen für das Wachstum von anaeroben Clostridien, die eine Proliferation vegetativer Zellen bzw. eine Keimung von Sporen und schließlich eine effiziente Wurzelbesiedlung nicht ermöglichen. Im Gegensatz dazu zeigte sowohl Gras (*L. perenne*) als auch Weißklee (*T. repens*) im Bodensystem in Töpfen mit verschiedenen Bodensubstraten [2.4.3] ein signifikant ($p < 0,05$) stärkeres Wachstum

bezüglich der mit Clostridien inokulierten Pflanzen (*C. botulinum* bzw. *C. sporogenes* 10^5 - 10^8 /ml, *R. leguminosarum* 10^7 /ml, [2.4.3]) verglichen mit den Kontrollpflanzen, die nur mit Rhizobien inokuliert wurden [3.6.2, Abbildung 3.25]. Unter nicht-axenischen Bedingungen schuf die Anwesenheit anderer Mikroorganismen wahrscheinlich eine sauerstoffarme Umgebung in der Rhizosphäre und auf der Wurzeloberfläche, welche die Besiedlung der Wurzeln durch Clostridien begünstigte (Minamisawa *et al.*, 2004). Der pflanzenwachstumsfördernde Effekt der Clostridien trat sowohl in der Wurzel als auch im Spross auf. Als Folge der anaeroben Wachstumsbedingungen der Clostridien wurden für die Inokulationsexperimente hauptsächlich Sporen eingesetzt. Typischerweise wurden vor der Inokulation der Pflanzen die Clostridien-Sporen mit *R. leguminosarum* gemischt und auf die sterilen Wurzeln der Keimlinge appliziert, ohne hierbei die Sprossanlage zu kontaminieren. Eine Co-Inokulation mit *R. leguminosarum* wurde gewählt, weil unter natürlichen Bedingungen dieser Bakterienstamm stets mit Leguminosen (z.B. Klee) assoziiert ist [1.8]. Die Ursache der durchgängig beobachteten, pflanzenwachstumsfördernden Wirkung der *C. botulinum* und *C. sporogenes*-Stämme bedarf weiterer Untersuchungen.

4.8 Clostridien in Dünge- und Futtermitteln – Botulismus bei Tieren

Clostridien können als Sporen für ungewöhnlich lange Zeiträume in der Umwelt und in Böden persistieren (Gessler und Böhnel, 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass toxische *C. botulinum*-Stämme Pflanzen endophytisch besiedeln können. Versuche des Göttinger Kooperationspartners zeigten, dass eine Applikation von mit Sporen inokuliertem Kompost zur Ausbildung von Biofilmen auf Gräsern führen kann (persönliche Mitteilung). Dies deutet darauf hin, dass *C. botulinum*-Sporen in diesem Habitat, obwohl ein gewisser Anteil an Sauerstoff vorhanden ist, in eine vegetative Lebensform übergehen können. Insbesondere Klee- und Grassilagen stellen in Deutschland eine in der Wiederkäuerfütterung außerordentlich bedeutende Futterquelle dar, da sie kostengünstig produziert werden können (Franche *et al.*, 2008). In Großbritannien wurde häufiger Botulismus Typ C als Typ D gemeldet und mit dem Einsatz von Hühnermist als Dünger, Bettzeug oder Futter in Verbindung gebracht (Payne *et al.*, 2011), da Geflügel *C. botulinum* Typ D subklinisch in seiner Darmflora tragen kann. Die Überwachung durch die *Veterinary Laboratories Agency* (VLA) zeigte die Entstehung von möglichem Botulismus bei Wiederkäuern im Jahr 2003, die sich durch eine schlaffe Lähmung manifestierte (Payne *et al.*, 2011). Von 2003 bis 2009 wurden 168 Vorfälle bei Rindern und 19 bei Schafen, mit einer Mortalität zwischen 5% und 80%, beobachtet (Payne *et al.*, 2011). Alle Fälle bei Schafen und 95% der Fälle bei Rindern zeigten eine Korrelation mit Geflügelexkrementen (Payne *et al.*, 2011). Der Darminhalt von erkrankten Rindern und Schafen wurde getestet. *Clostridium botulinum* Typ D-Toxin wurde in

32% der Rinder- und 18% der Schafproben und Typ D-Bakterien selbst wurden in 40% der Rinder- und 30% der Schafproben identifiziert, wobei eine Probe sowohl mit C als auch D Antisera reagierte (Payne *et al.*, 2011). Die Entstehung eines neuen Typ D-Stammes oder Veränderungen in der Masttierhaltung bzw. Ernährung von Hühnern, sowie Medikamente und andere Darminfektionen könnten die Besiedlung mit *C. botulinum* beeinflusst haben (Payne *et al.*, 2011). Eine weitere mögliche Eintragsquelle von *C. botulinum* ist die Kontamination von Futtermitteln durch sporenhaltige Kadaver von Kleinnagern und Wildtieren, die u.a. von Erntemaschinen verpresst wurden (Galey *et al.*, 2000; Myllykoski *et al.*, 2009). Die Aufrechterhaltung des Kreislaufs von *C. botulinum* wird der landwirtschaftlichen Nutzung zugeschrieben. Keime werden mit dem Kot ausgeschieden, über Gülle und Einstreu auf die Felder gebracht und können somit in pflanzliche Futtermittel gelangen (Böhnel *et al.*, 2001). Dass Toxin-produzierende Clostridien-Stämme stabil innerhalb von Pflanzengewebe existieren können, birgt ernsthafte gesundheitliche Risiken für Weidetiere wie Rinder und Pferde. Es wirft ein interessantes Licht auf die Beobachtung, dass Pferde auf Weiden mit Klee beispielsweise einem höheren Risiko ausgesetzt sind, an *Equine Grass Sickness*, einer Dysautonomie mit einer *C. botulinum*-Ätiologie, zu erkranken (Böhnel *et al.*, 2003). Die Prävalenz war in beiden Tierarten höher, wenn die Tiere auf einer Weide waren als wenn sie sich im Inneren eines Stalles aufhielten, was durch den Nachweis von *bont*-Genen in Stuhlproben von Rindern und Pferden festgestellt wurde (Steinman *et al.*, 2006). So ist eine geringere Clostridien-Belastung in Grassilagen nach Einsatz eines mineralischen Düngers als nach Düngung mit Gülle/Kompost zu erwarten (Notermans *et al.*, 1981; Böhnel und Lube, 2000). Da die ernährungsphysiologischen Eigenschaften der Organismen die Toxigenese bestimmen, ist es möglich, Futtermittel oder Bestandteile davon anhand verschiedener Parameter für ein Auskeimen der Sporen bzw. vegetatives Wachstum ungeeignet zu gestalten. In der Futtermittelherstellung soll als oberstes Ziel die Toxinbildung vermieden werden. Als obligat anaerobe Art, werden für ein Wachstum von *C. botulinum* reduzierende Bedingungen benötigt und eine Kontamination von Futtermitteln mit elektronegativen Redoxpotential erscheint wahrscheinlicher (Hauschild und Dodds, 1993). Seit einiger Zeit werden Totalherbizide mit allgemeinem Biozidanteil (z.B. Glyphosat) in der Landwirtschaft eingesetzt. Diese chemischen Mittel stehen im Verdacht, die natürlich vorkommende bakterielle Bodenmikroflora zu stören (Arango *et al.*, 2014), was zu einer Anreicherung von *C. botulinum* im Boden führen kann. Darüber hinaus könnten in den Organismus aufgenommene Biozide auch direkt im Verdauungssystem die intestinale Flora stören und somit Nischen für die Festsetzung von Clostridien schaffen, die im Falle einer intakten Besiedelung des Darms keine Chance hätten, sich festzusetzen (Krüger *et al.*, 2013). In diesem Kontext mehren sich die Anzeichen dafür, dass beispielsweise aufgenommenes Glyphosat gesundheitsfördernde Bakterien in Magen und Darm hemmt

oder gar tötet, wodurch die Darmflora erheblich geschädigt wird und pathogene Bakterien wie *C. botulinum* so nicht mehr ausreichend abgewehrt werden können (Krüger *et al.*, 2013). Als Folge der Aufnahme von Glyphosat könnte die Reduktion der Milchsäure-produzierenden *Lactobacillus*-Arten innerhalb der Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt eine mögliche Erklärung für die beobachtete Zunahme von *C. botulinum* assoziierten Krankheiten darstellen (Krüger *et al.*, 2013). Über die Toxizität von Glyphosat auf die häufigsten *Enterococcus spp.* im Gastrointestinaltrakt wird berichtet (Krüger *et al.*, 2013). Die Aufnahme dieses Herbizids kann ein signifikanter prädisponierender Faktor sein, der mit dem Anstieg von *C. botulinum*-vermittelter Erkrankungen assoziiert ist (Krüger *et al.*, 2013). Auch die vor allem Rinder betreffende Krankheit „chronischer Botulismus“ könnte damit zu tun haben (Krüger *et al.*, 2013). Die Verfügbarkeit von Wissen über den Infektionsweg und über kritische pflanzliche und mikrobielle Faktoren, welche die Effizienz der Besiedlung durch humanpathogene oder toxische Bakterien von Pflanzen beeinflussen, ist wichtig für die Gestaltung von Präventionsstrategien, um die Sicherheit von Lebensmitteln für Tiere und Menschen zu garantieren (Dressler und Saberi, 2009).

4.9 Biogasproduktionsanlagen

In der Landwirtschaft sind Futtersilos und Biogasproduktionsanlagen mögliche Brutstätten und Infektionsquellen für *C. botulinum* [1.9] und daher sind Untersuchungen zum Input und Output von *C. botulinum* bezüglich Biogasproduktionsanlagen wichtig. Die Integration einer Biogasproduktionsanlage in einen Bauernhof wird heutzutage oft praktiziert und so wird beispielsweise Bioethanol aus gekeimten Roggenkörnern und Molke hergestellt (Oleskowicz-Popiel *et al.*, 2012). Das Abwasser wird in zwei Fraktionen geteilt, wobei die eiweißreiche Feststofffraktion als Tierfutter verwendet und die flüssige Fraktion zusammen mit Kleegrassilage zur Biogaserzeugung fermentiert werden kann (Oleskowicz-Popiel *et al.*, 2012). Der Abfall dient als natürlicher Dünger (Oleskowicz-Popiel *et al.*, 2012). Aufgrund strikter Betriebsvorschriften und Regularien dürfen keine Risikomaterialien wie unbehandelte Schlachtabfälle, Hühnerkot sowie Speisereste aus der Gastronomie und Lebensmittelindustrie in Biogasanlagen eingebracht werden (Neser, 2007). Falls diese Substrate aufgrund ihrer hohen Energieausbeute zur Biogasgewinnung verwendet werden, müssen diese nach gesetzlichen Vorschriften zwingend einer intensiven Sterilisierung durch Hitzebehandlung (Dampfdrucksterilisierung, Pasteurisierung) unterzogen werden und dürfen nicht zusammen mit nachwachsenden Rohstoffen in den Herstellungsprozess eingebracht werden (Neser, 2007). Wenn mit den genannten Risikomaterialien sachgemäß umgegangen wird und eine entsprechende Hitzebehandlung vor dem Eintrag in die Anlage durchgeführt wird, sind Biogasanlagen nach momentanem Wissensstand in Sachen Pathogenität nicht gefährlicher als Gülle anzusehen (Neser, 2007). Darüber hinaus trägt auch das

Silagemanagement essentiell zu den tiergesundheitlichen Aspekten bei. In Holland gab es eine Reihe von Fällen von Botulismus bei Rindern, die mit Biertreber gefüttert wurden, in dem nachträglich sowohl Bakterienstämme von *C. botulinum* als auch von diesen gebildetes Toxin gefunden bzw. nachgewiesen werden konnten (Notermans *et al.*, 1979). Der Kot infizierter Tiere enthielt eine große Zahl von *C. botulinum* (10^5 bis $10^7/g$), was wiederum die Weide, auf der sie grasten, stark kontaminierte (Notermans *et al.*, 1979; Notermans *et al.*, 1981). Wird aus dieser kontaminierten Weide zudem Silage produziert, so enthält auch diese *C. botulinum* und somit kann die Kontamination verschleppt bzw. auf andere Tierbestände ausgeweitet werden (Notermans *et al.*, 1981). Landwirte, die Biogasrestgärmasse auf ihre Äcker und Wiesen als Dünger ausbringen, sollten eventuelle Risikomaterialien wie insbesondere Schlachtabfälle, Hühnerkot und Speiseabfälle unbedingt ordnungsgemäß vor dem Eintrag als Substrat in eine Biogasanlage hitzebehandeln, da ansonsten aus mikrobiologischer Sicht ein Risiko nicht ausgeschlossen werden kann. Da Fermenter zur Biogasproduktion bei unterschiedlichen Temperaturen betrieben werden, sollte in einem Experiment die potentielle Gefahr einer Kontamination durch Clostridien analysiert werden [Abbildung 3.1]. Auf 16S-rDNS-Ebene ließ sich ein Nachweis vorhandener Clostridien-Arten erbringen [Abbildung 3.44 B], da Clostridien in anaerob geführten Fermentern einen wesentlichen Aspekt bei der Umsetzung der Biomasse zur Herstellung von Biogas darstellen. Mit den verwendeten Methoden konnte in keinem der beprobten Fermentern *C. botulinum bont* (A - F) nachgewiesen werden. Entweder waren die *bont* unterhalb des Detektionslimits vorhanden, oder es waren keine Toxin-produzierenden Arten in den entnommenen und beprobten Volumen enthalten. Da sich auch innerhalb der Anreicherungskulturen kein positiver Beweis erbringen ließ, kann die Möglichkeit der Anwesenheit von Sporen ausgeschlossen werden. Diese wären im Anreicherungsschritt in die vegetative Form übergegangen und hätten somit durch die Anreicherung erfasst werden müssen.

Ausblick

Übertragung von „chronischem Botulismus“ auf den Menschen?

Da *C. botulinum* das stärkste bekannte natürliche Toxin produziert und aufgrund der potentiellen Bedrohung des durch Lebensmittel übertragbaren Botulismus, ist dieser Organismus seit langen Jahren im Fokus der Lebensmittelindustrie und den Regulierungsbehörden. Um die Sicherheit von Lebensmitteln wie beispielsweise Konserven vor *C. botulinum* zu gewährleisten, werden strenge Provokationstests der Verarbeitungsbedingungen und der Zusammensetzungen von Lebensmitteln routinemäßig durchgeführt (Bradshaw *et al.*, 2010).

Es konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass Clostridien in den interzellulären Raum der Wurzeln von Weißklee gelangen können. Eine systemische Ausbreitung von *C. botulinum* zu höherliegenden Kompartimenten der Pflanzen, wie dem Spross, konnte mit den PCR-basierten Detektionssystemen bewiesen werden. Daher ergeben sich Konsequenzen hinsichtlich der Lebensmittelsicherheit. Rinderbotulismus wurde in vielen Ländern als eine mögliche Quelle für humanen Botulismus in Betracht gezogen.

So wurden 2012 in einer Studie von Krüger *et al.* von 41 Milchviehbetrieben in Schleswig-Holstein 196 Stuhlproben von erkrankten Kühen, 77 Stuhlproben von Landwirten und Familienmitgliedern aus 26 dieser Betriebe, 35 Futtermittelproben und 7 Hausstaubproben auf *C. botulinum* und seine Antigene hin untersucht. Vier der untersuchten Menschen zeigten Symptome von Säuglings- bzw. viszeralem Botulismus, außerdem wurden *C. botulinum*-Antigene nachgewiesen (Dressler und Saberi, 2009). Die Ergebnisse zeigten für Kühe und Menschen unterschiedliche *C. botulinum*-Toxintypen. Toxin-Typ A war im Kot der Kuh dominant, während Typ E in Menschen gefunden wurde. Typ E war auch in einigen Tierfutterproben präsent. Umgekehrt war Toxin-Typ A im Hausstaub der Betriebe verbreitet. Es kann angenommen werden, dass die Futtermittel die Quelle der menschlichen Besiedlung mit *C. botulinum* waren (Krüger *et al.*, 2012). Nach Aussage eines Neurologen der Medizinischen Hochschule Hannover, Dr. Dirk Dresslers, zeigten sich z.T. auch bei den Landwirten ähnliche Symptome wie körperliche Schwäche analog zu den erkrankten Tieren. „Chronischer Botulismus“ wurde bei Landwirten in infizierten Milchviehbetrieben diagnostiziert, welche die erkrankten Tiere versorgten und über einen längeren Zeitraum in engem Kontakt zu den infizierten Tieren standen. Im Verlauf erkrankten neben den Landwirten nachweislich auch einige Tierärzte ebenso wie die Familien infizierter Landwirte an „chronischem Botulismus“, einer seltenen Erkrankungsform beim Menschen (Rodloff und Krüger, 2012). Da Menschen und Tiere gleichermaßen betroffen sind, scheint die Erkrankung von Rindern auf den Menschen übergehen zu können. Die Entstehungsbedingungen und Intoxikationswege des „chronischen Botulismus“, sowie mögliche

Übertragungswege vom Tier auf den Menschen müssen genauer untersucht und geklärt werden. Milch von Milchvieh, das durch Futter, Wasser oder andere Umweltfaktoren infiziert wurde, kann den Erreger beinhalten (Böhnel und Gessler, 2013). Ein potentielles Risiko des Vorkommens von *C. botulinum* in Rindern ist ein Übergang des Toxins auf Milchprodukte und somit die Gefährdung des Menschen (Lindström *et al.*, 2010). Neben Routineproben wurden weitere 99 Milchproben aus 37 Bauernhöfen und 51 Euterproben von durch Botulismus betroffenen Farmen mittels des *Maus-Bioassay* getestet (Böhnel und Gessler, 2013). Die Milch von drei Betrieben (8,1%) enthielt Botulinumtoxin, die Milch von zwei Betrieben (5,4%) Bakterien von *C. botulinum*. Zehn Euterproben (19,6%) enthielten Toxin und 7 der Proben (13,7%) Bakterien. Darunter war ein Fall, in dem sowohl Toxin als auch Bakterien gefunden wurden (Böhnel und Gessler, 2013). Positive Milchproben hinsichtlich Botulinumtoxin oder Bakterien stellen in Sachen Lebensmittelsicherheit für den menschlichen Verbraucher eine große Gefahr dar. Ein besseres Verständnis der Pflanzen-Mikroben Interaktionen, sowie der Umwelt und verarbeitungsbezogenen Faktoren, die eine Kontamination beeinflussen, als auch die Handhabung von Lebensmitteln, werden die Entwicklung evidenzbasierter Richtlinien, Verfahren und Technologien zur Verringerung der Gefahr einer Kontamination von frischen Lebensmittelprodukten ermöglichen (Berger *et al.*, 2010). Daher scheint es von großer Bedeutung zu sein, möglichst früh im Prozess der Verbreitung von *C. botulinum* im Landbau zu intervenieren. Die mögliche Kolonisierung von Futterpflanzen durch *C. botulinum* ist dabei von besonderer Bedeutung.

Das Krankheitsbild „chronischer Botulismus“ wird durch eine chronische Toxikoinfektion hervorgerufen, wobei eine normale Darmflora einen kritischen Faktor bei der Verhinderung einer Darmbesiedlung durch *C. botulinum* darstellt. Zahlreiche Bakterien, wie Milchsäureproduzierende Bakterien (z.B. *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Enterococcus*) erzeugen im Magen-Darm-Trakt Bakteriozine gegen *Clostridium* spp. (z.B. *C. botulinum*) und andere Krankheitserreger. Wissenschaftler und Veterinäre warnen vor einer besorgniserregenden Ausbreitung und bezeichnen „chronischen Botulismus“ als ein sehr ernst zu nehmendes Problem mit gehäuften Todesfällen und zum Teil sehr hohen Verlustraten in Milchviehbeständen. Nach Angaben von Prof. Helge Böhnel sind bundesweit schon rund 1.000 landwirtschaftliche Betriebe betroffen (persönliche Mitteilung). Offizielle Zahlen liegen jedoch nicht vor, da „chronischer Botulismus“ bei Tieren als Krankheit nicht meldepflichtig ist. Die steigenden Zahlen zeigen, dass „chronischer Botulismus“ als Faktorenerkrankung beim Rind existent zu sein scheint, wobei es sich aufgrund des Fehlens der Ursächlichkeit bis heute um kein wissenschaftlich anerkanntes Krankheitsbild handelt. Eine Ansteckungsgefahr für den Menschen kann nicht ausgeschlossen werden (Rodloff und Krüger, 2012).

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben weltweit die Fälle von Botulismus bei Rindern zugenommen. Da der Verdacht besteht, dass die Infektion mit *Clostridium botulinum* über das Futter hervorgerufen wurde, sollte das Besiedlungsverhalten von *C. botulinum* auf Weißklee (*Trifolium repens*) untersucht werden. Das Neurotoxin (BoNT D) produzierende Bakterium *C. botulinum* 2301 bzw. der apathogene *C. sporogenes*-Stamm 1739 wurden in dieser Arbeit in Kombination mit *Rhizobium leguminosarum* DSM 6039 hinsichtlich ihrer Interaktion mit Weißklee (*T. repens*) und Gras (*Lolium perenne*) als Futterpflanzen untersucht. Mittels Inokulationsexperimenten mit verschiedenen Pflanzsystemen und *in situ*-Lokalisierung (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung [FISH] mit domänen- und gattungsspezifischen Oligonukleotidsonden; fluoreszierende Reportergenmarkierung (*evoglow*)) wurde die Wurzelbesiedlung in Kombination mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) analysiert. In Wachstumsversuchen wurden Pflanzen mit vegetativen *C. botulinum*-Zellen bzw. Sporen inokuliert und in axenischen (Quarzsand) bzw. Bodensystemen (landwirtschaftlicher Boden, Gärtnererden) in einer Phytokammer unter definierten Kulturbedingungen angezogen. Nach Abschluss der Wachstumsphase wurde aus dem Pflanzenmaterial nach selektiver Anreicherung der Bakterien DNS isoliert, mittels der es möglich war, die inokulierten Bakterien, sowohl in Wurzel- als auch in Sprossmaterial, zu detektieren. Um eine systemische Ausbreitung von Toxin-produzierenden *C. botulinum*-Stämmen von der Wurzel in die verschiedenen Pflanzenkompartimente zu überprüfen, wurden spezifische PCR-gestützte Nachweise mit verschiedenen Primer-Paaren durchgeführt. Mit einem PCR-System konnte durch Detektion eines 16S-rDNS-Fragments (P930/P932) die Gattung *Clostridium* nachgewiesen werden. Mit Hilfe von zwei weiteren PCR-Ansätzen, die Fragmente des *bontD* kodierenden Toxin-Gens amplifizierten (DS11/DS22 (497 bp), BoNT/CD-Multiplex-PCR (462 bp bzw. 128 bp)), war es möglich, den *C. botulinum*-Stamm spezifisch nachzuweisen. Anhand der PCR-Nachweise konnte mit DNS aus den verschiedenen Teilen der Pflanze gezeigt werden, dass sowohl apathogene (1739) als auch pathogene (2301) Clostridien-Arten Weißklee sowohl oberflächlich als auch endophytisch besiedeln können.

In den Wachstumsexperimenten mit Weißklee (*T. repens*) und deutschem Weidelgras (*L. perenne*) zeigten sich sowohl in der Wurzel als auch im Spross Unterschiede bezüglich des Wachstums zwischen den mit Clostridien inokulierten Pflanzen und den Kontrollpflanzen. Dies weist auf einen pflanzenwachstumsfördernden Effekt der Clostridien hin. Die inokulierten Pflanzen zeigten ein besseres Wachstum (Sprossgröße, Feucht- und Trockengewicht) und ein größeres Wurzelsystem (längere Wurzeln, mehr Seitenwurzeln, mehr Verzweigungen).

Die inokulierten Bakterien wurden in Lokalisierungsstudien durch FISH mittels spezifischer Clostridien-Sonde (CHIS150) sowie einer generellen Bakterien-Sonde (EUB338-I, II, III) und Erstellung von 3D-orthogonalen Bildstapeln mittels optischer Schnitte (z-scans) am CLSM im Pflanzenmaterial detektiert. Zudem wurden auch fluoreszenzmarkierte Stämme, die mittels Elektroporation mit einem Plasmid (*evoglow*[®], Fluoreszenz hervorrufendes Reporterogen, (FbFP)) transformiert worden waren, zur Inokulation axenisch wachsender Pflanzen eingesetzt. Die inokulierten, fluoreszierenden Clostridien konnten nach 4 Wochen Wachstum im axenischen Pflanzsystem am CLSM innerhalb des Pflanzenmaterials lokalisiert werden. Eine detaillierte Analyse des Kolonisierungsverhaltens zeigte, dass *C. botulinum* in einzelnen Zellen, Zellclustern und Mikrokolonien im Wurzelraum und innerhalb der Wurzeln von Weißklee vorkommen kann. Die Clostridien besiedelten primär die lateralen Wurzeln, an denen Wurzelhaare von der Hauptwurzel gebildet werden, wobei sie auch in den interzellulären Räumen (endophytisch) der Wurzelrinde von Weißklee und im Gewebe der Pflanzenwurzeln nachgewiesen werden konnten. Eine systemische Ausbreitung von *C. botulinum* in der Pflanze von der Wurzel zum Spross konnte gezeigt werden. Durch den *in situ*-Nachweis und der Lokalisierung der Clostridien mit Hilfe der FISH-Technik mit spezifischen Oligonukleotidsonden und der *evoglow*-Markierung in Kombination mit CLSM konnte gezeigt werden, dass sowohl apathogene (1739) als auch pathogene (2301) *Clostridium*-Stämme verschiedene Teile der Weißkleepflanzen (Wurzel und Spross) auch endophytisch kolonisieren können und in der Lage sind, in pflanzlichen Geweben zu persistieren.

Um auf das Vorhandensein von Toxin-produzierenden *C. botulinum*-Stämmen in anaerob geführten Fermentern zur Biogasgewinnung zu testen, wurden stichprobenartig an unterschiedlichen Stellen im Produktionsablauf Proben entnommen, aus denen (mit und ohne Anreicherung) DNS isoliert wurde. Mit den verwendeten spezifischen, PCR-basierten Nachweissystemen, bei denen für BoNT A – F kodierende Fragmente amplifiziert werden, konnten die entnommenen Proben auf pathogene Clostridien-Stämme überprüft werden.

Summary

In recent years, the world's cases of botulism in cattle have increased. Infections in humans have been reported in the respective farms. Since it is suspected that infection with *Clostridium botulinum* has been caused over food, the colonization behavior of *C. botulinum* on clover (*Trifolium repens*) should be investigated.

In this work the neurotoxin (BoNT D) producing *C. botulinum* strain 2301 as well as the non-toxin-producing *C. sporogenes* strain 1739 were investigated in combination with *Rhizobium leguminosarum* DSM 6039 for their interaction with clover (*T. repens*) and grass (*Lolium perenne*). By the use of inoculation experiments with different growth systems and *in situ* localization by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with domain and genus-specific oligonucleotide probes and fluorescent reporter gene constructions the efficiency of root colonization using confocal laser scanning microscopy (CLSM) was analyzed. In growth experiments plants were inoculated with vegetative cells or spores of *C. botulinum* and grown in axenic (quartz sand) and soil systems (agricultural soil, gardener soil) within a phytochamber under defined culture conditions. After the growth phase plants were harvested and an enrichment step of the bacteria was performed before DNA was isolated. It was possible to detect the inoculated bacteria in the plant material, both in root and shoot. To test for a systemic spreading from the root to the shoot of toxin-producing *C. botulinum* strains within the plant material specific PCRs with different primer pairs which amplify a fragment of *bont D* gene, were performed. After optimization of the detection systems one PCR system could be used to amplify a 16S-rDNA fragment (P930/P932) of the genus *Clostridia* and two further PCR approaches, whose amplify a fragment coding for BoNT D toxin (DS11/DS22 (497 bp), BoNT CD-multiplex (462 bp and 128 bp)), to detect *C. botulinum* strain exclusively. Using specific PCR detection with DNA from different parts of the plant, it could be shown that both non-pathogenic (1739) and pathogenic (2301) clostridial strains can colonize clover both on the surface (detection of bacterial DNA in washing water) and endophytically (detection of bacterial DNA in the shoot material).

In the growth experiments with clover (*T. repens*) and grass (*L. perenne*), significant differences in growth of the roots and the shoots between *Clostridia* inoculated plants and control plants were noticeable, indicating a plant growth promoting effect of *Clostridia*. The inoculated plants showed an increased growth index (shoot size, wet and dry weight) and a larger root system with longer roots which had more lateral roots or branches. In addition to localization studies of inoculated bacteria in plant material by FISH using the specific clostridial probe (CHIS150) and a general bacterial probe (EUB338-I, II, III) also fluorescently labeled strains (transformed by electroporation with a plasmid (*evoglow*®, FbFP)) were used to inoculate axenically grown plants. Applying CLSM-analysis 3D orthogonal image stacks were created by means of optical sections (z-scans) and the inoculated fluorescent *Clostridia*

could be identified and located within the plant material after 4 weeks of growth in an axenic planting system. Detailed analysis of the colonization behavior showed, that *C. botulinum* can occur in individual cells, cell clusters and microcolonies in the roots and within the vascular bundles of clover roots. The *Clostridia* colonized primarily the lateral roots, where root hairs are formed from the main root, but they could also be detected in the intracellular spaces (endophytic) and in the root cortex of clover roots. A systemic spreading of *C. botulinum* in the plant to higher compartments (shoot) could be shown. Both, non-pathogenic (1739) and pathogenic (2301) *Clostridium* strains, can colonize different parts of the clover plants (root and shoot) endophytically and are able to persist in plant tissues.

To test for the presence of toxin-producing *C. botulinum* strains in anaerobic biogas production digesters, DNA was isolated from randomly taken samples with and without enrichment of different points during production process. By the use of specific PCR based detection systems, in which coding fragments for BoNT A - F are amplified, samples could be tested for pathogenic, BoNT producing clostridial strains.

Abstract

The Colonization behavior and interaction of Botulinum neurotoxin (BoNT D) producing *Clostridium botulinum* strain 2301 and non-toxin-producing *Clostridium sporogenes* 1739 in combination with *Rhizobium leguminosarum* on clover (*Trifolium repens*) and grass were investigated in this study. Inoculation experiments and *in situ* localization with species-specific oligonucleotide probes and fluorescent reporter gene construction and subsequent microscopic detection by confocal laser scanning microscopy demonstrated efficiency and characteristics of root colonization by selected clostridial strains. Inoculated plants were grown axenically and in soil systems within a phytochamber under defined culture conditions. To test for systemic spreading of bacteria within the plant material, PCR systems amplifying a fragment of 16S rDNA or a specific *bont* D toxin gene fragment, to detect exclusively *C. botulinum*, were performed.

For localization studies of the inoculated bacterial strains in plant material FISH using specific clostridial probe (CHIS150) and a general bacterial probe (EUB338-I, II, III) in combination with 3D orthogonal stack images (z-scans) CLSM were used. In addition to localization studies by FISH also fluorescently labeled strains (*evoglow*®, FbFP) were used to inoculate plants.

Using DNA from different plant parts, it could be shown that non-pathogenic and pathogenic *Clostridia* can effectively colonize clover roots epi- and endophytically and are able to persist in plant tissues. Significant differences in growth of clover were noticeable, indicating a plant growth promoting effect of *Clostridia*. The inoculated plants show an increased growth index (shoot size, wet and dry weight) and a larger root system. Detection of inoculated *Clostridia* by FISH and fluorescent labelling within plant material after 4 weeks of growth were possible, both in root and shoot. Analysis of colonization behavior showed that *C. botulinum* can occur in individual cells, cell clusters and microcolonies within the rhizosphere, lateral roots and within the root tissues of clover. Systemic spreading and translocation of *C. botulinum* to the aerial plant parts (stems and leaves) could be shown with PCR-based detection methods. The presence of pathogenic, toxin-producing *C. botulinum* strains in anaerobic biogas production plants was tested with DNA isolation and amplification of coding fragments for BoNT A - F from randomly taken samples.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott, L K und C Gazey. 1994. "An ecological view of the formation of VA mycorrhizas." *Plant and Soil* **159**: 69–78.
- Aguirre-Balsalobre, F, M González-Herrera, E Mengual-Verdú, V García-Conca und J R Hueso-Abancens. 2007. "Simultaneous botulism in two brothers addicted to cocaine." *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* **82**: 583–6.
- Akbulut, D, J Dennis, M Gent, K A Grant, V Hope, C Ohai, J McLauchlin, V Mithani, O Mpamugo, F Ncube und L de Souza-Thomas. 2005. "Wound botulism in injectors of drugs: upsurge in cases in England during 2004." *Euro surveillance: European communicable disease bulletin* **10**: 172–4.
- Aktories, K, U Weller und G S Chhatwal. 1987. "*Clostridium botulinum* type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin." *FEBS letters* **212**: 109–13.
- Alexander, J E, P W Andrew, D Jones und I S Roberts. 1990. "Development of an optimized system for electroporation of *Listeria* species." *Letters in applied microbiology* **10**: 179–181.
- Amann, R I, B J Binder, R J Olson, S W Chisholm, R Devereux und D A Stahl. 1990a. "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations." *Applied and environmental microbiology* **56**: 1919–25.
- Amann, R I, L Krumholz und D A Stahl. 1990b. "Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology." *Journal of bacteriology* **172**: 762–70.
- Amann, R I, W Ludwig und K H Schleifer. 1995. "Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation." *Microbiological reviews* **59**: 143–69.
- Amann, R I, N Springer, W Ludwig, H D Görtz und K H Schleifer. 1991. "Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts." *Nature* **351**: 161–164.
- Amann, R I, B Zarda, D a Stahl und K H Schleifer. 1992. "Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes." *Applied and environmental microbiology* **58**: 3007–11.
- Amann, R und B M Fuchs. 2008. "Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques." *Nature reviews. Microbiology* **6**: 339–48.
- Andreesen, J R, H Bahl und G Gottschalk. 1989. "Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*." In: *Biotechnology Handbooks: Volume 3: Clostridia*, hg von. N P Minton und D J Clarke, 27–34. New York: Plenum Press.
- Arango, L, K Buddrus-Schiemann, K Opelt, T Lueders, F Haesler, M Schmid, D Ernst und A Hartmann. 2014. "Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup Ready soybean." *European Journal of Soil Biology* **63**: 41–48.
- Aravalli, R N und R A Garrett. 1997. "Shuttle vectors for hyperthermophilic archaea." *Extremophiles* **1**: 183–191.
- Arndt, J W, Q Chai, T Christian und R C Stevens. 2006. "Structure of botulinum neurotoxin type D light chain at 1.65 Å resolution: repercussions for VAMP-2 substrate specificity." *Biochemistry* **45**: 3255–62.
- Arnon, S S und J Chin. 1979. "The clinical spectrum of infant botulism." *Reviews of infectious diseases* **1**: 614–24.
- Arnon, S S, R Schechter, T V Inglesby, D A Henderson, J G Bartlett, M S Ascher, E Eitzen, A D Fine, J Hauer, M Layton, S Lillibridge, M T Osterholm, T O'Toole, G Parker, T M Perl, P K Russell, D L Swerdlow und K Tonat. 2001. "Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management." *JAMA* **285**: 1059–70.
- Arnon, S S, R Schechter, S E Maslanka, N P Jewell und C L Hatheway. 2006. "Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism." *The New England journal of medicine* **354**: 462–71.
- Assmus, B, P Hutzler, G Kirchhof, R Amann, J R Lawrence und A Hartmann. 1995. "*In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy." *Applied and environmental microbiology* **61**: 1013–9.
- Aune, T E V und F L Aachmann. 2010. "Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed." *Applied microbiology and biotechnology* **85**: 1301–1313.
- Bakheit, A M, C D Ward und D L McLellan. 1997. "Generalised botulism-like syndrome after intramuscular injections of botulinum toxin type A: a report of two cases." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **62**: 198.
- Barash, J R und S S Arnon. 2004. "Dual toxin-producing strain of *Clostridium botulinum* type Bf isolated from a California patient with infant botulism." *Journal of clinical microbiology* **42**: 1713–5.

- Barash, J R und S S Arnon. 2014. "A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins." *The Journal of infectious diseases* **209**: 183–91.
- Bengston, I A. 1922. "Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilla caesar*." *Public Health Rep* **37**: 164–170.
- Bengston, I.A. 1924. "Studies on organisms concerned as causative factors in botulism." *Hygiene Laboratory Bulletin*. Washington DC: US Public Health Service. **136**.
- Berg, G, L Eberl und A Hartmann. 2005. "The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria." *Environmental microbiology* **7**: 1673–85.
- Berger, C N, S V Sodha, R K Shaw, P M Griffin, D Pink, P Hand und G Frankel. 2010. "Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens." *Environmental microbiology* **12**: 2385–97.
- Binz, T, H Kurazono, M R Popoff, M W Eklund, G Sakaguchi, S Kozaki, K Krieglstein, A Henschen, D M Gill und H Niemann. 1990a. "Nucleotide sequence of the gene encoding *Clostridium botulinum* neurotoxin type D." *Nucleic acids research* **18**: 5556.
- Binz, T, H Kurazono, M Wille, J Frevert, K Wernars und H Niemann. 1990b. "The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins." *The Journal of biological chemistry* **265**: 9153–8.
- Böhnel, H und F Gessler. 2005. "Botulinum toxins – cause of botulism and systemic diseases?" *Veterinary Research Communications* **29**: 313–345.
- Böhnel, H und F Gessler. 2013. "Presence of *Clostridium botulinum* and botulinum toxin in milk and udder tissue of dairy cows with suspected botulism." *The Veterinary record* **172**: 397.
- Böhnel, H und K Lube. 2000. " *Clostridium botulinum* and bio-compost. A contribution to the analysis of potential health hazards caused by bio-waste recycling." *Journal of veterinary medicine. B* **47**: 785–95.
- Böhnel, H, B Neufeld und F Gessler. 2005. "Botulinum neurotoxin type B in milk from a cow affected by visceral botulism." *Veterinary journal* **169**: 124–5.
- Böhnel, H, B. Schwagerick und F. Gessler. 2001. "Visceral botulism - a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication." *Journal of veterinary medicine. A* **48**: 373–83.
- Böhnel, H, U Wernery und F Gessler. 2003. "Two cases of equine grass sickness with evidence for soil-borne origin involving botulinum neurotoxin." *Journal of Veterinary Medicine Series B* **50**: 178–182.
- Bonventre, P F, R E Lincoln und C Lamanna. 1967. "Status of bacterial toxins and their nomenclature: need for discipline and clarity of expression." *Bacteriological reviews* **31**: 95–109.
- Bossi, P, A Tegnell, A Baka, F van Loock, J Hendriks, A Werner, H Maidhof und G Gouvras. 2004. "Bichat guidelines for the clinical management of botulism and bioterrorism-related botulism." *Euro surveillance: European communicable disease bulletin* **9**: E13–4.
- Bourhis, AG Le und Katiana Saunier. 2005. "Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis." *Applied and environmental microbiology* **71**: 29–38.
- Bradshaw, Marite, Kristin M Marshall, John T Heap, William H Tepp, Nigel P Minton und Eric A Johnson. 2010. "Construction of a nontoxicogenic *Clostridium botulinum* strain for food challenge studies." *Applied and environmental microbiology* **76**: 387–93.
- Brandl, M T. 2006. "Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety." *Annual review of phytopathology* **44**: 367–92.
- Brigidi, P, E De Rossi, M L Bertarini, G Riccardi und D Matteuzzi. 1990. "Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis* by electroporation." *FEMS microbiology letters* **55**: 135–138.
- Burgen, A S V, F Dickens und L J Zatman. 1949. "The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction." *The Journal of physiology* **109**: 10–24.
- Burke, G S. 1919. "Notes on *Bacillus botulinus*." *Journal of bacteriology* **4**: 555–570.1.
- Burr, D H und H Sugiyama. 1982. "Susceptibility to enteric botulinum colonization of antibiotic-treated adult mice." *Infection and immunity* **36**: 103–6.
- Cameron, C M. 2009. "A brief history of botulism in South Africa." *The Onderstepoort journal of veterinary research* **76**: 11–2.

- Cato, E P, W L George und S M Finegold. 1986. "Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23" In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*, hg von. P H A Sneath, N S Mair, M E Sharpe, und J G Holt. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Chertow, D S, E T Tan, S E Maslanka, J Schulte, E A Bresnitz, R S Weisman, J Bernstein, S M Marcus, S Kumar, J Malecki, J Sobel und Christopher R Braden. 2006. "Botulism in 4 adults following cosmetic injections with an unlicensed, highly concentrated botulinum preparation." *JAMA* **296**: 2476–9.
- Chia, J K, J B Clark, C A Ryan und M Pollack. 1986. "Botulism in an adult associated with food-borne intestinal infection with *Clostridium botulinum*." *The New England journal of medicine* **315**: 239–41.
- Chulkova, I F, T I Bulatova und L I Anisimova. 1976. "Contamination of fish by agents of botulism type F and differentiating it from type E." *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*: 74–6.
- Collins, M D und a K East. 1998. "Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins." *Journal of applied microbiology* **84**: 5–17.
- Collins, M D, P a Lawson, A Willems, J J Cordoba, J Fernandez-Garayzabal, P Garcia, J Cai, H Hippe und J a Farrow. 1994. "The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations." *International journal of systematic bacteriology* **44**: 812–26.
- Cooley, M B, W G Miller und R E Mandrell. 2003. "Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*." *Applied and environmental microbiology* **69**: 4915–26.
- Couesnon, A, Y Pereira und M R Popoff. 2008. "Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers." *Cellular microbiology* **10**: 375–87.
- Couesnon, A, S Raffestin und M R Popoff. 2006. "Expression of botulinum neurotoxins A and E, and associated non-toxin genes, during the transition phase and stability at high temperature: analysis by quantitative reverse transcription-PCR." *Microbiology* **152**: 759–70.
- Critchley, E M. 1991. "A comparison of human and animal botulism: a review." *Journal of the Royal Society of Medicine* **84**: 295–8.
- Critzer, F J und M P Doyle. 2010. "Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce." *Current opinion in biotechnology* **21**: 125–30.
- Cummings, K, E Barrett, J C Mohle-Boetani, J T Brooks, J Farrar, T Hunt, A Fiore, K Komatsu, S B Werner und L Slutsker. 2001. "A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes." *Emerging infectious diseases* **7**: 1046–8.
- Daims, H, A Brühl, R I Amann, K H Schleifer und M Wagner. 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**: 434–44.
- Daims, H, S Lückner und M Wagner. 2006. "Daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research." *Environmental microbiology* **8**: 200–13.
- Davis, T O, I Henderson, J K Brehm und N P Minton. 2000. "Development of a transformation and gene reporter system for group II, non-proteolytic *Clostridium botulinum* type B strains." *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **2**: 59–69.
- Dekleva, M L und B R DasGupta. 1989. "Nicking of single chain *Clostridium botulinum* type A neurotoxin by an endogenous protease." *Biochemical and biophysical research communications* **162**: 767–72.
- DeLong, E F, G S Wickham und N R Pace. 1989. "Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells." *Science* **243**: 1360–1363.
- Dodds, K L. 1993. "*Clostridium botulinum* in the environment." In: *Clostridium botulinum: Ecology and control in foods*, hg von. A H W Hauschild und K L Dodds, 27–35. New York: M. Dekker.
- Dower, W J, J F Miller und C W Ragsdale. 1988. "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation." *Nucleic acids research* **16**: 6127–6145.
- Drepper, T, R Huber, A Heck, F Circolone, A K Hillmer, J Büchs und K E Jaeger. 2010. "Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative in vivo real-time reporters." *Applied and environmental microbiology* **76**: 5990–4.
- Dressler, D und F A Saberi. 2009. "Botulinum toxin: from drug to poison." *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* **77 Suppl 1**: S49–54.

- Düll, R und H Kutzelnigg. 2011. " *Taschenlexikon der Pflanzen Deutschlands und angrenzender Länder.*" 7. Aufl. Quelle & Meyer.
- Dunny, G M, L N Lee und D J LeBlanc. 1991. "Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria." *Applied and environmental microbiology* **57**: 1194–1201.
- Dürre, P. 2008. "Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**: 353–362.
- Eklund, M W und F T Poysky. 1966. "Growth and toxin production of *Clostridium botulinum* types E, nonproteolytic B, and F in nonirradiated and irradiated fisheries products in the temperature range of 38 degrees to 50 degrees F. TID-24882." *TID [reports]. U.S. Atomic Energy Commission*: 1–70.
- Eklund, M W und F T Poysky. 1972. "Activation of a Toxic Component of *Clostridium botulinum* Types C and D by Trypsin." *Applied microbiology* **24**: 851.
- Eklund, M W und F T Poysky. 1974. "Interconversion of type C and D strains of *Clostridium botulinum* by specific bacteriophages." *Applied microbiology* **27**: 251–8.
- Eklund, M W, F T Poysky, L M Mseitif und M S Strom. 1988. "Evidence for plasmid-mediated toxin and bacteriocin production in *Clostridium botulinum* type G." *Applied and environmental microbiology* **54**: 1405–8.
- Eklund, M W, F T Poysky und D I Wieler. 1966. "Growth and toxin production of *Clostridium botulinum* types E, nonproteolytic B, and F in nonirradiated and irradiated fisheries products in the temperature range of 36 degrees to 72 degrees F. TID-24881." *TID [reports]. U.S. Atomic Energy Commission*: 1–86.
- Eklund, M W, F T Poysky und D I Wieler. 1967. "Characteristics of *Clostridium botulinum* type F isolated from the Pacific Coast of the United States." *Applied microbiology* **15**: 1316–23.
- Emodi, A S und R V Lechowich. 1969. "Chromatographic purification of the toxin of type E *Clostridium botulinum*." *Biochemical and biophysical research communications* **35**: 788–95.
- van Ermengem, E. 1897. "Über einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus." *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* **26**: 1–56.
- Evelsizer, D D, R G Clark und T K Bollinger. 2010. "Relationships between local carcass density and risk of mortality in molting mallards during avian botulism outbreaks." *Journal of wildlife diseases* **46**: 507–13.
- Fenicia, L, F Anniballi und P Aureli. 2007. "Intestinal toxemia botulism in Italy, 1984-2005." *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* **26**: 385–94.
- Franche, C, K Lindström und C Elmerich. 2008. "Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants." *Plant and Soil* **321**: 35–59.
- Franks, A H, H J Harmsen, G C Raangs, G J Jansen, F Schut und G W Welling. 1998. "Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes." *Applied and environmental microbiology* **64**: 3336–45.
- Franz, E und A H C van Bruggen. 2008. "Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain." *Critical reviews in microbiology* **34**: 143–61.
- Freedman, M, R M Armstrong, J M Killian und D Boland. 1986. "Botulism in a patient with jejunoileal bypass." *Annals of neurology* **20**: 641–3.
- Gaiero, Jonathan R, Crystal A McCall, Karen A Thompson, Nicola J Day, Anna S Best und Kari E Dunfield. 2013. "Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion." *American journal of botany* **100**: 1738–50.
- Galey, F D. 2001. "Botulism in the horse." *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* **17**: 579–88.
- Galey, F D, R Terra, R Walker, J Adaska, M A Etchebarne, B Puschner, E Fisher, R H Whitlock, T Rocke, D Willoughby und E Tor. 2000. "Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat." *Journal of veterinary diagnostic investigation* **12**: 204–209.
- Gao, Q Y, Y F Huang, J G Wu, H D Liu und H Q Xia. 1990. "A review of botulism in China." *Biomedical and environmental sciences : BES* **3**: 326–36.
- Gessler, F und H Böhnel. 2006. "Persistence and mobility of a *Clostridium botulinum* spore population introduced to soil with spiked compost." *FEMS microbiology ecology* **58**: 384–93.
- Gessler, F, K Hampe und H Böhnel. 2005. "Sensitive detection of botulinum neurotoxin types C and D with an immunoaffinity chromatographic column test." *Applied and environmental microbiology* **71**: 7897–903.

- Gil, L A F, C E P da Cunha, G M S G Moreira, F M Salvarani, R A Assis, F C F Lobato, M Mendonça, O A Dellagostin und F R Conceição. 2013. "Production and Evaluation of a Recombinant Chimeric Vaccine against *Clostridium botulinum* Neurotoxin Types C and D." *PLoS one* **8**: e69692.
- Giménez, D F und A S Ciccarelli. 1970a. "Another type of *Clostridium botulinum*." *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1. Abt. Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie.* **215**: 221–4.
- Giménez, D F und A S Ciccarelli. 1970b. "Distribution of *Clostridium botulinum* in Mendoza, Argentina." *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Pan American Sanitary Bureau* **69**: 505–10.
- Girardin, H, Ci E Morris, C Albagnac, N Dreux, C Glaux und C Nguyen-The. 2005. "Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments." *FEMS microbiology ecology* **54**: 287–95.
- Greene, S K, E R Daly, E A Talbot, L J Demma, S Holzbauer, N J Patel, T A Hill, M O Walderhaug, R M Hoekstra, M F Lynch und J A Painter. 2008. "Recurrent multistate outbreak of *Salmonella* Newport associated with tomatoes from contaminated fields, 2005." *Epidemiology and infection* **136**: 157–65.
- Greenwood, A G. 1985. "Diagnosis and treatment of botulism in lions." *The Veterinary record* **117**: 58–60.
- Gu, G, J Hu, J M Cevallos-Cevallos, S M Richardson, J A Bartz und A H C van Bruggen. 2011. "Internal colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in tomato plants." *PLoS one* **6**: e27340.
- Gunnison, J B, J R Cummings und K F Meyer. 1936. "*Clostridium botulinum* type E." *Proc Soc Exp Biol Med* **35**: 278–280.
- Guo, X, J Chen, R E Brackett und L R Beuchat. 2002. "Survival of *Salmonella* on tomatoes stored at high relative humidity, in soil, and on tomatoes in contact with soil." *Journal of food protection* **65**: 274–9.
- Hahn, D, R I Amann, W Ludwig, A D Akkermans und K H Schleifer. 1992. "Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides." *Journal of general microbiology* **138**: 879–887.
- Hall, J D, L M McCroskey, B J Pincomb und C L Hatheway. 1985. "Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism." *Journal of clinical microbiology* **21**: 654–5.
- Hartmann, A, M Singh und W Klingmüller. 1983. "Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indolacetic acid." *Can. J. Microbiol.* **29**: 916–923.
- Hartmann, A und W Zimmer. 1994. "Physiology of *Azospirillum*" In: *Azospirillum/plant associations*, hg von. Y Okon, 15–41. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Hartmann, A, M Schmid, D Van Tuinen und G Berg. 2008. "Plant-driven selection of microbes" *Plant and Soil* **321**: 235–257.
- Hassan, S A, A D Altalhi, Y A Gherbawy und B A El-Deeb. 2011. "Bacterial load of fresh vegetables and their resistance to the currently used antibiotics in Saudi Arabia." *Foodborne pathogens and disease* **8**: 1011–8.
- Hatheway, C L. 1995. "Botulism: the present status of the disease." *Current topics in microbiology and immunology* **195**: 55–75.
- Hatheway, C L und L M McCroskey. 1987. "Examination of feces and serum for diagnosis of infant botulism in 336 patients." *Journal of clinical microbiology* **25**: 2334–8.
- Hicks, R E, R I Amann und D A Stahl. 1992. "Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences." *Applied and environmental microbiology* **58**: 2158–2163.
- Hielm, S, J Björkroth, E Hyytiä und H Korkeala. 1998a. "Genomic analysis of *Clostridium botulinum* group II by pulsed-field gel electrophoresis." *Applied and environmental microbiology* **64**: 703–8.
- Hielm, S, J Björkroth, H Korkeala und E Hyytiä. 1998b. "Prevalence of *Clostridium botulinum* in Finnish trout farms: pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates." *Applied and environmental microbiology* **64**: 4161–7.
- Hielm, S, E Hyytiä, A B Andersin und H Korkeala. 1998c. "A high prevalence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples." *Journal of applied microbiology* **84**: 133–7.
- Hill, K K, T J Smith, C H Helma, L O Ticknor, B T Foley, R T Svensson, J L Brown, E a Johnson, L a Smith, R T Okinaka, P J Jackson und J D Marks. 2007. "Genetic diversity among Botulinum neurotoxin-producing clostridial strains." *Journal of bacteriology* **189**: 818–32.
- Hobbs, G. 1976. "*Clostridium botulinum* and its importance in fishery products." *Advances in food research* **22**: 135–85.

- Hoch, D H, M Romero-Mira, B E Ehrlich, A Finkelstein, B R DasGupta und L L Simpson. 1985. "Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 1692–6.
- Hofer, J W und J Davis. 1972. "Survival and dormancy of Clostridia spores." *Texas medicine* **68**: 80–1.
- Hofmann, A, D Fischer, A Hartmann und M Schmid. 2014. "Colonization of plants by human pathogenic bacteria in the course of organic vegetable production." *Frontiers in microbiology* **5**: 191.
- Holzer, E. 1962. "Botulism caused by inhalation." *Medizinische Klinik* **57**: 1735–8.
- Horby, P W, S J O'Brien, G K Adak, C Graham, J I Hawker, P Hunter, C Lane, A J Lawson, R T Mitchell, M H Reacher, E J Threlfall und L R Ward. 2003. "A national outbreak of multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce." *Epidemiology and infection* **130**: 169–78.
- Hubálek, Z und J Halouzka. 1991. "Persistence of *Clostridium botulinum* type C toxin in blow fly (*Calliphoridae*) larvae as a possible cause of avian botulism in spring." *Journal of wildlife diseases* **27**: 81–5.
- Huss, H H. 1980. "Distribution of *Clostridium botulinum*." *Applied and environmental microbiology* **39**: 764–9.
- Huss, H H und U Eskildsen. 1974. "Botulism in farmed trout caused by *Clostridium botulinum* type E; a preliminary report." *Nordisk veterinærmedicin* **26**: 733–8.
- Hutson, R A, D E Thompson, P A Lawson, R P Schocken-Itturino, E C Böttger und M D Collins. 1993. "Genetic interrelationships of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B, and F and other members of the *Clostridium botulinum* complex as revealed by small-subunit rRNA gene sequences." *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 273–83.
- Hutson, R A, Y Zhou, M D Collins, E A Johnson, C L Hatheway und H Sugiyama. 1996. "Genetic characterization of *Clostridium botulinum* type A containing silent type B neurotoxin gene sequences." *The Journal of biological chemistry* **271**: 10786–92.
- Hyytiä, E, S Hielm, J Björkroth und H Korkeala. 1999. "Biodiversity of *Clostridium botulinum* type E strains isolated from fish and fishery products." *Applied and environmental microbiology* **65**: 2057–64.
- Information, J D, M Loughlin, T J Swinfield, J K Brehm, D E Thompson und N P Minton. 1988. "Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation." *FEMS microbiology letters* **56**: 83–88.
- Inoue, K und H Iida. 1971. "Phage-conversion of toxigenicity in *Clostridium botulinum* types C and D." *Japanese journal of medical science & biology* **24**: 53–6.
- Jang, Y S, A Malaviya, C Cho, J Lee und S Y Lee. 2012. "Butanol production from renewable biomass by clostridia." *Bioresource Technology*.
- Jansen, B C, P C Knoetze und F Visser. 1976. "The antibody response of cattle to *Clostridium botulinum* types C and D toxoids." *The Onderstepoort journal of veterinary research* **43**: 165–73.
- Jin, C W, Y F He, C X Tang, P Wu und S J Zheng. 2006. "Mechanisms of microbially enhanced Fe acquisition in red clover (*Trifolium pratense*)." *Plant, Cell and Environment* **29**: 888–897.
- Jirásková, A, L Vitek, J Fevery, T Ruml und P Branny. 2005. "Rapid protocol for electroporation of *Clostridium perfringens*." *Journal of microbiological methods* **62**: 125–127.
- Johannsen, A. 1963. "*Clostridium botulinum* in Sweden and the adjacent waters." *J Appl Bacteriol* **26**: 43–47.
- Johnson, E A und M Bradshaw. 2001. "*Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective." *Toxicon* **39**: 1703–22.
- Johnson, J L und B S Francis. 1975. "Taxonomy of the Clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species." *Journal of general microbiology* **88**: 229–44.
- Keet, C A, C K Fox, M Margeta, E Marco, A L Shane, S J Dearmond, J B Strober und S P Miller. 2005. "Infant botulism, type F, presenting at 54 hours of life." *Pediatric neurology* **32**: 193–6.
- Kennedy, S und H Ball. 2011. "Botulism in cattle associated with poultry litter." *The Veterinary record* **168**: 638–9.
- Kerner, J. 1822. "*Das Fettgift oder die Fettsäure und ihre Wirkungen auf den thierischen Organismus, ein Beytrag zur Untersuchung des in verdorbenen Würsten giftig wirkenden Stoffes*". Stuttgart und Tübingen.
- Keto-Timonen, R, M Nevas und H Korkeala. 2005. "Efficient DNA fingerprinting of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F by amplified fragment length polymorphism analysis." *Applied and environmental microbiology* **71**: 1148–54.

- Kiritani, K, N Mitsui, S Nakamura und S Nishida. 1973. "Numerical taxonomy of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* strains, and their susceptibilities to induced lysins and to mitomycin C." *Japanese journal of microbiology* **17**: 361–72.
- Kirkwood, J, A Ghetler, J Sedman, D Leclair, F Pagotto, J W Austin und A A Ismail. 2006. "Differentiation of group I and group II strains of *Clostridium botulinum* by focal plane array Fourier transform infrared spectroscopy." *Journal of food protection* **69**: 2377–83.
- Kirma, N, J L Ferreira und B R Baumstark. 2004. "Characterization of six type A strains of *Clostridium botulinum* that contain type B toxin gene sequences." *FEMS microbiology letters* **231**: 159–64.
- Kleerebezem, R und M C M van Loosdrecht. 2007. "Mixed culture biotechnology for bioenergy production." *Current opinion in biotechnology* **18**: 207–12.
- Klerks, M, E Franz, M van Gent-Pelzer, C Zijlstra und A H C van Bruggen. 2007a. "Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency." *The ISME journal* **1**: 620–31.
- Klerks, M, M van Gent-Pelzer, E Franz, C Zijlstra und A H C van Bruggen. 2007b. "Physiological and molecular responses of *Lactuca sativa* to colonization by *Salmonella enterica* serovar Dublin." *Applied and environmental microbiology* **73**: 4905–14.
- Koenig, M G, A Spickard, M A Cardella und D E Rogers. 1964. "Clinical and laboratory observations on type E botulism in man." *Medicine* **43**: 517–45.
- Kreyden, O P, M L Geiges, R Böni und G Burg. 2000. "Botulinum toxin: from poison to drug. A historical review." *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **51**: 733–7.
- Krüger, M, A Große-Herrenthey, W Schrödl, A Gerlach und A Rodloff. 2012. "Visceral botulism at dairy farms in Schleswig Holstein, Germany: prevalence of *Clostridium botulinum* in feces of cows, in animal feeds, in feces of the farmers, and in house dust." *Anaerobe* **18**: 221–3.
- Krüger, M, A A Shehata, W Schrödl und A Rodloff. 2013. "Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*." *Anaerobe* **20**: 74–8.
- Krysinski, E P und H Sugiyama. 1981. "Nature of intracellular type A botulinum neurotoxin." *Applied and environmental microbiology* **41**: 675–8.
- Kutter, S, A Hartmann und M Schmid. 2006. "Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp." *FEMS microbiology ecology* **56**: 262–71.
- Lacy, D B, W Tepp, A C Cohen, B R DasGupta und R C Stevens. 1998. "Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity." *Nature structural biology* **5**: 898–902.
- Lamanna, C. 1959. "The most poisonous poison." *Science* **130**: 763–72.
- Landmann, G. 1904. "Über die Ursache der Darmstädter Bohnenvergiftung." *Hyg Rundschau* **10**: 449–52.
- Leclair, D, F Pagotto, J M Farber, B Cadieux und J W Austin. 2006. "Comparison of DNA fingerprinting methods for use in investigation of type E botulism outbreaks in the Canadian Arctic." *Journal of clinical microbiology* **44**: 1635–44.
- Leuchs, J. 1910. "Beiträge zur Kenntnis des Toxins und Antitoxins des *Bacillus botulinus*." *Ztschr Hyg u Infekt* **65**: 55–84.
- Lin, W J und E A Johnson. 1995. "Genome analysis of *Clostridium botulinum* type A by pulsed-field gel electrophoresis." *Applied and environmental microbiology* **61**: 4441–7.
- Lindström, M, R Keto, A Markkula, M Nevas, S Hielm und H Korkeala. 2001. "Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material." *Applied and environmental microbiology* **67**: 5694–9.
- Lindström, M, J Myllykoski, S Sivelä und H Korkeala. 2010. "*Clostridium botulinum* in cattle and dairy products." *Critical reviews in food science and nutrition* **50**: 281–304.
- Lindström, M, M Nevas, S Hielm, L Lähteenmäki, M W Peck und H Korkeala. 2003. "Thermal inactivation of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type E spores in model fish media and in vacuum-packaged hot-smoked fish products." *Applied and environmental microbiology* **69**: 4029–36.
- von Linné, C. 1753. "Species Plantarum." *Band 2, Impensis Laurentii Salvii, Holmiae*: 767.
- Lobo, L A, C J Smith und E R Rocha. 2011. "Flavin mononucleotide (FMN)-based fluorescent protein (FbFP) as reporter for gene expression in the anaerobe *Bacteroides fragilis*." *FEMS microbiology letters* **317**: 67–74.

- Lövenklev, M, I Artin, O Hagberg, E Borch, E Holst und P Rådström. 2004a. "Quantitative interaction effects of carbon dioxide, sodium chloride, and sodium nitrite on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B." *Applied and environmental microbiology* **70**: 2928–34.
- Lövenklev, M, E Holst, E Borch und P Rådström. 2004b. "Relative neurotoxin gene expression in *Clostridium botulinum* type B, determined using quantitative reverse transcription-PCR." *Applied and environmental microbiology* **70**: 2919–27.
- Ludwig, W, R I Amann, E Martinez-Romero, W Schönhuber, S Bauer, A Neef und K H Schleifer. 1998. "rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria." *Plant and Soil* **204**: 1–19.
- Lynt, R K, D A Kautter und H M Solomon. 1982. "Differences and Similarities Among Proteolytic and Nonproteolytic Strains of *Clostridium botulinum* Types A, B, E and F: A Review." *Journal of food protection* **5**: 398–494.
- Ma, L, G Zhang und M P Doyle. 2011. "Green fluorescent protein labeling of *Listeria*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 for safety-related studies." *PloS one* **6**: e18083.
- Manz, W, R I Amann, W Ludwig, M Vancanneyt und K H Schleifer. 1996. "Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment." *Microbiology* **142**: 1097–1106.
- Marion, W R, T E O'Meara, G D Riddle und H A Berkhoff. 1983. "Prevalence of *Clostridium botulinum* type C in substrates of phosphate-mine settling ponds and implications for epizootics of avian botulism." *Journal of wildlife diseases* **19**: 302–7.
- Marshall, K M, M Bradshaw und E A Johnson. 2010. "Conjugative botulinum neurotoxin-encoding plasmids in *Clostridium botulinum*." *PloS one* **5**: e11087.
- McCroskey, L M, C L Hatheway, L Fenicia, B Pasolini und P Aureli. 1986. "Characterization of an organism that produces type E botulinum toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism." *Journal of clinical microbiology* **23**: 201–2.
- McIlroy, S J, D Tillett, S Petrovski und R J Seviour. 2011. "Non-target sites with single nucleotide insertions or deletions are frequently found in 16S rRNA sequences and can lead to false positives in fluorescence *in situ* hybridization (FISH)." *Environmental microbiology* **13**: 33–47.
- Meunier, F A, G Schiavo und J Molgó. 2002. "Botulinum neurotoxins: from paralysis to recovery of functional neuromuscular transmission." *Journal of physiology, Paris* **96**: 105–13.
- Midura, T F und S S Arnon. 1976. "Infant botulism. Identification of *Clostridium botulinum* and its toxins in faeces." *Lancet* **2**: 934–6.
- Mierau, I und M Kleerebezem. 2005. "10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*." *Applied microbiology and biotechnology* **68**: 705–17.
- Minamisawa, K, K Nishioka, T Miyaki, B Ye, T Miyamoto, M You, A Saito, M Saito, W L Barraquio, N Teaumroong, T Sein und T Sato. 2004. "Anaerobic nitrogen-fixing consortia consisting of clostridia isolated from gramineous plants." *Applied and environmental microbiology* **70**: 3096–102.
- Miyamoto, T, M Kawahara und K Minamisawa. 2004. "Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis." *Applied and environmental microbiology* **70**: 6580–6.
- Moller, V und I Scheibel. 1960. "Preliminary report on the isolation of an apparently new type of *C. botulinum*." *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* **48**: 80.
- Montecucco, C, O Rossetto und M R Popoff. 2006. "Neurotoxicogenic Clostridia" In: *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, hg von. M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, K H Schleifer, und E Stackebrandt, 679–697. New York: Springer US.
- Montecucco, C und G Schiavo. 1994. "Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins." *Molecular microbiology* **13**: 1–8.
- Muniesa, M, J A Hammerl, S Hertwig, B Appel und H Brüßow. 2012. "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology." *Applied and environmental microbiology* **78**: 4065–73.
- Murashige, T und F Skoog. 1962. "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Myllykoski, J, M Lindström, R Keto-Timonen, H Söderholm, J Jakala, H Kallio, A Sukura und H Korkeala. 2009. "Type C bovine botulism outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage." *Epidemiology and infection* **137**: 284–293.

- Nadeem, S M, M Ahmad, Z A Zahir, A Javaid und M Ashraf. 2013. "The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments." *Biotechnology advances* **32**(2): 429–48.
- Neser, S. 2007. " *Biogashandbuch Bayern, Materialienband: Kapitel 1.1 - 1.5 Historischer Abriss, Grundlagen des Biogasverfahrens, Grundlagen der Biogasentstehung, Substrate, Verfahrens-, Geräte- und Anlagentechnik.*". Freising: Bayerisches Landesamt für Umwelt.
- Nevas, M, M Lindström, K Hautamäki, S Puoskari und H Korkeala. 2005. "Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in honey produced in the Nordic countries." *International journal of food microbiology* **105**: 145–51.
- Nevas, M, M Lindström, A Hörman, R Keto-Timonen und H Korkeala. 2006. "Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment." *Environmental microbiology* **8**: 1085–94.
- Notermans, S, J Dufrenne und J Oosterom. 1981. "Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after an outbreak of botulism." *Applied and environmental microbiology* **41**: 179–83.
- Notermans, S, S Kozaki und M van Schothorst. 1979. "Toxin production by *Clostridium botulinum* in grass." *Applied and environmental microbiology* **38**: 767–71.
- O'Mahony, M, J Cowden, B Smyth, D Lynch, M Hall, B Rowe, E L Teare, R E Tettmar, A M Rampling und M Coles. 1990. "An outbreak of *Salmonella saint-paul* infection associated with beansprouts." *Epidemiology and infection* **104**: 229–35.
- Oguma, K, T Yamaguchi, K Sudou, N Yokosawa und Y Fujikawa. 1986. "Biochemical classification of *Clostridium botulinum* type C and D strains and their nontoxigenic derivatives." *Applied and environmental microbiology* **51**: 256–60.
- Ohishi, I. 1987. "Activation of botulinum C2 toxin by trypsin." *Infection and immunity* **55**: 1461–5.
- Ohishi, I und G Sakaguchi. 1979. "Divergency of nicking of the toxin from the proteolytic activity of *Clostridium botulinum* of different types." *Japanese journal of medical science & biology* **32**: 130–2.
- Ohishi, I, G Sakaguchi, H Riemann, D Behymer und B Hurvell. 1979. "Antibodies to *Clostridium botulinum* toxins in free-living birds and mammals." *Journal of wildlife diseases* **15**: 3–9.
- Ohishi, I und S Tsuyama. 1986. "ADP-ribosylation of nonmuscle actin with component I of C2 toxin." *Biochemical and biophysical research communications* **136**: 802–6.
- Okon, Y und C A Labandera-Gonzalez. 1994. "Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation." *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 1591–1601.
- Oleskowicz-Popiel, P, Z Kádár, S Heiske, D Klein-Marcuschamer, B A Simmons, H W Blanch und J E Schmidt. 2012. "Co-production of ethanol, biogas, protein fodder and natural fertilizer in organic farming-evaluation of a concept for a farm-scale biorefinery." *Bioresource technology* **104**: 440–6.
- Olson, D G und L R Lynd. 2012. "Transformation of *Clostridium thermocellum* by electroporation." *Methods in enzymology* **510**: 317–30.
- Paddock, S W. 1999. "Confocal laser scanning microscopy." *BioTechniques* **27**: 992–996, 998–1002, 1004.
- Paddock, S W. 2000. "Principles and practices of laser scanning confocal microscopy." *Molecular biotechnology* **16**: 127–149.
- Payne, J H, R A Hogg, A Otter, H I J Roest und C T Livesey. 2011. "Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001 to 2009), associated with exposure to broiler litter." *The Veterinary record* **168**: 640.
- Pellegrini, L L, V O'Connor, F Lottspeich und H Betz. 1995. "Clostridial neurotoxins compromise the stability of a low energy SNARE complex mediating NSF activation of synaptic vesicle fusion." *The EMBO journal* **14**: 4705–13.
- Pickett, J, B Berg, E Chaplin und M A Brunstetter-Shafer. 1976. "Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study." *The New England journal of medicine* **295**: 770–2.
- Popoff, M R. 1995. "Ecology of neurotoxic strains of clostridia." *Current topics in microbiology and immunology* **195**: 1–29.
- Popoff, M R und P Bouvet. 2009. "Clostridial toxins." *Future microbiology* **4**: 1021–64.
- Potter, H und R Heller. 2011. "Transfection by electroporation." *Current protocols in cell biology* **Chapter 20**: Unit20.5.
- Poulain, B, A De Paiva, F Deloye, F Doussau, L Tauc, U Weller und J O Dolly. 1996. "Differences in the multiple step process of inhibition of neurotransmitter release induced by tetanus toxin and botulinum neurotoxins type A and B at Aplysia synapses." *Neuroscience* **70**: 567–76.
- Prazmowski, A. 1880. "Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten." . Dissertation. Hugo Voigt, Leipzig.

- Prévot, A R. 1953. "Rapport d'introduction du président du sous-comité *Clostridium* pour l'unification de la nomenclature des types toxigéniques de *C. botulinum*." *Int. Bull. Bacterial Nomencl.* **3**: 120–123.
- Raffestin, S, A Couesnon, Y Pereira, C Mazuet und M R Popoff. 2009. "Botulinum and tetanus neurotoxins: Molecular biology, toxin gene regulation and mode of action" In: *Clostridia: Molecular Biology in the Post-genomic Era*, hg von. H Brüggemann und G Gottschalk, 1–28. Caister Academic Press.
- Remington, S. James. 2011. "Green fluorescent protein: A perspective" *Protein Science* **20**: 1509–1519.
- Richardson, A E, J M Barea, A M McNeill und C Prigent-Combaret. 2009. "Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms." *Plant and Soil* **321**: 305–339.
- Richmond, R N, C Hatheway und A F Kaufmann. 1978. "Type C botulism in a dog." *Journal of the American Veterinary Medical Association* **173**: 202–3.
- Roberts, T A. 1967. "Sporulation of mesophilic clostridia." *The Journal of applied bacteriology* **30**: 430–43.
- Robinson, E M. 1929. "Notes on botulism in domesticated animals." *Ann Rept Dir Vet Services, Union of South Africa* **15**: 97–110.
- Rodloff, A C und M Krüger. 2012. "Chronic *Clostridium botulinum* infections in farmers." *Anaerobe* **18**: 226–8.
- Rogers, D E, M G König und A Spickard. 1964. "Clinical and laboratory manifestations of type E botulism in man." *Transactions of the Association of American Physicians* **77**: 135–44.
- Rogers, Palmer. 1986. "Genetics and Biochemistry of Clostridium Relevant to Development of Fermentation Processes" *Advances in Applied Microbiology*: 1–60.
- Roller, C, M Wagner, R Amann, W Ludwig und K H Schleifer. 1994. "In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides." *Microbiology* **140**: 2849–2858.
- Rossetto, O, M Seveso, P Caccin, G Schiavo und C Montecucco. 2001. "Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research." *Toxicon* **39**: 27–41.
- Sakaguchi, G. 1982. "*Clostridium botulinum* toxins." *Pharmacology & therapeutics* **19**: 165–94.
- Sakaguchi, G und S Sakaguchi. 1959. "Studies on toxin production of *Clostridium botulinum* type E. III. Characterization of toxin precursor." *Journal of bacteriology* **78**: 1–9.
- Sakaguchi, G und Y Tohyama. 1955. "Studies on the toxin production of *Clostridium botulinum* type E. I. A strain of genus *Clostridium* having the action to promote type E botulin toxin production in a mixed culture." *Japanese journal of medical science & biology* **8**: 247–53.
- Sakaguchi, Yoshihiko, Tetsuya Hayashi, Ken Kurokawa, Keisuke Nakayama, Kenshiro Oshima, Yukako Fujinaga, Makoto Ohnishi, Eiichi Ohtsubo, Masahira Hattori und Keiji Oguma. 2005. "The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 17472–7.
- Schiavo, G, F Benfenati, B Poulain, O Rossetto, P Poverino de Laureto, B R DasGupta und C Montecucco. 1992. "Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin." *Nature* **359**: 832–5.
- Scott, V N und D T Bernard. 1982. "Heat resistance of spores of non-proteolytic type B *Clostridium botulinum*." *J. Food Prot.* **45**: 909–912.
- Sebahia, M, M W Peck, N P Minton, N R Thomson, M T G Holden, W J Mitchell, A T Carter, S D Bentley, D R Mason, L Crossman, C J Paul, A Ivens, M H J Wells-Bennik, I J Davis, A M Cerdeño-Tárraga, C Churcher, M A Quail, T Chillingworth, T Feltwell, A Fraser, I Goodhead, Z Hance, K Jagels, N Larke, M Maddison, S Moule, K Mungall, H Norbertczak, E Rabinowitsch, M Sanders, M Simmonds, B White, S Whithead und J Parkhill. 2007. "Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes." *Genome research* **17**: 1082–92.
- Segner, W P und C F Schmidt. 1971. "Heat resistance of spores of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C." *Applied microbiology* **22**: 1030–3.
- Segner, W P, C F Schmidt und J K Boltz. 1971a. "Enrichment, isolation, and cultural characteristics of marine strains of *Clostridium botulinum* type C." *Applied microbiology* **22**: 1017–24.
- Segner, W P, C F Schmidt und J K Boltz. 1971b. "Minimal growth temperature, sodium chloride tolerance, pH sensitivity, and toxin production of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C." *Applied microbiology* **22**: 1025–9.
- Seifert, H S H. 1995. "Clostridien bei Tier und Mensch." In: *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.*, hg von. H Blobel und T Schließer, 89 – 153. Band II/4. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

- Serikawa, T, S Nakamura und S Nishida. 1977. "Distribution of *Clostridium botulinum* type C in Ishikawa prefecture, and applicability of agglutination to identification of nontoxigenic isolates of *C. botulinum* type C." *Microbiology and immunology* **21**: 127–36.
- Seybold, S, Hrsg. 2011. "*Schmeil-Fitschen: Die Flora Deutschlands und der angrenzenden Länder*". 95. Auflag. Wiebelsheim, Deutschland: Quelle & Meyer.
- Shotton, D M. 1989. "Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens." *Journal of Cell Science* **94**: 175–206.
- Shotton, D und N White. 1989. "Confocal scanning microscopy: three-dimensional biological imaging." *Trends in biochemical sciences* **14**: 435–439.
- Simpson, L L. 1982. "A comparison of the pharmacological properties of *Clostridium botulinum* type C1 and C2 toxins." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **223**: 695–701.
- Simpson, L L. 1984. "Molecular basis for the pharmacological actions of *Clostridium botulinum* type C2 toxin." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **230**: 665–9.
- Simpson, Lance L. 2004. "Identification of the major steps in botulinum toxin action." *Annual review of pharmacology and toxicology* **44**: 167–93.
- Simunovic, J, J L Oblinger und J P Adams. 1985. "Potential for Growth of Nonproteolytic Types of *Clostridium botulinum* in Pasteurized Restructured Meat Products: A Review." *Journal of food protection* **3**: 196–283.
- Singh, B R. 2000. "Intimate details of the most poisonous poison." *Nature structural biology* **7**: 617–9.
- Skarin, H, T Häfström, J Westerberg und B Segerman. 2011. "*Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements." *BMC genomics* **12**: 185.
- Skarin, H und B Segerman. 2011. "Horizontal gene transfer of toxin genes in *Clostridium botulinum*: Involvement of mobile elements and plasmids." *Mobile genetic elements* **1**: 213–215.
- Skerman, V B D, V McGowan und P H A Sneath. 1980. "Approved Lists of Bacterial Names." *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**: 225–420.
- Smith, G R und C J Moryson. 1975. "*Clostridium botulinum* in the lakes and waterways of London." *The Journal of hygiene* **75**: 371–9.
- Smith, L. D. S. und H. Sugiyama. 1988a. "The natural occurrence of *Clostridium botulinum*." In: *Botulism: The Organism, its Toxins, the Disease*, hg von. A Balows. 2nd Aufl. Springfield, Ill.,USA: C. C. Thomas.
- Smith, L. D. S. und H. Sugiyama. 1988b. "The Spore" In: *Botulism: The Organism, its Toxins, the Disease*, hg von. A Balows. 2nd Aufl. Springfield, Ill.,USA: C. C. Thomas.
- Sobel, J. 2005. "Botulism." *Food safety* **41**: 1167–1173.
- Sobel, J, N Tucker, A Sulka, J McLaughlin und S Maslanka. 2004. "Foodborne botulism in the United States, 1990-2000." *Emerging infectious diseases* **10**: 1606–11.
- Solomon, H M, D A Kautter und R K Lynt. 1985. "Common characteristics of the Swiss and Argentine strains of *Clostridium botulinum* type G." *J. Food Protect.* **48**: 7–10.
- Sonnabend, O, W Sonnabend, R Heinzle, T Sigrist, R Dirnhofer und U Krech. 1981. "Isolation of *Clostridium botulinum* type G and identification of type G botulinic toxin in humans: report of five sudden unexpected deaths." *The Journal of infectious diseases* **143**: 22–7.
- Sonnabend, W F, U P Sonnabend und T Krech. 1987. "Isolation of *Clostridium botulinum* type G from Swiss soil specimens by using sequential steps in an identification scheme." *Applied and environmental microbiology* **53**: 1880–4.
- Souayah, N, H Karim, S S Kamin, J McArdle und S Marcus. 2006. "Severe botulism after focal injection of botulinum toxin." *Neurology* **67**: 1855–6.
- Spring, S, R I Amann, W Ludwig, K H Schleifer, H van Gernerden und N Petersen. 1993. "Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment." *Applied and environmental microbiology* **59**: 2397–2403.
- Steenhoudt, O und J Vanderleyden. 2000. "*Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects." *FEMS microbiology reviews* **24**: 487–506.
- Steinman, A, M Chaffer, D Elad und N Y Shpigel. 2006. "Quantitative analysis of levels of serum immunoglobulin G against botulinum neurotoxin type D and association with protection in natural outbreaks of cattle botulism." *Clinical and vaccine immunology* **13**: 862–8.

- Strom, M S, M W Eklund und F T Poysky. 1984. "Plasmids in *Clostridium botulinum* and related *Clostridium* species." *Applied and environmental microbiology* **48**: 956–63.
- Suen, J C, C L Hatheway, A G Steigerwalt und D J Brenner. 1988a. "Genetic confirmation of identities of neurotoxicogenic *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* implicated as agents of infant botulism." *Journal of clinical microbiology* **26**: 2191–2.
- Suen, J C, C L Hatheway, A G Steigerwalt und D J Brenner. 1988b. "*C. argentinense* sp. nov.: A genetically homogeneous group composed of all strains of *C. botulinum* toxin type G and some nontoxicogenic strains previously identified as *C. subterminale* or *C. hastiforme*." *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 375–381.
- Swerczek, T W. 1980a. "Toxicoinfectious botulism in foals and adult horses." *Journal of the American Veterinary Medical Association* **176**: 217–20.
- Swerczek, T W. 1980b. "Experimentally induced toxicoinfectious botulism in horses and foals." *American journal of veterinary research* **41**: 348–50.
- Takeshi, K, Y Fujinaga, K Inoue, H Nakajima, K Oguma, T Ueno, H Sunagawa und T Ohyama. 1996. "Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction." *Microbiology and immunology* **40**: 5–11.
- Tarrand, J J, N R Krieg und J Döbereiner. 1978. "A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov." *Canadian journal of microbiology* **24**: 967–80.
- Tauxe, R V. 1997. "Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge." *Emerging infectious diseases* **3**: 425–34.
- Thompson, D E, J K Brehm, J D Oultram, T J Swinfield, C C Shone, T Atkinson, J Melling und N P Minton. 1990. "The complete amino acid sequence of the *Clostridium botulinum* type A neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding gene." *European journal of biochemistry / FEBS* **189**: 73–81.
- Tieleman, D P. 2004. "The molecular basis of electroporation." *BMC biochemistry* **5**: 10.
- Tokarnia, C H, J Döbereiner und P V Peixoto. 2002. "Poisonous plants affecting livestock in Brazil." *Toxicon* **40**: 1635–60.
- Torsvik, V, J Goksøyr und F L Daae. 1990. "High diversity in DNA of soil bacteria." *Applied and environmental microbiology* **56**: 782–787.
- Turton, K, J A Chaddock und K R Acharya. 2002. "Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility." *Trends in biochemical sciences* **27**: 552–8.
- Verhoeff-Bakkenes, L, H A P M Jansen, P H in 't Veld, R R Beumer, M H Zwietering und F M van Leusden. 2011. "Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections." *International journal of food microbiology* **144**: 406–12.
- Vonberg, R P, M Höhle, M Aepfelbacher, F C Bange, C Belmar Campos, K Claussen, M Christner, J P Cramer, H Haller, M Hornef, H Fickenscher, K Fraedrich, J K Knobloch, T Kühbacher, M P Manns, M Nitschke, G Peters, M Pulz, H Rohde, R T Roseland, F Sayk, F Schaumburg, H O Schöcklmann, S Schubert, W Solbach, H Karch und S Suerbaum. 2013. "Duration of Fecal Shedding of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 in Patients Infected During the 2011 Outbreak in Germany: A Multicenter Study." *Clinical infectious diseases* **56**: 1132–40.
- Wagner, M, R I Amann, H Lemmer und K H Schleifer. 1993. "Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure." *Applied and environmental microbiology* **59**: 1520–1525.
- Wagner, M, M Schmid, S Juretschko, K H Trebesius, A Bubert, W Goebel und K H Schleifer. 1998. "*In situ* detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*." *FEMS microbiology letters* **160**: 159–68.
- Wagner, M, M Horn und H Daims. 2003. "Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes" *Current Opinion in Microbiology* **6**: 302–309.
- Ward, D M, R Weller und M M Bateson. 1990. "16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community." *Nature* **345**: 63–65.
- Webb, R P und L A Smith. 2013. "What next for botulism vaccine development?" *Expert review of vaccines* **12**: 481–92.
- Werner, D. 1992. "Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions." In: *Biological nitrogen fixation*, hg von. G Stacey, R H Burris, und H J Evans, 399–431. New York: Chapman & Hall.
- Whitmer, M E und E a Johnson. 1988. "Development of improved defined media for *Clostridium botulinum* serotypes A, B, and E." *Applied and environmental microbiology* **54**: 753–9.

- Widdel, F. 1980. "Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien." . Dissertation. Universität Göttingen, Göttingen, Deutschland.
- Winthrop, K L, M S Palumbo, J A Farrar, J C Mohle-Boetani, S Abbott, M E Beatty, G Inami und S B Werner. 2003. "Alfalfa sprouts and *Salmonella Kottbus* infection: a multistate outbreak following inadequate seed disinfection with heat and chlorine." *Journal of food protection* **66**: 13–7.
- Wirth, R, A Friesenegger und S Fiedler. 1989. "Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation." *Molecular & general genetics : MGG* **216**: 175–177.
- Wobeser, G. 1997. "Avian botulism--another perspective." *Journal of wildlife diseases* **33**: 181–6.
- Wonnacott, S, R M Marchbanks und C Fiol. 1978. "Ca²⁺ uptake by synaptosomes and its effect on the inhibition of acetylcholine release by botulinum toxin." *Journal of neurochemistry* **30**: 1127–34.
- Woods, D R und D T Jones. 1986. "Physiological responses of *Bacteroides* and *Clostridium* strains to environmental stress factors." *Advances in microbial physiology* **28**: 1–64.
- Woudstra, C, H Skarin, F Anniballi, L Fenicia, L Bano, I Drigo, M Koene, M H Bâyon-Auboyer, J P Buffereau, D De Medici und P Fach. 2012. "Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe." *Applied and environmental microbiology* **78**: 3120–7.
- Ye, B, A Saito und K Minamisawa. 2005. "Effect of inoculation with anaerobic nitrogen-fixing consortium on salt tolerance of *Miscanthus sinensis*." *Soil Science and Plant Nutrition* **51**: 243–249.
- Zeiller, M, M Rothballer, A N Iwobi, H Böhnel, F Gessler, A Hartmann und M Schmid. 2015. "Systemic colonization of clover (*Trifolium repens*) by *Clostridium botulinum* strain 2301." *Frontiers in microbiology* **6**: 1207.
- Zhou, Y, H Sugiyama, H Nakano und E A Johnson. 1995. "The genes for the *Clostridium botulinum* type G toxin complex are on a plasmid." *Infection and immunity* **63**: 2087–91.

Tagungsbeiträge und Publikationen

Tagungsbeitrag und Teilnahme an internationalen Kongressen:

ISME 13: Seattle, WA, USA, 08/2010.

Posterpräsentation: "Interaction of toxin-producing *Clostridium botulinum* strains with clover".

BAGECO 11: Korfu, Griechenland, 05/2011.

Posterpräsentation: "Interaction of toxin-producing *Clostridium botulinum* strains with clover".

Publikationen:

Fischer W, L Windhager, S Rohrer, M Zeiller, A Karnholz, R Hoffmann, R Zimmer und R Haas. 2010.

"Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer".

Nucleic Acids Res. **38(18)**: 6089-101.

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikation:

Zeiller, M, M Rothballer, A N Iwobi, H Böhnel, F Gessler, A Hartmann und M Schmid. 2015.

"Systemic colonization of clover (*Trifolium repens*) by *Clostridium botulinum* strain 2301".
Front. Microbiol. **6**: 1207.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Botulismus beim Rind	21
Abbildung 1.2:	Biogasproduktion und Nutzung der Rückstände	31
Abbildung 1.3:	Temperaturführung der Fermenter zur Biogasproduktion.....	32
Abbildung 1.4:	Auftreten toxikologischer Clostridien-Infektionen bei Rindern.....	33
Abbildung 1.5:	Parzellen eines Forschungsfeldes	33
Abbildung 3.1:	Wachstum der Clostridien bei unterschiedlichen Temperaturen.....	71
Abbildung 3.2:	Nachweis der Clostridien bei unterschiedlichen Wachstumstemperaturen...	71
Abbildung 3.3:	Wachstumskurven <i>C. botulinum</i> und <i>C. sporogenes</i>	72
Abbildung 3.4:	Menge an isolierter DNS in den unterschiedlichen Wachstumsphasen.....	73
Abbildung 3.5:	Sporen und vegetative Zellen von <i>C. botulinum</i>	74
Abbildung 3.6:	Sporulationsraten in verschiedenen Sporulationsmedien.....	74
Abbildung 3.7:	Enzymatische Vorbehandlung der Clostridien-Sporensuspension	75
Abbildung 3.8:	Fixierung von Reinkulturen von <i>C. botulinum</i> bzw. <i>C. sporogenes</i>	76
Abbildung 3.9:	Nachweis 16S-rDNS	77
Abbildung 3.10:	BoNT D-PCR: Nachweis von <i>bont D</i>	78
Abbildung 3.11:	BoNT/CD-Multiplex-PCR: Nachweis von <i>bont D</i>	79
Abbildung 3.12:	Detektionslimit BoNT/CD-Multiplex-PCR.....	80
Abbildung 3.13:	Nachweis von <i>bont D</i> in auf Platte gewachsenen Einzelkolonien.....	80
Abbildung 3.14:	Nachweis des Toxin-Gens (<i>bont D</i>)	81
Abbildung 3.15:	Nachweis von Clostridien nach 16-maligem Überimpfen.	82
Abbildung 3.16:	Nachweis von <i>C. botulinum</i> zu unterschiedlichen Zeitpunkten	82
Abbildung 3.17:	Detektion von <i>bont D</i> in Sporensuspensionen.....	83
Abbildung 3.18:	Detektion der bakteriellen DNS nach Aufschluss des Pflanzenmaterials.....	84
Abbildung 3.19:	Detektion der Clostridien mittels 16S-rDNS	85
Abbildung 3.20:	Detektion von <i>C. botulinum</i> in der Wurzel (W) und im Spross (SP).....	86
Abbildung 3.21:	Detektion der bakteriellen DNS nach Anreicherung	87
Abbildung 3.22:	Detektion der Clostridien in Sprossproben von Weißklee.....	88
Abbildung 3.23:	Nachweis von <i>C. botulinum</i> im Spross von inokulierten Pflanzen.....	89
Abbildung 3.24:	Detektion der bakteriellen DNS nach Anreicherung des Wurzelmaterials	90
Abbildung 3.25:	Wachstumsfördernder Effekt der inokulierten Clostridien auf Weißklee	92
Abbildung 3.26:	Pflanzenwachstumsfördernder Effekt der Clostridien auf Weißklee	93
Abbildung 3.27:	Pflanzenwachstumsfördernder Effekt der Clostridien auf Weißklee	94
Abbildung 3.28:	Pflanzenwachstumsfördernder Effekt der Clostridien auf <i>L. perenne</i>	94
Abbildung 3.29:	Wachstumskurve von <i>C. botulinum</i> 2301 und <i>C. sporogenes</i> 1739	95
Abbildung 3.30:	Schmelzkurve der CHIS-150 Sonde	96
Abbildung 3.31:	Fluoreszenzausprägung nach FISH.....	96

Abbildung 3.32:	Detektionsrate der Sonde CHIS150-Cy3 mit <i>C. botulinum</i> 2301	97
Abbildung 3.33:	Enzymatische Vorbehandlung der Fixative vor der FISH	98
Abbildung 3.34:	Optimierung der Annealing-Temperatur für PCR-gestützten Nachweis.....	99
Abbildung 3.35:	Detektionslimit der PCR für die <i>evoglow</i> -Plasmide	100
Abbildung 3.36:	Nachweis von <i>bont</i> D in 12 Kulturen nach Transformation.....	100
Abbildung 3.37:	BoNT/CD-Multiplex-PCR zum Nachweis von <i>bont</i> D	101
Abbildung 3.38:	Detektion der verschiedenen <i>evoglow</i> -Plasmide.....	101
Abbildung 3.39:	Fluoreszenz der mit dem <i>evoglow</i> -Plasmid transformierten Kulturen	102
Abbildung 3.40:	Konfokale Bilder von Sektionen fixierter Wurzeln von Weißklee	104
Abbildung 3.41:	Wurzeln von Weißklee nach ca. 2 Wochen Wachstum	106
Abbildung 3.42:	Wurzeln von Weißklee nach ca. 4 Wochen Wachstum	106
Abbildung 3.43:	DNS aus Fermenter (Beprobung) nach Anreicherung in RCM.....	108
Abbildung 3.44:	DNS aus Fermenter (Beprobung) nach Anreicherung in RCM.....	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Vier phänotypische Gruppen (I bis IV) von <i>C. botulinum</i>	11
Tabelle 1.2:	Toxintypen und Quellen (Collins und East, 1998)	16
Tabelle 2.1:	Verwendete Bakterienstämme	35
Tabelle 2.2:	Antibiotika.....	37
Tabelle 2.3:	Bodenparameter des verwendeten Boden-Substrats.....	46
Tabelle 2.4:	Zusammensetzung der verwendeten Substrate.....	46
Tabelle 2.5:	Klimabedingungen innerhalb der Phytokammer.....	48
Tabelle 2.6:	Reaktionsansatz <i>TopTaq</i> TM PCR-System in 50 µl-Volumen.....	51
Tabelle 2.7:	PCR-Programm	51
Tabelle 2.8:	Primer für die Amplifikation und Sequenzierung von 16S-rDNS-Fragmenten....	55
Tabelle 2.9:	PCR-Programm der Sequenzier-Reaktion	55
Tabelle 2.10:	Primer für die Detektion der Clostridien	59
Tabelle 2.11:	Sonden für FISH.....	62
Tabelle 2.12:	Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	62
Tabelle 2.13:	Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer für FISH.....	64
Tabelle 2.14:	NaCl-Konzentration im Waschpuffer für FISH	65
Tabelle 2.15:	Primer zur Überprüfung der Transformationseffizienz	67
Tabelle 2.16:	Kenndaten der verwendeten Filtersätze zur Epifluoreszenz-Mikroskopie	69
Tabelle 2.17:	Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	70
Tabelle 2.18:	Zusammensetzung und chemische Analyse der Fermenterproben	70
Tabelle 3.1:	Einwirkdauer der Desinfektionsmittel auf Sporensuspensionen	76
Tabelle 3.2:	Resistenz / Sensitivität auf Antibiotika	99

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann für die Möglichkeit zur Promotion, die Möglichkeit diese selbstständig zu gestalten und die Aufnahme in seine wunderbare Arbeitsgruppe in der Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen (AMP) des Helmholtz Zentrums München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH) in Neuherberg. Darüber hinaus bin ich Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann dankbar für die guten Arbeitsbedingungen und seine stets begeisternde Unterstützung, sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie für die fortwährende Bereitschaft zur offenen und kritischen Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Dr. Helge Böhnel sowie Herrn PD Dr. Frank Gessler vom Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen der Georg-August-Universität Göttingen danke ich für die Kooperation und Bereitstellung von Bakterienstämmen sowie die Arbeitsmöglichkeiten in den Laborräumen der Firma miprolab, einem Labor für mikrobiologische Diagnostik. Bei deren Mitarbeitern bedanke ich mich herzlich für ihre Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Schmid für die Betreuung und die gute fachliche Beratung, sowie für seine Bereitwilligkeit zu zahlreichen und hilfreichen praktischen Ratschlägen und Hinweisen und die freundliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Laborversuche. Herzlichen Dank auch für die Durchsicht der Dissertation.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mikroben-Pflanzen Interaktionen (AMP) des Helmholtz Zentrums München danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, das hervorragende Arbeitsklima und die vielen gemeinsamen Aktivitäten.

Meinen Laborkollegen gilt natürlich ganz besonderer Dank. Allen voran Frau Dr. Kerstin Hochwind und Frau Dr. Katharina Buddrus-Schiemann, die es mehr als nur einmal verstanden haben mich durch ihre erfrischende, motivierende Art zu unterstützen. Einen weiteren speziellen Platz nimmt Herr Dr. Michael Rothballer ein, der mir während meiner Dissertation stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist. Besonderer Dank gilt auch Angelo Weiss, der mir bei den zahlreichen Laborversuchen mit seiner unkomplizierten Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Herrn Dr. Wolfgang Fischer vom Max-von-Pettenkofer Institut München bin ich für die Betreuung der Arbeit und Teilnahme am *Theses committee* zu Dank verpflichtet.

Darüber hinaus danke ich den Mitarbeitern des Versuchsguts Scheyern, Herrn Rolf Schilling und Herrn Georg Gerl, für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Probenahme, sowie allen beteiligten Landwirten für die Überlassung der Substrate der Biogasanlagen.

Nicht zuletzt danke ich von Herzen meinen Eltern und Großeltern dafür, dass sie mir den gewählten Weg ermöglichten und mich all die Jahre stets in meinem Tun unterstützten.

Auch bei meinen beiden Schwestern, Angelika und Katrin, bedanke ich mich recht herzlich für deren Unterstützung und Motivation.

Meiner Freundin Frau Dr. Angela Jurik möchte ich besonders für die Liebe und Unterstützung, sowie für die Motivation recht herzlich danken, die mir auch über schwierige Phasen hinweggeholfen haben. Des Weiteren bedanke ich mich für das Korrektur lesen der Dissertation.

Meinen Freunden danke ich für deren moralische Unterstützung, Motivation und deren Verständnis für das Fernbleiben von manch gesellschaftlichem Ereignis.

Für die Finanzierung des bearbeiteten Forschungsprojekts gilt mein Dank dem Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), in Neuherberg.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und erlaubten Hilfsmittel verwendet, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

München,

(Matthias Zeiller)