

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

Maria Theresa Stein

Frisches Obst und Gemüse sind ein wichtiger Bestandteil der Ernährung und werden oft roh verzehrt. Allerdings können diese Produkte auch antibiotikaresistente Bakterien enthalten, die durch den Verzehr dieser Lebensmittel auf den Menschen übertragen werden können. Antibiotikaresistente Bakterien und deren Ausbreitung sind ein globales Problem und eine Übertragung auf den Menschen kann deshalb als kritisch angesehen werden. Besonders besorgniserregend sind Bakterien deren konjugative Antibiotikaresistenzplasmide potenziell auf Bakterien der menschlichen Darmmikrobiota übertragen werden können. Daher wurden in dieser Studie die Plasmide von 22 antibiotikaresistenten Enterobakterien aus pflanzlichen Lebensmitteln charakterisiert. Eine Hybridassemblierung der MiSeq- und Minion-Ganzgenomsequenzierdaten wurde genutzt, um Plasmid-Nukleotidsequenzen vollständig darzustellen. Durch die Charakterisierung der Plasmide wurden ein *Klebsiella (K.) pneumoniae* und zwei *Escherichia (E.) coli*-Isolate mit Antibiotikaresistenzplasmiden als mögliche Spenderstämme für Konjugationsversuche mit dem *E. coli*-Empfängerstamm CV601 ausgewählt. Der *K. pneumoniae*-Stamm wurde verwendet, um den Einfluss des Nährbodens (LB-, Salat-Agar) und der Temperatur (10 °C, 21 °C, 37 °C) auf die Plasmidtransferrate zu untersuchen. Außerdem wurden Konjugationsversuche mit diesem Stamm auf Sprossen und Mischsalat bei 10 °C und 37 °C durchgeführt. Schließlich wurde eine exogene Plasmidisolierung mit dem Empfängerstamm *E. coli* CV601 durchgeführt, um Plasmide, die einen Tetracyclin- oder Cefotaxim-resistenten Phänotyp vermitteln, von Sprossenproben einzufangen. Neben der phänotypischen Resistenztestung wurden nach NextSeq- und MinION-Sequenzierung und anschließender Hybridassemblierung die Plasmide genotypisch charakterisiert. Von den Sprossenproben wurde eine 16S rRNA-Gen Metagenom-Sequenzierung der gesamten 16S rRNA-Genregion mit dem MinION durchgeführt, um die Diversität an Gattungen sowie potenzielle Spenderstämme für die exogen eingefangenen Plasmide zu identifizieren. Insgesamt wurden 40 Plasmide in 17 Enterobakterien-Isolaten nachgewiesen, die sehr unterschiedlich in Bezug auf ihre Größe (2 kbp - 326 kbp), Mobilität und vorhandenen Antibiotikaresistenzgene waren. IncF war der häufigste Replikon-Typ bei großen (> 32 kbp) Plasmiden, bei kleinen Plasmiden wurde der Col-ähnliche Replikon-Typ nachgewiesen. Von den drei potenziellen Spenderstämmen produzierten ein *E. coli*- und ein *K. pneumoniae*-Stamm erfolgreich Transkonjuganten. Das Resistenzplasmid von *K. pneumoniae* zeigte die höchsten Transferraten auf Salat-Agar bei 37 °C, doch wurde der Transfer auch auf LB- und Salat-Agar bei allen Temperaturen außer 10 °C beobachtet. Ein Transfer bei 10 °C wurde nur für die Konjugation auf LB-Agar nach Anreicherung in Selektivmedium festgestellt. Eine Übertragung auf Sprossen und Mischsalat wurde bei 37 °C nach 22 Stunden und mit einer sehr geringen Häufigkeit auch bei 10 °C nach 4 Tagen nachgewiesen. Dies unterstreicht die Bedeutung der Kühlung, um Transfer von Antibiotikaresistenzgenen auf pflanzlichen Frischeprodukten zu verhindern. Bei der exogenen Plasmidisolierung wurden erfolgreich Tetracyclinresistenz-vermittelnde Plasmide erworben. Diese waren überwiegend IncFII-Plasmide mit *tet(A)* oder IncFIB-Plasmide mit *tet(D)*-Resistenzgenen. Die 16S rRNA-Gen-Metagenom-Analyse ergab eine vielfältige Mikrobiota. Neben der Gattung *Pseudomonas*, die die höchste Abundanz zeigte, waren auch Bakterien der Gattungen *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter* vorhanden, die mögliche Spender für die exogen eingefangenen Antibiotikaresistenzplasmide darstellen könnten. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass pflanzliche Frischeprodukte antibiotikaresistente Bakterien und teilweise Bakterien mit konjugativen Antibiotikaresistenzplasmiden beherbergen. Somit stellen diese Frischeprodukte eines von wahrscheinlich mehreren bedeutenden Vehikeln für die Übertragung von Antibiotikaresistenzplasmiden auf den Menschen dar.