

Eva Fornefeld¹, Adam Schikora², Gabriele Berg³, Rita Grosch⁴, Armin Erlacher³, Thomas Kühne¹, Kornelia Smalla¹

Humanpathogene Bakterien auf Pflanzen

Human pathogenic bacteria on plants

Zusammenfassung

Obst und Gemüse wirken sich positiv auf die Gesundheit aus. Dazu tragen auch die mit Pflanzen assoziierten Mikroorganismen bei. Allerdings kann Obst oder Gemüse, wenn es mit humanpathogenen Keimen kontaminiert ist und roh verzehrt wird, auch Lebensmittelvergiftungen verursachen. In diesem Übersichtsartikel zeigen wir anhand einer Literaturstudie, wie humanpathogene Stämme von *Escherichia coli* oder *Salmonella enterica* auf Obst und Gemüse gelangen können und dass ein komplexes Zusammenspiel verschiedener biotischer und abiotischer Faktoren ihr Überleben im Boden und auf Pflanzen beeinflusst. Insbesondere mobile genetische Elemente, die durch horizontalen Gentransfer erhalten werden, tragen zur Diversität der pathogenen Eigenschaften, aber auch zur Anpassung an Habitate außerhalb des Darms bei. Wichtig für die erfolgreiche Etablierung von Humanpathogenen an der Pflanze ist deren Anhaftung und Aufnahme sowie die Reaktion der Pflanze. Die komplexe Interaktion von Humanpathogenen und Pflanze wird wesentlich durch die genetische Ausstattung des Humanpathogens, vom Pflanzengenotyp und -mikrobiom, aber auch von einer Vielzahl von Umweltfaktoren bestimmt. Für das Überleben von Humanpathogenen ist insbesondere die Verfügbarkeit von Nährstoffen kritisch, um die sie mit der natürlichen Mikroflora konkurrieren.

Empfehlungen für die Praxis setzen ein besseres Verständnis der Ökologie von Humanpathogenen im Boden und an Pflanzen, aber auch entlang der Produktkette

voraus. Dafür sind die Entwicklung und Nutzung empfindlicher und spezifischer Nachweistechiken, die sowohl die mögliche Diversifizierung der Humanpathogene durch horizontalen Gentransfer als auch das Problem der Nichtkultivierbarkeit berücksichtigen, besonders dringlich.

Stichwörter: EHEC, *Salmonella*, Überleben, Verbreitungswege, Eintrittswege, Umweltfaktoren, Nachweismethoden

Abstract

Fruits and vegetables are beneficial for human health. A major contribution to this comes from the microorganisms associated with them. However, fruits and vegetables may cause food poisoning, when contaminated with human pathogens and eaten raw. In our review, based on a literature survey, we show insights into the entry of *Escherichia coli* or *Salmonella enterica* into the fruit and vegetable environment via diverse routes and the complex interactions between various biotic and abiotic factors, which influence the survival of human pathogens in soil and on plants. In particular, mobile genetic elements acquired through horizontal gene transfer contribute to the diversity of pathogenic strains and to their adaptation to extra-intestinal habitats. For a successful establishment of human pathogens on plants, the attachment, internalization and the response of the plant are important. Mainly the genetic equipment of the human

Institut

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig¹

Justus Liebig-Universität Gießen, Institut für Phytopathologie, Gießen²

TU Graz, Institut für Umweltbiotechnologie, Graz³

Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Großbeeren⁴

Kontaktanschrift

Prof. Dr. Kornelia Smalla, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11–12, 38104 Braunschweig, E-Mail: kornelia.smalla@jki.bund.de

Zur Veröffentlichung angenommen

25. Juli 2015

pathogen, the plant, and its microbiome determine the complex interaction between human pathogens and plants. However, also a multitude of environmental factors plays an important role. The availability of nutrients, for example, is fundamental for the survival of human pathogens and they have to compete for them with the indigenous plant and soil microorganisms. Recommendations for the practice require an improved understanding of the ecology of human pathogens in soil and on plants but also along the production chain. The development and use of sensitive and specific detection tools is essential and needs to consider the diversification of human pathogens through horizontal gene transfer as well as the problem of their non-cultivability under environmental stress conditions.

Key words: EHEC, *Salmonella*, Survival, Dissemination and entry paths, Environmental factors, Detection methods

Einleitung

Zur natürlichen Mikroflora von Pflanzen gehört eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen. Man schätzt, dass Pflanzen, ähnlich dem Menschen, zehnmals mehr Mikroorganismenzellen als pflanzliche Zellen besitzen¹. Pflanzenassoziierte Mikroorganismen können das Pflanzenwachstum fördern oder der Pflanze helfen, auf abiotische und biotische Stressfaktoren zu reagieren (PINEDA et al., 2010; BERG et al., 2015). Die Gesamtheit der Mikroorganismen, die mit der Pflanze assoziiert ist, wird als Pflanzenmikrobiom und wegen seiner Relevanz auch als zweites Pflanzengenom bezeichnet (BERENDSEN et al., 2012). Aufgrund des engen Zusammenspiels von Pflanzen und den sie epi- und endophytisch besiedelnden Mikroorganismen spricht man hier auch vom Holobionten oder Meta-Organismus (BERG et al., 2015). Das Pflanzenmikrobiom ist nicht nur für das Pflanzenwachstum und die Pflanzengesundheit von Bedeutung, sondern im Allgemeinen auch positiv und wichtig für die menschliche Gesundheit (BERG et al., 2014).

Enterobakterien wie *Erwinia*, *Serratia* und *Pantoea* gehören zu den typischen Bakterien, die mit den oberirdischen Pflanzenteilen (Phyllosphäre) assoziiert sind. Ihr Anteil kann beispielsweise in der Phyllosphäre von Salat bis zu 30% der Bakterien betragen und ist hier signifikant höher als in den anderen Mikrohabitaten der Pflanze oder im umliegenden Boden (RASTOGI et al., 2012; BERG et al., 2014; ERLACHER et al., 2014). Zu den Enterobakterien gehören auch potenziell humanpathogene Spezies, die in der Lage sind, dieses Habitat zu besiedeln (VAN OVERBEEK et al., 2014). *Salmonella enterica* und pathogene Stämme von *Escherichia coli* wie die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) gehören zu den wichtigsten

bakteriellen Humanpathogenen (HP), da sie lebensbedrohliche Durchfallerkrankungen beim Menschen auslösen (FRANCIS et al., 1999) – sie stehen im Fokus dieses Übersichtsartikels.

Werden Frischeprodukte roh verzehrt, besteht in sehr seltenen Fällen die Möglichkeit, dass assoziierte Bakterien beim Menschen Infektionskrankheiten auslösen. In der Tat gab es einige Krankheitsausbrüche, die durch kontaminiertes Obst oder Gemüse verursacht wurden. Beispielsweise gab es 2011 einen Ausbruch mit *E. coli* O104:H4 in Deutschland, bei dem 53 Todesfälle, 855 Erkrankungen am hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) und 2987 Fälle akuter Gastroenteritis auftraten. Als Ursprung der Kontamination wurde letztendlich Saatgut für Bockshornkleesprossen ermittelt (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2011).

Wie können Humanpathogene mit Pflanzen in Kontakt kommen?

Kontaminationen von Frischeprodukten mit HP können sowohl vor der Ernte auf dem Feld als auch nach der Ernte auftreten. Mögliche Eintragswege für HP, die zur Kontamination von Pflanzen auf dem Feld führen können, sind kontaminierte Ackerböden oder belastetes Beregnungs- und Oberflächenwasser (OLAIMAT und HOLLEY, 2012; OLIVEIRA et al., 2012). Dabei kann die Art der Bewässerung das Kontaminationsrisiko beeinflussen. FONSECA et al. (2011) fanden beispielsweise erhöhte Kontaminationen von Salatpflanzen mit *E. coli* bei einer Überkopfbewässerung im Vergleich zur Tröpfchen- und Furchenbewässerung. Auch bei Starkregen können mit HP kontaminierte Bodenpartikel auf die Pflanze bzw. von Pflanze zu Pflanze gelangen (MONAGHAN und HUTCHISON, 2012). Darüber hinaus ist eine Kontamination von Pflanzen während der Ernte und nachfolgend während der Verarbeitung einschließlich Verpackung der Produkte, also entlang der gesamten Produktionskette, möglich (JACOBSEN und BECH, 2012; OLAIMAT und HOLLEY, 2012).

In den Boden eingearbeitete organische nährstoffreiche Dünger wie Gülle, Gärreste und Klärschlamm stellen eine weitere Eintragsquelle von HP auf die Pflanze dar, ebenso wie direkte Fäkalkontaminationen durch Vögel, Wild oder Mäuse (BRANDL, 2006; SEMENOV et al., 2010; JACOBSEN und BECH, 2012). Bodenpartikel können durch Wind über weite Distanzen verbreitet werden und so zur transienten Mikroflora von Pflanzen beitragen (RASTOGI et al., 2012). Daher kann auch eine Verfrachtung von mit HP kontaminierten Bodenpartikeln von benachbarten Weide- oder Ackerflächen in Betracht gezogen werden. Auch kontaminierte Pflanzenreste, die nach der Ernte in den Boden eingearbeitet wurden, können eine mögliche Eintragsquelle von HP für die nachfolgende Kultur darstellen.

Ein allgemeines Problem bei der Aufklärung von Eintragswegen der HP bei Ausbruchsgeschehen ist, dass epidemiologische Untersuchungen oft erst lange nach der Ernte der Frischeprodukte beginnen können. Die eigent-

¹ American Society for Microbiology. (2008, June 5). Humans Have Ten Times More Bacteria Than Human Cells: How Do Microbial Communities Affect Human Health?. ScienceDaily. Retrieved August 24, 2015 from www.sciencedaily.com/releases/2008/06/080603085914.htm

liche Ursache bzw. Bedingungen, die zur Kontamination des pflanzlichen Lebensmittels und damit zum Ausbruch geführt haben, sind dann meist nicht mehr aufzuklären und bleiben unbekannt (SUSLOW et al., 2003).

Vermeidung der Kontamination – die bessere Strategie

Kontaminationen von Frischeprodukten mit HP sind möglichst zu vermeiden, da eine gezielte und selektive Eliminierung von HP an Obst und Gemüse praktisch unmöglich ist. Die mit der Pflanze assoziierten Mikroorganismen haften häufig fest an der Oberfläche der Frischeprodukte oder haben das pflanzliche Gewebe endophytisch besiedelt. So können Bakterien, die sich in den Stomatabereichen oder unter der Wachsschicht von Blättern (Abb. 1) befinden, nicht entfernt werden, ohne das Ge-

webe zu zerstören (OLAIMAT und HOLLEY, 2012; ERLACHER et al., 2015). So zeigten LI et al. (2008), dass *E. coli* O157:H7, die in Salatpflanzen internalisiert waren, durch Oberflächensterilisierung und vierfaches Waschen nicht entfernt werden konnten. Nach SALDAÑA et al. (2011) widerstehen *E. coli* O157:H7 in Spinatblättern Behandlungen mit Natriumhypochlorit und ozonisiertem Wasser. Die Autoren stellten nach dem Waschen von Salat und Spinat nur eine geringe Reduktion der koloniebildenden Einheiten pro Gramm (KbE/g) fest. Bei der Bewertung des Behandlungserfolges ist jedoch zu berücksichtigen, dass durch Dekontaminationsmaßnahmen die gesamte Mikroflora reduziert wird und dadurch freie ökologische Nischen entstehen, die nachfolgend von HP besetzt werden können und deren Vermehrung erst ermöglichen. Dies trifft insbesondere auf bakterielle R-Strategen zu; sie reagieren, im Gegensatz zu den

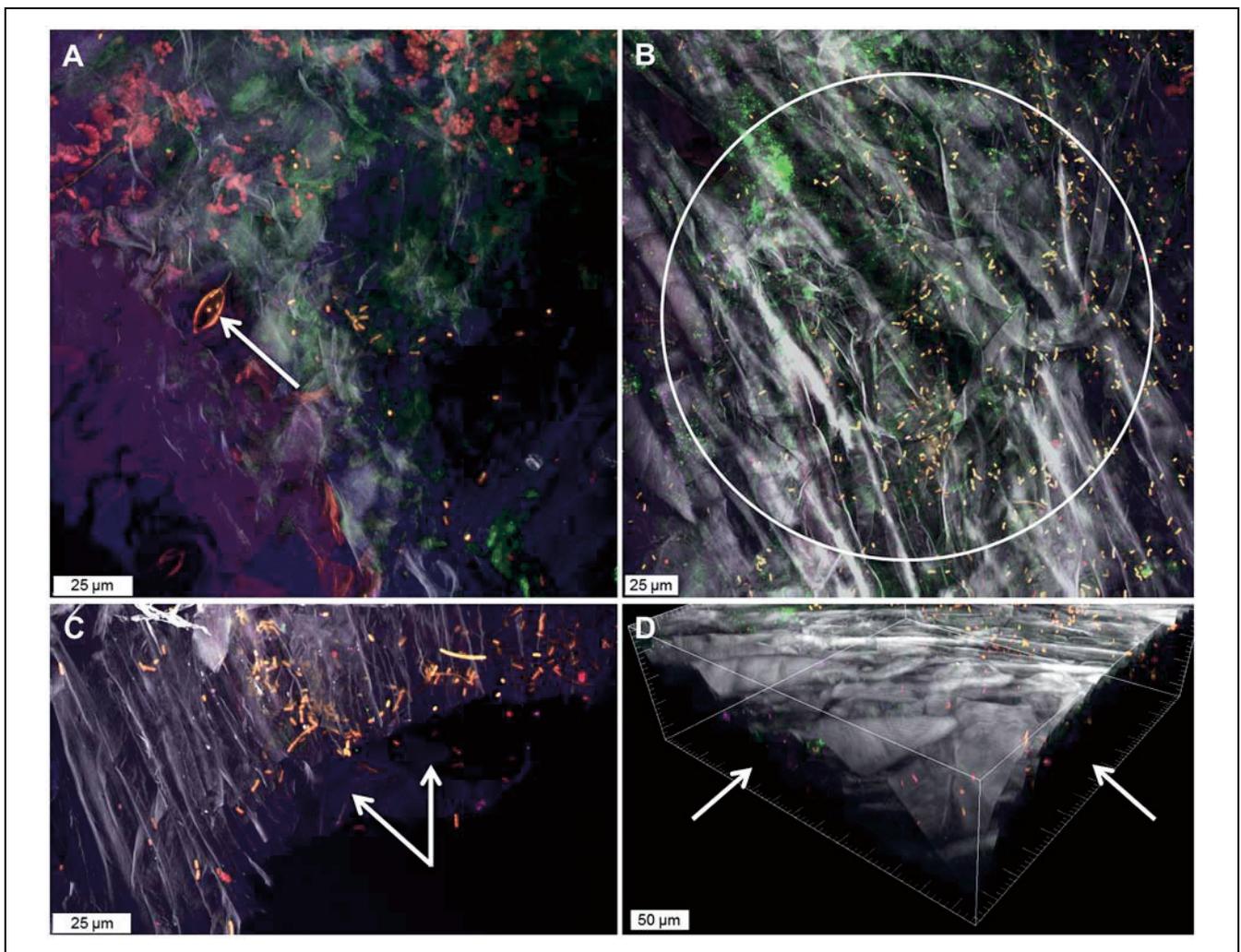


Abb. 1. Kolonisierung von Salatpflanzen durch Enterobakterien visualisiert mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) Um einen Einblick in mögliche Besiedlungsmuster von potentiell humanpathogenen Bakterien an Salatpflanzen zu bekommen, wurden die essbaren Teile sowie der Wurzelraum mit einem Modellorganismus inokuliert (*Escherichia coli* K12, orange). Durch einen anschließenden Waschschritt wurden die Bakterien wieder von den äußeren Strukturen entfernt. Nach spezifischer ssDNA-Sonden Hybridisierung (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) wurde eine starke Besiedelung von Nischen, Vertiefungen und des Pflanzeninnenraums (A-D), der so genannten Endosphäre, nachgewiesen. Als mögliche Eintrittsstellen wurden pflanzliche Spaltöffnungen (Stomata; A; markiert) und mechanisch beschädigte Pflanzenteile (B-C; markiert) erkannt. An diesen Stellen gelangen Bakterien unter die geschlossene Wachsschicht (B, D; markiert) und sind dadurch besser vor mechanischer Abtragung geschützt. Das Vaskularsystem spielt eine entscheidende Rolle bei dem Transport der Bakterien innerhalb der Pflanze (C-D).

K-Strategen, auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen mit schnellem Wachstum und vor allem einer hohen Reproduktionsrate.

Um lebensmittelbedingten Infektionen vorzubeugen, sollten Kontaminationen mit HP daher möglichst verhindert werden, da ihre nachträgliche gezielte Entfernung von Frischeprodukten nicht möglich ist. Eine intakte und gesunde Mikroflora der Pflanzen ist möglicherweise der beste Schutz gegen das Eindringen und die erfolgreiche Etablierung von HP (MALLON et al., 2015).

Faktoren, die das Überleben von Humanpathogenen in der Umwelt beeinflussen

Zahlreiche Studien unter verschiedenen Bedingungen zeigten, dass sowohl biotische als auch abiotische Faktoren wie Temperatur und Feuchtigkeit die erfolgreiche Etablierung von HP im Boden und an der Pflanze beeinflussen (SANTAMARÍA und TORANZOS, 2003; BRANDL, 2006). Vielfach wurde in Experimenten zur Überlebensfähigkeit mit einer sehr hohen Zellzahl von HP als Inokulum gearbeitet, die unter natürlichen Feldbedingungen typischerweise nur lokal, insbesondere bei Fäkalkontaminationen, zu finden ist. Nach Inokulation einer hohen Zellzahl von HP in Boden oder Gülle wurde in allen Studien ein schnelles Absterben der eingebrachten Bakterien beobachtet (KUDVA et al., 1998; ISLAM et al., 2004a,b), aber auch, dass eine geringe Zahl an HP über einen langen Zeitraum nachgewiesen werden konnte (KUDVA et al., 1998; JIANG et al., 2002; ISLAM et al., 2004a,b; 2005; FRANZ et al., 2005).

Allgemeingültige Aussagen zum Einfluss einzelner Umweltfaktoren auf die Überlebensfähigkeit von HP im Boden und an der Pflanze sind schwierig, da es oft widersprüchliche Ergebnisse zu deren Einfluss gibt. So wurde für *E. coli* O157 eine bessere Überlebensfähigkeit im Wasser bei höheren Temperaturen ermittelt (VITAL et al., 2008), während ein besseres Überleben von *E. coli* O157:H7 in Gülle und *S. enterica* Serovar Typhimurium im Boden bei niedrigen Temperaturen beobachtet wurde (SEMENOV et al., 2007; GARCÍA et al., 2010). Ein enger Zusammenhang von Temperatur und Feuchtigkeit scheint für die Etablierung von HP an Pflanzen bedeutsam (KISLUK und YARON, 2012). Das Überleben von HP wird durch hohe Feuchtigkeit gefördert, während Wassermangel Trockenstress bei den Erregern verursacht (BRANDL und MANDRELL, 2002; OR et al., 2007). Grundsätzlich können sich aber gestresste HP unter besseren Bedingungen wieder erholen. Diese Präadaption eingetragener Erreger durch vorangegangenen Stress könnte wichtig für das Überleben von HP im Boden und an der Pflanze sein (BRANDL und MANDRELL, 2002; SEMENOV et al., 2010; SHAH et al., 2013).

Auch der Bodentyp mit seinen physikochemischen und mikrobiologischen Eigenschaften kann das Überleben von HP beeinflussen (MUBIRU et al., 2000; GAGLIARDI und KARNS, 2002; SANTAMARÍA und TORANZOS, 2003; PAYNE et al., 2007; SEMENOV et al., 2011; BRENNAN et al., 2013).

Enterobakterien können von den im Boden verfügbaren Nährstoffen nur einen bestimmten Teil verwerten. Durch Zugabe von organischen Düngern könnten Nährstoffe in den Boden gelangen, welche die Etablierung bzw. Überlebensfähigkeit von HP im Boden begünstigen. Allerdings können eingetragene Nährstoffe auch das Wachstum von anderen Mikroorganismen stimulieren (DING et al., 2014), die mit den HP um Nährstoffe und Raum konkurrieren. Eindeutige Beziehungen zwischen der Art des Düngers und der Überlebensfähigkeit von HP im Boden konnten bisher nicht aufgedeckt werden (GAGLIARDI und KARNS, 2002; ISLAM et al., 2005; FRANZ et al., 2008; SEMENOV et al., 2010).

Zu den biotischen Faktoren, die das Überleben von HP sowohl im Boden als auch an der Pflanze beeinflussen, gehören auch die in beiden Habitaten bereits vorhandenen mikrobiellen Gemeinschaften. Die jeweilige mikrobielle Umgebung kann die Anhaftung, Persistenz und Vermehrung von HP wesentlich beeinflussen (TEPLITSKI et al., 2011; POZA-CARRION et al., 2013), aber auch die Konkurrenz um Nährstoffe (MALLON et al., 2015). Pflanzenpathogene Bakterien und Pilze sowie tierische Schaderreger können ebenfalls das Überleben von HP im pflanzlichen Habitat beeinflussen (SEMENOV et al., 2010; JACOBSEN und BECH, 2012). Der Abbau von Pflanzenmaterial durch Pathogene kann z.B. die Verfügbarkeit von Nährstoffen erhöhen oder durch das Schaffen von Eintrittsstellen das Eindringen von HP in die Pflanze erleichtern (BRANDL et al., 2005; BRANDL, 2006; MAGHODIA et al., 2008; GARCÍA et al., 2010; GOUDEAU et al., 2013; LEE et al., 2014). Zudem können Pflanzenpathogene Vektoren von HP sein (BRANDL, 2006).

Zahlreiche unabhängige Studien bestätigten, dass Pflanzen ein natürliches Habitat für HP wie *Salmonella* darstellen und durch Verzehr von kontaminierten Frischeprodukten HP sowohl vom Menschen als auch von Tieren aufgenommen werden können (SEMENOV et al., 2010; BRANDL et al., 2013). Allgemein sind die Bedingungen auf Pflanzen aber eher ungünstig für humanpathogene Enterobakterien, da es sich um ein sehr heterogenes Habitat mit sich ständig verändernden physikochemischen Bedingungen handelt (ARUSCAVAGE et al., 2006; BRANDL, 2006). Deutliche Unterschiede in der Kolonisierung von Pflanzen mit HP wurden in Abhängigkeit vom Pflanzengenotyp und dem jeweiligen Wachstumsstadium beobachtet. Morphologische, physiologische und chemische Eigenschaften der Pflanze, wie z.B. Trichome, Wurzel-exsudate oder Bildung von Sekundärmetaboliten, können Unterschiede in der Besiedlung mit HP bedingen (DINGMAN, 2000; COOLEY et al., 2003; BERG und SMALLA, 2009; BARAK et al., 2011; QUILLIAM et al., 2012; LEFF und FIERER, 2013).

Neben dem Pflanzengenotyp ist aber auch die genetische Ausstattung der HP wichtig, die zu deutlichen Unterschieden in der Besiedlungs- und Überlebensfähigkeit an der Pflanze führen kann. Dazu gehören Eigenschaften wie das Vorhandensein eines Typ-III-Sekretionssystems (T3SS), Chemotaxis, Beweglichkeit und die Fähigkeit, Biofilme zu bilden. Mutationen, die diese Eigen-

schaften beeinflussen, führen oft zu vermindertem Überleben der HP (COOLEY et al., 2003; KROUPITSKI et al., 2009; SCHIKORA et al., 2012b). Unterschiedliche oder auf den ersten Blick widersprüchliche Effekte des gleichen Umweltfaktors, z.B. auf das Überleben von *S. enterica*, könnten also auf die Verwendung von Stämmen mit unterschiedlicher genetischer Ausstattung zurückzuführen sein.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen zum Überleben von HP, dass ihre Interaktionen mit der Umwelt sehr komplex sind. Die in Experimenten beobachteten Auswirkungen verschiedener Faktoren auf das Überleben von HP könnten auch indirekte Effekte darstellen, die durch Veränderungen des Boden- oder Pflanzenmikrobioms verursacht werden (KLERKS et al., 2007a; BERG und SMALLA, 2009; SCHREITER et al., 2014). Interessanterweise wurde von CARDINALE et al. (2014) gezeigt, dass insbesondere Salat ein offenes Mikrobiomnetzwerk besitzt, was die erfolgreiche Etablierung von Biokontrollstämmen (SCHREITER et al., 2014), aber auch die Etablierung von HP begünstigen könnte. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden und an Pflanzen kann sowohl das Überleben von HP in verschiedenen Böden als auch die Besiedlung von Pflanzen beeinflussen sowie die variierenden Reaktionen der HP auf Umweltfaktoren erklären.

Die Rolle mobiler genetischer Elemente

HP wie beispielsweise Shiga-Toxin produzierende *E. coli* (STEC) zeigen ein breites Spektrum an Phänotypen und klinischen Erscheinungsformen (KAPER et al., 2004). Diese hohe phänotypische und genotypische Diversität wird durch eine Vielzahl mobiler und mobilisierbarer genetischer Elemente (MGE) in den HP bedingt. Zu den MGE gehören Plasmide, Bakteriophagen, Transposons, Integrons und Pathogenitätsinseln. MGE können durch horizontalen Gentransfer (HGT) in neue Wirte übertragen werden und zur Entstehung von HP mit veränderten Eigenschaften, beispielsweise zusätzlichen Pathogenitätsdeterminanten, Resistenzen, Biofilmbildung oder erhöhter Virulenz führen (GHIGO, 2001; PERNA et al., 2001; LIM et al., 2010; BRZUSZKIEWICZ et al., 2011).

Die Genomsequenzierung des *E. coli* O104:H4 Stamms, der eines der größten durch Frischeprodukte bedingten Ausbruchsgeschehen in Deutschland im Jahr 2011 hervorgerufen hat, zeigte, wie wichtig MGE für die Pathogenität und Fitness von HP sind (BRZUSZKIEWICZ et al., 2011; AHMED et al., 2012). Das Genom des Ausbruchsstamms entstand durch Übertragung mehrerer MGE und stellt eine bislang einzigartige Kombination bereits bekannter Pathogenitätsdeterminanten enteroaggregativer *E. coli* (EAEC) und enterohämorrhagischer *E. coli* (EHEC) Stämme dar. Es wurde vermutet, dass dieser Ausbruchsstamm einen neuen Pathotyp repräsentiert, der als enteroaggregativer-hämorrhagischer *E. coli* (EAHEC) bezeichnet wird. Die besondere Pathogenität des Ausbruchsstamms kam durch einen Shiga-Toxin kodierenden Prophagen zustande, der charakteristisch für EHEC-

Stämme ist. Außerdem besitzt der Ausbruchsstamm ein IncI1-Plasmid. Dieses trägt u.a. die β -Laktamase kodierenden Gene *bla*_{TEM-1} und *bla*_{CTX-M-15}. Letzteres vermittelt Resistenzen gegenüber β -Laktam-Antibiotika der dritten Generation (*extended spectrum β -lactamases*, ESBL). Der *E. coli* O104:H4 Stamm trägt weiterhin ein IncF11IA-Plasmid ähnlich den Plasmiden des pAA-Typs von EAEC, das für Fimbrien kodiert, die für die anfängliche Anhaftung von Bakterien an die Darmschleimhaut wichtig sind (BRZUSZKIEWICZ et al., 2011; HO et al., 2011; MELLMANN et al., 2011; RASKO et al., 2011; BLOCH et al., 2012; MUNIESA et al., 2012).

Nicht nur der Ausbruchsstamm *E. coli* O104:H4, sondern auch andere HP tragen typischerweise Plasmide der Inkompatibilitätsgruppen IncI oder IncF, auf denen Pathogenitätsdeterminanten und Antibiotikaresistenzen kodiert sind (DE TORO et al., 2014). IncF-Plasmide sind weit verbreitet in klinisch relevanten Enterobakterien und tragen oft ESBL-Resistenzgene. Daher werden diese Plasmide mit dem plötzlichen weltweiten Auftreten klinisch relevanter ESBL ebenso in Verbindung gebracht wie mit der Verbreitung von Resistenzen gegen Antibiotika vom Quinolon- und Aminoglykosidtyp. IncF-Plasmide sind eine heterogene Plasmidgruppe und bezüglich ihres Wirtsbereichs auf Enterobakterien beschränkt. IncF-Plasmide liegen üblicherweise in niedriger Kopienzahl vor und ihre Größe liegt bei über 100 kb. Viele IncF-Plasmide tragen mehrere Antibiotikaresistenzgene und verschiedene Replikon. Im Unterschied zu Plasmiden anderer Inc-Gruppen ist das Rückgrat von IncF-Plasmiden sehr divers in Bezug auf Größe, Anzahl der Replikon und Fähigkeit zur Konjugation. Die Diversität entsteht durch Rekombinationsereignisse, die von Transposons und Insertionssequenz (IS)-Elementen in IncF-Plasmiden gefördert werden. Diese mosaikartige Zusammensetzung der Plasmide erschwert die Entwicklung robuster Methoden zur Klassifizierung und zum Vergleich der IncF-Plasmide (PARTRIDGE et al., 2011; DE TORO et al., 2014). IncF-Plasmide vermitteln nicht nur Antibiotikaresistenzen, sondern *E. coli*, die IncF-Plasmide tragen, bilden Biofilme, während plasmidfreie Stämme nur lückenhafte unregelmäßige Biofilme bilden (GHIGO, 2001; MAY und OKABE, 2008).

IncI-Plasmide haben ebenso wie IncF-Plasmide ein begrenztes Wirtsspektrum und sind nur in Enterobakterien zu finden. Bei Sequenzierungen wurden sie in einigen Genomen von *E. coli* (u.a. im Ausbruchsstamm von 2011) und *Salmonella*-Stämmen gefunden (BRZUSZKIEWICZ et al., 2011). Auch die Plasmide dieser Gruppe sind dafür bekannt, dass sie ESBL-Gene tragen. IncI-Plasmide sind außerdem mit Klasse-1-Integrons und daher Streptomycin- und Sulfonamidresistenzgenen assoziiert. Im Gegensatz zu den IncF-Plasmiden zeigten sequenzierte IncI-Plasmide ein hoch konserviertes Rückgrat mit Regionen für Replikation, Erhaltung, Stabilität und Transfer sowie Integrationsstellen für akzessorische Gene, die z.B. für Antibiotikaresistenzen kodieren (JOHNSON et al., 2011). Es wurde außerdem gezeigt, dass auch diese Plasmide Faktoren kodieren, die bei Anhaftung der sie enthaltenden Bakterien an Zellen und abiotische Ober-

flächen sowie beim Eindringen in Wirtszellen eine Rolle spielen (KIM und KOMANO, 1997; DUDLEY et al., 2006).

MGE wie Plasmide vermitteln ihren Trägern neben Antibiotikaresistenzen auch Resistenzen gegen Desinfektionsmittel und Schwermetalle oder Toleranz gegen UV-Strahlung. Unter entsprechenden Bedingungen bietet das Vorhandensein von Plasmiden trotz der zusätzlichen metabolischen Kosten einen Selektionsvorteil für ihre Wirte. Plasmide können auch durch sogenannte Abbaugene die Fähigkeit zum Abbau von Substanzen, z.B. für aromatische Verbindungen, vermitteln. Aromatische Verbindungen können als Bestandteil von Wurzelexsudaten (NEUMANN et al., 2014) oder in Form von Schadstoffen im Boden vorkommen. Plasmidlokalisierte Abbaugene, die für Enzyme kodieren, die den Abbau dieser Verbindungen ermöglichen, können ebenfalls zu einem Fitnessvorteil des Wirts gegenüber Konkurrenten führen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass MGE wie Bakteriophagen und Plasmide (z.B. IncF und IncI) die Ökologie von HP entscheidend beeinflussen können, da sie Eigenschaften vermitteln, die von großer Bedeutung für das Verhalten und Überleben von HP sind. Die Übertragung dieser Elemente ermöglicht eine schnelle Veränderung und Anpassung von HP an ihre Umwelt (HEUER und SMALLA, 2012; SMALLA et al., 2015).

Anhaftung und Bindung an pflanzliche Oberflächen sind wichtige Etappen einer Besiedlung

Die Anhaftung (Adhäsion) von Bakterien an Pflanzenoberflächen ist ein essentieller Schritt einer Besiedlung. Es wurden zwei Phasen definiert: auf die erste und reversible Anhaftung folgt eine stabile Bindung. Die ersten Schritte in der Interaktion von HP mit der Pflanze sind ausschlaggebend für den Erfolg einer späteren Besiedlung. Mehrere bakterielle Elemente wie Fimbrien, nicht fimbriale Adhäsine, Flagellen und Lipopolysaccharide (LPS) sind in beiden Phasen wichtig (WIEDEMANN et al., 2015). Studien über die Anhaftung an verschiedene Kulturpflanzen ergaben, dass sowohl die genetische Ausstattung der Wirtspflanze als auch die der Bakterien die Effizienz der Anhaftung beeinflussen. Die Stärke der Anhaftung an Basilikum-, Salat- oder Spinatblätter unterscheidet sich, z.B. bei Vergleich verschiedener *S. enterica* Serovare. Während *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Senftenberg* effizient waren, zeigten andere Serovare, einschließlich *Agona*, *Heidelberg* oder *S. arizonae* eine geringere Fähigkeit zur Anhaftung (BERGER et al., 2011). Weiterhin wiesen Bakterien deutliche Unterschiede in der Anhaftung in Abhängigkeit vom Alter der Blätter auf; so haftete *S. Typhimurium* besser an älteren als an jüngeren Salatblättern (KROUPITSKI et al., 2011; 2013).

Die Anhaftung an Pflanzengewebe ist sehr stark abhängig von der Fähigkeit der HP, Biofilme zu bilden. Biofilme sind eine Matrix von Exopolymeren, Zellulose und Kapseln aus LPS und Polysacchariden. Sie ermöglichen z.B. Quorum sensing (zelllichteabhängige Genexpression) und verbessern die Resistenz gegenüber Umgebungsbe-

dingungen. Die Fähigkeit von Bakterien, Biofilme zu bilden, wird häufig durch die Anwesenheit von Plasmiden beeinflusst. Die Bedeutung von Biofilmen für die Adhäsion von HP an Pflanzen und deren Rolle bei der Persistenz in Pflanzen wurde kürzlich von YARON und RÖMLING (2014) beschrieben. Darüber hinaus ist die Expression von aggregativen Fimbrien (z.B. Curli) für zwei verschiedene morphologische Erscheinungsformen (Morphotypen) der *Salmonella* verantwortlich: dem *red dry and rough (rdar)* und dem *smooth and white (saw)* Typ. Im Unterschied zu dem *saw* Morphotyp zeigte der aus Tomaten isolierte *rdar* Morphotyp bessere Adhäsion an pflanzliche Oberflächen (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2012a,b). Auch für Biofilm-assoziierte HP an Petersilien konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber Desinfektionsbehandlungen gezeigt werden. Die Effizienz, mit der ein Biofilm HP auf Pflanzen vor Desinfektionsmitteln schützt, erhöht sich während der Lagerung der Pflanzen (LAPIDOT et al., 2006). Ein Screen von 6000 Transposon-Mutanten des *S. enterica* Serovars Newport resultierte in der Identifizierung von 20 Mutanten mit niedrigerer Fähigkeit zur Adhäsion an Alfalfa-Sprossen (BARAK et al., 2005). Interessanterweise waren in diesen 20 Mutanten z.B. Gene für die Aggregation von oberflächenlokalisierten Fimbrien (*agfB*) und der generelle Regulator *rpoS* mutiert. Beide Proteine regulieren die Produktion von Curli, Zellulose und anderen Adhäsinen, die für die Bildung von Biofilmen von Bedeutung sind. Zwei weitere Gene (STM0278 und STM0650) wurden als wichtige Faktoren für die Besiedlung von Alfalfa-Sprossen identifiziert, beide haben eine wesentliche Rolle bei der Bildung von Biofilmen (BARAK et al., 2009). Darüber hinaus sind Zellulose und Curli an der Kontamination von Petersilienblättern mit *S. Typhimurium* aus Beregnungswasser beteiligt (LAPIDOT und YARON, 2009).

Obwohl viele Faktoren durch *in vitro* Experimente bereits identifiziert wurden, war eine genaue Untersuchung der HP-Gene, die während der Besiedlung der Pflanze exprimiert werden, bislang nur begrenzt möglich. Neue Techniken für die Isolierung von mRNA aus Proben, die sowohl Pflanzen- als auch Bakterienmaterial beinhalten, sowie zur weiteren Aufbereitung für quantitative PCR-Analysen ermöglichen nun bei der Transkriptomanalyse die Identifizierung von Genen mit entsprechenden Funktionen (HOLMES et al., 2014).

Internalisierung der Humanpathogene

In Pflanzen wurden mehrere natürliche Infektionsstellen für *Salmonella* und andere HP beschrieben. Stomata zum Beispiel sind natürliche Öffnungen in der Blattoberfläche, die der Pflanze den Gasaustausch ermöglichen. *S. enterica* wurde in der Nähe von offenen Spaltöffnungen an Blättern von Eisbergsalat nachgewiesen. Die Bakterien aggregieren und dringen anschließend in das Innere des Blattgewebes ein (KROUPITSKI et al., 2009). Die gleiche Beobachtung wurde für natürlich vorkommende Enterobakterien an Salat gemacht (ERLACHER et al., 2014).

KROUPITSKI et al. (2009) sind der Ansicht, dass HP die photosynthetisch aktiven Zonen bevorzugen, weiterhin stehen sie in direkter Konkurrenz mit der endophytischen Mikroflora um Kohlenstoffquellen (KLERKS et al., 2007a, b). Eine Internalisierung von *Salmonella* über die Spaltöffnungen wurde auch in Rucola, Basilikum und Petersilie mit Hilfe der Elektronenmikroskopie dokumentiert (GOLBERG et al., 2011). Darüber hinaus wurde mit Fluoreszenz- und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie die Kolonisierung von verschiedenen Blattstrukturen (z.B.: Trichomen und Hydratoden) auf Tomatenblättern mit *Salmonella* gezeigt (BARAK et al., 2011; GU et al., 2011; 2013). Für *S. enterica* Serovar Weltevreden und die *Listeria monocytogenes* Serovare 4b und EGD-E sv. 1/2a wurde die erfolgreiche Besiedlung von Pflanzen auch dann nachgewiesen, wenn die Dosis des Inokulums nur 40 KBE/ml in einem sterilen System bzw. 4×10^5 KBE/g im Boden betrug. Zusätzlich wurden von der Pflanzenart abhängige Effekte beobachtet; so wurde Spinat im Vergleich zu Feldsalat häufiger bei niedrigeren Dosen des Inokulums kolonisiert (HOFMANN et al., 2014).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Translokation der HP innerhalb einer Pflanze. *S. Typhimurium* kann, ausgehend vom Boden, in dem die Pflanze wächst, die ganze Tomatenpflanze einschließlich der Früchte systemisch besiedeln. Bemerkenswert dabei ist, dass die Pflanze mit Ausnahme einer leichten Verringerung des Pflanzenwachstums keine Krankheitssymptome zeigt (GU et al., 2011). Auch die Jahreszeit spielt bei der Internalisierung von *Salmonella* eine wichtige Rolle. So wurde im Sommer die höchste Häufigkeit der Internalisierungen von *Salmonella* gefunden (GOLBERG et al., 2011). HP, die Pflanzen kolonisieren, behalten ihre Fähigkeit, Warmblüter zu infizieren. Damit kann von infizierten Pflanzen bei Rohverzehr eine unmittelbare gesundheitliche Gefahr ausgehen (SCHIKORA et al., 2011).

Eine sehr interessante Frage ist, ob HP, wie im Fall von tierischen Zellen, Zugriff auf die intrazellulären (symplastischen) Bereiche der Wirtspflanze haben. Nach Inokulation von sterilen *Arabidopsis* Wurzeln mit einem *S. Typhimurium* Stamm, der mit dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP) markiert war, konnten Bakterien zuerst in Wurzelhaarzellen beobachtet werden (SCHIKORA et al., 2008); nach 20 Stunden waren sie auch in anderen rhizodermalen Zellen nachweisbar. Eine Internalisierung von *Salmonella* wurde auch in Protoplasten von Tabak und *Arabidopsis* beobachtet, allerdings war hier die Internalisierungsrate sehr niedrig (SCHIKORA et al., 2008; SHIRRON und YARON, 2011). Eine eindeutige Bestätigung der aktiven bakteriellen Internalisierung in pflanzliche Zellen steht demnach aus.

Rolle des Typ-III-Sekretionssystems (T3SS) bei der Besiedlung von Pflanzen durch Humanpathogene

HP können das Immunsystem des Wirts mit Hilfe von sogenannten Effektorproteinen unterdrücken. Diese Effektorproteine werden oft durch das Typ-III-Sekretionssys-

tem (T3SS) direkt in die Wirtszellen eingeschleust und inhibieren zentrale Regulatoren des Immunsystems (z. B. die Signalkaskaden). *S. enterica* hat sogar zwei solcher T3SS. Neue Erkenntnisse über die Mechanismen der Pflanzeninfektion zeigen, dass die Mechanismen bei Pflanzenbesiedlung und Tierinfektionen ähnlich sind (SCHIKORA et al., 2012a). Die Inokulation von *Arabidopsis* mit dem Wildtypstamm *S. Typhimurium* und Mutanten in Genen beider T3SS zeigte, dass beide T3SS wichtig für eine erfolgreiche Besiedlung der Pflanzen sind (SCHIKORA et al., 2011; 2012b; SHIRRON und YARON, 2011). Mutanten von *S. Typhimurium* Stamm 14028s in verschiedenen Elementen beider T3SS (*prgH*, *invA*, *ssaV* oder *ssaJ*) hatten niedrigere Proliferationsraten in *Arabidopsis*. Zugleich deuten die stärkeren Symptome nach einer Inokulation mit diesen Mutanten auf eine hypersensitive Reaktion (HR) der Pflanze hin. Die HR ist ein pflanzlicher Abwehrmechanismus, der die Verbreitung der Pathogene durch das gezielte Absterben (*programmed cell death*) eines infizierten Bereiches verhindert. Die verstärkte HR auf die T3SS Mutanten lässt vermuten, dass diese Mutanten nicht in der Lage waren, den HR Mechanismus zu unterdrücken (SCHIKORA et al., 2012b). Darüber hinaus hat eine vergleichende Transkriptomanalyse von *Arabidopsis* Unterschiede in der Reaktion auf die Inokulation mit *Salmonella*-Wildtyp und der *prgH* Mutante gezeigt. *PrgH* ist ein wesentlicher Teil eines der T3SS von *Salmonella*. Nach der Inokulation mit der *prgH* Mutante wurde eine verstärkte Expression von Genen der pflanzlichen Abwehrmechanismen beobachtet (SCHIKORA et al., 2011; GARCIA et al., 2014). Eine weitere Studie untersuchte die oxidative Antwort (*oxidative burst*) nach Inokulation mit *S. Typhimurium* in Tabakpflanzen und -zellsuspension. Bezeichnend war, dass Tabak im Vergleich zu lebenden Bakterien stärker auf tote oder mit Chloramphenicol behandelte Bakterien reagierte. Ebenfalls wurde eine verstärkte Antwort der Pflanze auf die *invA* Mutante (*invA* kodiert ein weiteres Element des T3SS) im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Salmonella* aktiv die Immunantwort der Pflanzen unterdrückt (SHIRRON und YARON, 2011). Alle drei Studien implizieren, dass ein funktionierendes T3SS für die Suppression von Pflanzenabwehrmechanismen erforderlich ist.

Sehr wahrscheinlich sind im Fall von *Salmonella* nicht die beiden T3SS selbst, sondern die von ihnen sekretierten Effektorproteine für die Suppression der Immunreaktion der Pflanze verantwortlich. Für pflanzliche und humane Pathogene wurde eine Vielzahl dieser Proteine beschrieben. In *Salmonella* sind es 40 Proteine, deren Funktion erst bei einigen der Effektorproteine bekannt ist (HEFFRON et al., 2011). Eine Transkriptomanalyse von *S. Weltevreden*, die mit Alfalfa-Sprossen kultiviert wurden, zeigte eine erhöhte Expression von mehreren Effektorproteinen der SPI-2 (*salmonella pathogenicity island 2*). SPI-2 spielt eine wesentliche Rolle bei der Besiedlung von Makrophagen (BRANKATSCHK et al., 2014). Die Rolle der Effektorproteine von HP bei der Suppression der pflanzlichen Abwehr ist noch relativ unbekannt. Wäh-

rend bei phytopathogenen Bakterien bereits die Funktion mehrerer Effektoren aufgeklärt wurde, liegen bisher nur für zwei *Salmonella*-Effektorproteine, nämlich SseF (siehe unten) und SpvC, Informationen über ihre Rolle in der Pflanze vor (ÜSTÜN et al., 2012; NEUMANN et al., 2014). In tierischen Zellen ist SpvC eine Phosphothreonin Lyase, die aktiv das Immunsystem unterdrücken kann, indem sie essentielle Punkte der Immunantwort, die MAP Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*) deaktiviert (MAZURKIEWICZ et al., 2008). Eine vergleichbare Funktion wurde für SpvC in pflanzlichen Zellen nachgewiesen (NEUMANN et al., 2014).

Pflanzliche Antwort auf die Infektion mit Humanpathogenen

Die Antwort des Immunsystems als Reaktion auf eine Inokulation mit HP wurde in mehreren unabhängigen Publikationen beschrieben und kürzlich in einem Übersichtsartikel zusammengefasst (MELOTTO et al., 2014). Eine der Antworten ist die vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen (*oxidative burst*) (Abb. 2). Eine sehr hohe Produktion von Sauerstoffradikalen nach Inokulation mit der *invA* Mutante (SHIRRON und YARON, 2011) oder die Transkriptionsantworten auf die *prgH* Mutante (SCHIKORA et al., 2011; GARCIA et al., 2014) sind gute Beispiele dafür, wie HP die Immunreaktionen der Pflanze unterdrücken. Ein anderes Beispiel ist die Erkennung des *Salmonella* Effektorproteins SseF in Tabakpflanzen (ÜSTÜN et al., 2012). SseF induziert HR-ähnliche Symptome in Tabakpflanzen. Ein Ausbleiben der Antwort nach einer Inaktivierung des SGT1 Suppressors zeigt, dass SseF in einem R-Protein-vermittelten Mechanismus erkannt wird. Üblicherweise aktiviert die Erkennung eines Effektors die sogenannte *effector-triggered immunity* (ETI) der Wirtspflanze, deren Folge die HR ist.

Auch zelluläre Signalkaskaden wie die MAPK-Kaskaden sind an der Antwort auf eine Salmonelleninfektion beteiligt. Die derzeit am besten untersuchten MAP-Kinasen sind MPK3, MPK4 und MPK6, die häufig mit einer Immunantwort verbunden sind (PITZSCHKE et al., 2009). Nach einer Inokulation mit *Salmonella* waren diese MAP-Kinasen bereits nach 15 Minuten aktiv (SCHIKORA et al., 2008). Für die besondere Rolle der MAPK-Kaskade in der Abwehr gegenüber HP spricht auch die Tatsache, dass *Arabidopsis*-Mutanten, in denen die *MPK3* oder *MPK6* Gene mutiert wurden und die kein funktionierendes Protein mehr bilden, sehr anfällig für eine Besiedlung mit *S. Typhimurium* waren (SCHIKORA et al., 2008).

Detektion und Quantifizierung von Humanpathogenen in Umweltproben

Traditionelle Methoden zur Detektion und Identifizierung von HP beruhen oft auf kultivierungsabhängigen Techniken. Die Standardmethode für *E. coli* O157 basiert auf der Annahme, dass diese Stämme Indol produzieren

und Sorbitol nicht fermentieren können. Die Detektion erfolgt mittels Kultivierung auf Sorbitol-MacConkey Agar mit Cefixim und Tellurit (CT-SMAC). Sorbitol-negative Kolonien werden anschließend auf Indol-Produktion und Agglutination mit *E. coli* O157 Antiserum überprüft (European Standard EN ISO 16654:2001). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass es auch *E. coli* O157 Stämme gibt, die Indol-negativ reagieren und für Stämme des Serotyps O157 sowie für andere Shiga-Toxin-produzierende Serotypen, wie den Ausbruchstamm O104:H4, wurde inzwischen auch die Fähigkeit zur Sorbitol-Fermentation nachgewiesen (BLOCH et al., 2012). Neben die-

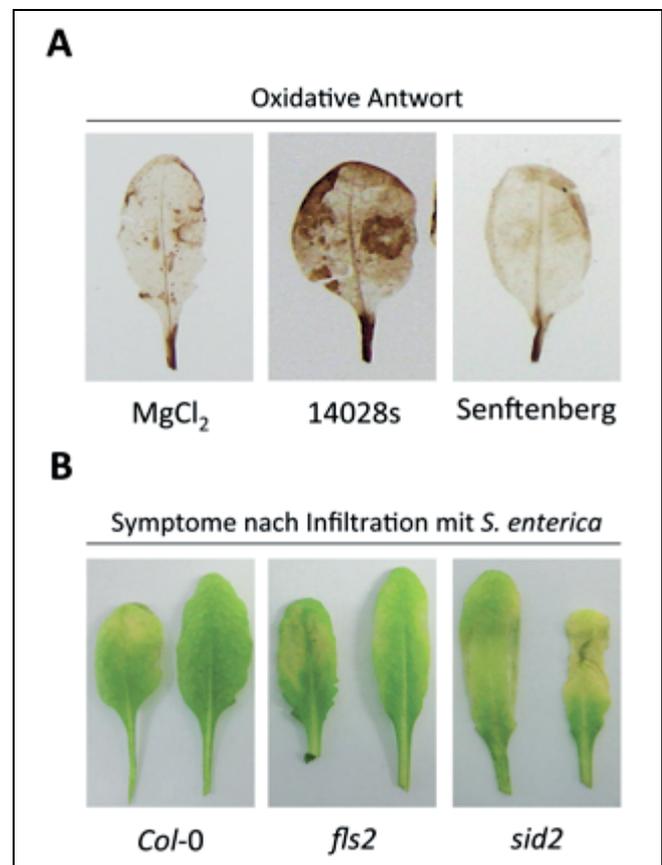


Abb. 2. Pflanzen antworten auf Infektion mit humanpathogenen Bakterien mit einer Immunantwort

A. Am Beispiel von *Arabidopsis thaliana* und *Salmonella enterica* ist hier die oxidative Antwort (*oxidative burst*) nach Inokulation mit zwei *Salmonella*-Serovaren gezeigt. Das Flagellin vom Serovar 14028s wird von der Pflanze erkannt und induziert eine Immunantwort, die anhand der Akkumulation von H_2O_2 (braune Färbung) sichtbar gemacht wurde. Serovar Senftenberg hat ein Flagellin, das vom pflanzlichen Immunsystem nicht erkannt wird. Pflanzen wurden mit Bakterien infiltriert und die Produktion von H_2O_2 nach drei Tagen mit Hilfe von DAB visualisiert. $MgCl_2$ stellt die Kontrolle dar.

B. Die Ausprägung der Krankheitssymptome nach Inokulation mit *S. enterica* ist stärker in Pflanzen, die ein defektes Immunsystem haben. *Col-0* ist eine Wildtyppflanze, *fls2* erkennt das Flagellin nicht und kann das Immunsystem nicht aktivieren und *sid2* produziert nur 10% des Normalniveaus von Salicylsäure. Die Bilder wurden vier Tage nach Infiltration mit *S. enterica* Serovar Typhimurium aufgenommen.

sen Problemen durch phänotypische Variabilität haben kultivierungsabhängige Detektionsmethoden den Nachteil, dass sie sehr zeitaufwändig sind. Außerdem können bakterielle Zellen unter nicht-optimalen Bedingungen in einen Ruhezustand übergehen, der als VBNC (*viable but non-culturable*)-Zustand bezeichnet wird (XU et al., 1982; OLIVER, 2010). Zellen in diesem Zustand sind lebensfähig, aber nicht kultivierbar, d.h. sie wachsen nicht auf routinemäßig verwendeten Labormedien, ihre Virulenz bleibt jedoch erhalten. Für den Ausbruchstamm O104:H4 wurde der Übergang in den VBNC-Zustand als Reaktion auf Umweltstress *in vitro* gezeigt (AURASS et al., 2011). Einen solchen Umweltstress stellen beispielsweise nährstoffarme Bedingungen oder toxische Konzentrationen von Kupferionen dar. Es wurde vermutet, dass der Übergang in den VBNC-Zustand die Detektion des Ausbruchstamms O104:H4 erschwert hat (AURASS et al., 2011). Auch für *E. coli* O157:H7 wurde gezeigt, dass der Übergang in den VBNC-Zustand in Gegenwart verschiedener Stressoren induziert werden kann (GREY und STECK, 2001; PINTO et al., 2011). Zellen, die sich im VBNC-Zustand befinden, sind nur noch mit Nukleinsäure-basierenden Nachweistechiken detektierbar. Ergänzend bzw. parallel zu kultivierungsabhängigen Methoden sollten daher immer kultivierungsunabhängige Nachweismethoden genutzt werden, auch wenn die in Untersuchungsämtern genutzten Vorschriften zur Detektion von HP auf deren Kultivierbarkeit basieren und nur so nachgewiesene Erreger derzeit justiziabel sind. Zudem sind die Untersuchungsmethoden vor allem für den Nachweis in tierischen Produkten etabliert. Voraussetzung für den spezifischen Nachweis aus komplexen pflanzlichen und Umwelt-Matrizes (z.B. Gemüse, Gewürze, Bodenproben, Gülle, Gärreste) sind geeignete Probenvorbereitungs- bzw. Aufarbeitungsmethoden. Die Extraktion der Gesamt-DNA kann unmittelbar aus dem Ausgangsmaterial oder nach einer Anreicherung der Bakterien in geeigneten Nährmedien erfolgen. Da die infektiösen Dosen von HP zum Teil sehr niedrig sind, müssen auch geringe Zahlen sicher detektiert werden können. Das heterogene Vorkommen und die niedrige Abundanz von HP machen dabei oft Anreicherungskulturen für einen sicheren Nachweis notwendig. Mit Hilfe von Anreicherungskulturen können nicht nur Erreger, die in geringer Abundanz vorliegen, vermehrt werden, sondern auch Zellen, die sich im VBNC-Zustand befinden, reaktiviert werden. Nach Extraktion von DNA aus entsprechenden Proben können u.a. *Salmonella* und *E. coli* z.B. mittels PCR-Southern Blotting detektiert oder mithilfe der Real-Time PCR quantifiziert werden. Alternativ oder ergänzend zu DNA-basierten Methoden können auch RNA-basierte Methoden verwendet werden. Diese bringen eine aufwändigere Probenaufbereitung mit sich, bieten dafür aber den Vorteil, dass nur lebende und keine toten HP-Zellen erfasst und damit nur die für eine mögliche Infektion relevanten Erreger detektiert werden. Insbesondere der Nachweis von mRNA von Pathogenitätsdeterminanten könnte geeignet sein, den eindeutigen Beweis für die Lebensfähigkeit und potentielle Virulenz zu erbringen.

Da die Diversität mikrobieller Gemeinschaften im Boden und an der Pflanze wesentlich für das Überleben und die Etablierung von HP an der Pflanze ist (MALLON et al., 2015), soll an dieser Stelle auch kurz auf die verfügbaren kultivierungsunabhängigen Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften eingegangen werden. Die gleiche Gesamt-DNA oder -RNA, die nach einer harschen Zell-Lyse aus der Boden- oder Pflanzenprobe isoliert wird, kann für die Detektion von HP und die Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften genutzt werden. Mit Hilfe von PCR und Primern, die spezifisch an die 16S ribosomalen (r)RNA Gene (Bakterien, Archaeen) oder an 18S rRNA Gen- oder ITS-Fragmente (Pilze) anlagern, können Fragmente aus DNA bzw. cDNA amplifiziert werden, die mit Fingerprinting-Techniken bzw. Sequenzierung analysiert werden, da die PCR-Produkte gleicher Größe sich in der Sequenz der variablen Regionen unterscheiden. Die PCR-Produkte können dann durch denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) aufgetrennt werden. Es entsteht ein Bandenmuster, anhand dessen Aussagen über die genetische Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft und über die relative Abundanz von dominanten Populationen möglich sind. Aussagen über Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft im Verlauf der Zeit oder Auswirkungen bestimmter Faktoren können durch Vergleich der Bandenmuster verschiedener Behandlungen erhalten werden.

Zunehmend werden zur Analyse von 16S rRNA-Amplikons auch *next generation sequencing* (NGS)-Techniken genutzt. Dabei werden 16S rRNA-Gensequenzen analysiert, die aus der isolierten Gesamt-DNA amplifiziert werden. So können Bakteriengemeinschaften aus verschiedenen Habitaten, unterschiedlich behandelten Böden o.ä. charakterisiert und miteinander verglichen werden. Dies liefert Einblicke in ihre Diversität und Dynamik. So konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften verschiedener Pflanzenarten und -sorten unterscheidet (HUNTER et al., 2010; WEINERT et al., 2011; DOHRMANN et al., 2013). Auch bei der Identifizierung von Faktoren, die mikrobielle Gemeinschaften verändern, können NGS-Techniken hilfreich sein (BERG und SMALLA, 2009; BULGARELLI et al., 2012; RASTOGI et al., 2012). Die Technik soll außerdem zum Verständnis, wie sich das natürliche Pflanzenmikrobiom und HP auf Pflanzen gegenseitig beeinflussen, beitragen (SCHREITER et al., 2014; ERLACHER et al., 2015).

Zur Detektion und gewebespezifischen Lokalisierung von HP in Pflanzen sind auch mikroskopische Methoden geeignet. Dadurch können gegebenenfalls auch Informationen über bevorzugte Lokalisierungen in Pflanzenorganen oder -zellen oder an bestimmten Stellen auf der Oberfläche erhalten werden. Bei der Nutzung mikroskopischer Methoden muss der zu untersuchende Organismus von der Hintergrundflora unterscheidbar sein. Dazu kann der HP-Stamm mit Reportergenen wie *gfp* ausgestattet oder mit spezifischen Antikörpern oder Sonden markiert werden.

Da alle beschriebenen Detektionsmethoden ihre Vor- und Nachteile haben, ist es oft sinnvoll, für einen siche-

ren und spezifischen Nachweis von HP verschiedene Methoden zu kombinieren bzw. parallel zu verwenden.

Schlussfolgerungen und Ausblick

I. Das Versuchsdesign und die angewandten Methoden sind wichtig für die Bewertung der Ergebnisse.

Viele Studien zum Überleben von HP wurden unter Labor- oder Gewächshausbedingungen durchgeführt, häufig unter Verwendung hoher Zellzahlen der HP oder unter sterilen Bedingungen. Die Ergebnisse dieser Studien bilden daher nur bedingt die natürliche Situation ab. Auch ist zu beachten, dass HP nach Präadaption, z.B. durch Passieren des tierischen Verdauungstrakts, deutlich angepasster für das Überleben im Boden und an der Pflanze sein könnten (SEMENOV et al., 2010). Viele Studien zum Überleben von HP wurden jedoch mit Stämmen durchgeführt, die zuvor in Nährmedien angezogen wurden. Deren Verhalten unter Umweltbedingungen kann sich deutlich von präadaptierten HP unterscheiden. Außerdem wurden in vielen Studien nur die HP selbst und nicht deren Zusammenspiel mit der mikrobiellen Gemeinschaft betrachtet. Das Mikrobiom kann jedoch entscheidenden Einfluss auf ihr Überleben haben. In zukünftigen Studien müssen diese Aspekte berücksichtigt werden.

II. Wirkmechanismen und Einflussfaktoren von HP *in situ* müssen besser verstanden werden, um Kontaminationen und Ausbrüche zu vermeiden.

Um langfristig Kontaminationen von Frischeprodukten mit HP zu verringern sowie ihre Etablierung und Vermehrung auf Pflanzen zu vermeiden, muss die Ökologie von HP – d.h. die Faktoren, die ihr Überleben im Boden und an der Pflanze beeinflussen – genauer erforscht und besser verstanden werden. Es gibt, wie in diesem Übersichtsartikel gezeigt, eine Vielzahl von Einflussfaktoren mit oft komplexen Auswirkungen auf das Überleben von HP. Zudem wurde bislang wenig untersucht, wie sich diese Faktoren gegenseitig beeinflussen. Die Rolle von MGE ist bislang ebenfalls noch nicht ausreichend geklärt. Inwiefern die natürliche Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft eine erfolgreiche Etablierung von Eindringlingen wie HP im Boden und an der Pflanze verhindern kann, bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen. Auch die Rolle pflanzlicher Abwehrmechanismen nach einer Besiedlung mit HP ist noch nicht ausreichend erforscht. Des Weiteren fehlen Kenntnisse über die Bedeutung des Bodentyps, nährstoffreicher organischer Dünger und die Einarbeitung von Pflanzenresten in den Boden für die Besiedlung von Kulturpflanzen. Ob landwirtschaftliche Managementformen, besonders im Hinblick auf die Praxis in Deutschland, das Vorkommen von HP auf Frischeprodukten beeinflussen, ist ebenfalls nur begrenzt untersucht.

III. Methoden zur Detektion von HP in der Umwelt müssen entwickelt bzw. adaptiert werden.

Um das Überleben von HP verfolgen zu können und Übertragungswege aufzuklären, werden empfindliche und spezifische kultivierungsabhängige und kultivierungsunabhängige Methoden zur Detektion von HP benötigt. Bereits vorhandene Methoden sind oft für ein bestimmtes Ausgangsmaterial entwickelt worden und müssen für andere Proben angepasst werden. Beispielsweise gibt es viele Protokolle für den Nachweis von *Salmonella* in tierischen Lebensmitteln, die jedoch nicht ohne Veränderungen für den Nachweis in pflanzlichen Lebensmitteln geeignet sind. Wo noch keine empfindlichen und spezifischen Nachweisverfahren verfügbar sind, müssen diese entwickelt und etabliert werden.

IV. Probleme, die durch HP verursacht werden, müssen im Zusammenhang mit der Ökologie des Pflanzenmikrobioms ganzheitlich bewertet werden.

Erkenntnisse zu den Einflussfaktoren auf das Überleben von HP entlang der gesamten Produktionskette sind wichtig, um Gefährdungen für Verbraucher durch den Verzehr von Frischeprodukten reduzieren zu können. Befunde, dass abgepackte und bereits gewaschene Salate häufig höhere Keimbelastungen aufweisen und dass HP sich an Schnittflächen aufgrund der Nährstoffe anreichern, unterstreichen ebenfalls die Notwendigkeit, die Ökologie von HP besser zu verstehen. Die Desinfektion zur Keimreduzierung insbesondere bei langen Lagerzeiten von vorgewaschenem und geschnittenem Salat wird kritisch gesehen, da sie die natürliche Mikroflora stört und so die Chancen für eine Vermehrung von HP eher verbessert. Daher sollten Kontaminationen von Frischeprodukten mit HP so gut wie möglich vermieden werden. Nach Einschätzung der Autoren kann es eine hundertprozentige Sicherheit, dass sich keine HP auf Frischeprodukten befinden, nicht geben.

Danksagung

Die Arbeiten von Adam SCHIKORA wurden von dem BLE Grant „plantinfect“ Nr. 13HS026 unterstützt. Die Arbeiten von Eva FORNEFELD wurden vom Umweltbundesamt (Forschungskennzahl 371271209) und vom Julius Kühn-Institut gefördert.

Literatur

- AHMED, S.A., J. AWOSIKA, C. BALDWIN, K.A. BISHOP-LILLY, B. BISWAS, S. BROOMALL, ... H.S. GIBBONS, 2012: Genomic Comparison of *Escherichia coli* O104:H4 Isolates from 2009 and 2011 Reveals Plasmid, and Prophage Heterogeneity, Including Shiga Toxin Encoding Phage stx2. *PLoS ONE* 7 (11), e48228.
- ARUSCAVAGE, D., K. LEE, S. MILLER, J.T. LEJEUNE, 2006: Interactions Affecting the Proliferation and Control of Human Pathogens on Edible Plants. *Journal of Food Science* 71 (8), R89-R99.
- AURASS, P., R. PRAGER, A. FLIEGER, 2011: EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. *Environmental Microbiology* 13 (12), 3139-3148.
- BARAK, J.D., L. GORSKI, A.S. LIANG, K.E. NARM, 2009: Previously uncharacterized *Salmonella enterica* genes required for swarm-

- ing play a role in seedling colonization. *Microbiology* **155**, 3701-3709.
- BARAK, J.D., L. GORSKI, P. NARAGHI-ARANI, A.O. CHARKOWSKI, 2005: *Salmonella enterica* Virulence Genes are Required for Bacterial Attachment to Plant Tissue. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (10), 5685-5691.
- BARAK, J.D., L.C. KRAMER, L.Y. HAO, 2011: Colonization of tomato plants by *Salmonella enterica* is cultivar dependent, and type 1 trichomes are preferred colonization sites. *Applied and Environmental Microbiology* **77** (2), 498-504.
- BERENDSEN, R.L., C.M. PIETERSE, P.A. BAKKER, 2012: The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* **17** (8), 478-486.
- BERG, G., A. ERLACHER, K. SMALLA, R. KRAUSE, 2014: Vegetable microbiomes: is there a connection among opportunistic infections, human health and our 'gut feeling'? *Microbial Biotechnology* **7** (6), 487-495.
- BERG, G., M. GRUBE, M. SCHLOTTER, K. SMALLA, 2015: The plant microbiome and its importance for plant and human health. *Frontiers in Microbiology* **5**, 491.
- BERG, G., K. SMALLA, 2009: Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **68** (1), 1-13.
- BERGER, C.N., D.J. BROWN, R.K. SHAW, F. MINUZZI, B. FEYS, G. FRANKEL, 2011: *Salmonella enterica* strains belonging to O serogroup 1,3,19 induce chlorosis and wilting of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Environmental Microbiology* **13** (5), 1299-1308.
- BLOCH, S.K., A. FELCZYKOWSKA, B. NEJMAN-FALEŃCZYK, 2012: *Escherichia coli* O104:H4 outbreak - have we learnt a lesson from it? *Acta Biochimica Polonica* **59** (4), 483-488.
- BRANDL, M.T., 2006: Fitness of Human Enteric Pathogens on Plants and Implications for Food Safety. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 367-392.
- BRANDL, M.T., C.E. COX, M. TEPLITSKI, 2013: *Salmonella* interactions with plants and their associated microbiota. *Phytopathology* **103** (4), 316-325.
- BRANDL, M.T., R.E. MANDRELL, 2002: Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the Cilantro Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (7), 3614-3621.
- BRANDL, M.T., B.M. ROSENTHAL, A.F. HAXO, S.G. BERK, 2005: Enhanced Survival of *Salmonella enterica* in Vesicles Released by a Soilborne *Tetrahymena* Species. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (3), 1562-1569.
- BRANKATSKCH, K., T. KAMBER, J.F. POTHIER, B. DUFFY, T.H.M. SMITS, 2014: Transcriptional profile of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Weltevreden during alfalfa sprout colonization. *Microbial Biotechnology* **7** (6), 528-544.
- BRENNAN, F.P., E. MOYNIHAN, B.S. GRIFFITHS, S. HILLIER, J. OWEN, H. PENDLOWSKI, L.M. AVERY, 2013: Clay mineral type effect on bacterial enteropathogen survival in soil. *Science of the Total Environment* **468-469C**, 302-305.
- BRZUSZKIEWICZ, E., A. THÜRMER, J. SCHULDES, A. LEIMBACH, H. LIESEGANG, F.D. MEYER, ... R. DANIEL, 2011: Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enterotoxigenic-Escherichia coli (EAHEC). *Archives of Microbiology* **193** (12), 883-891.
- BULGARELLI, D., M. ROTT, K. SCHLAEPPI, E. VER LOREN VAN THEMAAT, N. AHMADINEJAD, F. ASSENZA, ... P. SCHULZE-LEFERT, 2012: Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* **488** (7409), 91-95.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J.M., G.Y. GU, M.D. DANYLUK, N.S. DUFAULT, A.H.C. VAN BRUGGEN, 2012a: *Salmonella* can reach tomato fruits on plants exposed to aerosols formed by rain. *International Journal of Food Microbiology* **158** (2), 140-146.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J.M., G.Y. GU, M.D. DANYLUK, A.H.C. VAN BRUGGEN, 2012b: Adhesion and splash dispersal of *Salmonella enterica* Typhimurium on tomato leaflets: Effects of rdar morphotype and trichome density. *International Journal of Food Microbiology* **160** (1), 58-64.
- COOLEY, M.B., W.G. MILLER, 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** (8), 4915-4926.
- DE TORO, M., M. GARCILLÁN-BARCIA, F. DE LA CRUZ, 2014: Plasmid diversity and adaptation analyzed by massive sequencing of *Escherichia coli* plasmids. *Microbiology Spectrum* **2** (6), PLAS-0031-2014.
- DING, G.C., V. RADL, B. SCHLOTTER-HAI, S. JECHALKE, H. HEUER, K. SMALLA, M. SCHLOTTER, 2014: Dynamics of Soil Bacterial Communities in Response to Repeated Application of Manure Containing Sulfadiazine. *PLoS ONE* **9** (3), e92958.
- DINGMAN, D.W., 2000: Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Bruised Apple (*Malus domestica*) Tissue as Influenced by Cultivar, Date of Harvest, and Source. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (3), 1077-1083.
- DOHRMANN, A.B., M. KÜTING, S. JÜNEMANN, S. JAENICKE, A. SCHLÜTER, C.C. TEBBE, 2013: Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of Bt- and conventional maize varieties. *ISME Journal* **7** (1), 37-49.
- DUDLEY, E.G., C. ABE, J.M. GHIGO, P. LATOUR-LAMBERT, J.C. HORMAZABAL, J.P. NATARO, 2006: An Incl1 Plasmid Contributes to the Adherence of the Atypical Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strain C1096 to Cultured Cells and Abiotic Surfaces. *Infection and Immunity* **74** (4), 2102-2114.
- ERLACHER, A., M. CARDINALE, R. GROSCH, M. GRUBE, G. BERG, 2014: The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Frontiers in Microbiology* **5**, 175.
- ERLACHER, A., M. CARDINALE, M. GRUBE, G. BERG, 2015: Biotic Stress Shifted Structure and Abundance of *Enterobacteriaceae* in the Lettuce Microbiome. *PLoS ONE* **10** (2), e0118068.
- FONSECA, J.M., S.D. FALLON, C.A. SANCHEZ, K.D. NOLTE, 2011: *Escherichia coli* survival in lettuce fields following its introduction through different irrigation systems. *Journal of Applied Microbiology* **110** (4), 893-902.
- FRANCIS, G.A., C. THOMAS, D. O'BEIRNE, 1999: The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* **34** (1), 1-22.
- FRANZ, E., A.V. SEMENOV, A.J. TERMORSHUIZEN, O.J. DE VOS, J.G. BOKHORST, A.H. VAN BRUGGEN, 2008: Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157:H7 in 36 Dutch soils. *Environmental Microbiology* **10** (2), 313-327.
- FRANZ, E., A.D. VAN DIEPENINGEN, O.J. DE VOS, A.H.C. VAN BRUGGEN, 2005: Effects of Cattle Feeding Regimen and Soil Management Type on the Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Manure, Manure-Amended Soil, and Lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (10), 6165-6174.
- GAGLIARDI, J.V., J.S. KARNS, 2002: Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environmental Microbiology* **4** (2), 89-96.
- GARCIA, A.V., A. CHARRIER, A. SCHIKORA, J. BIGEARD, S. PATEYRON, M.L. DE TAUZIA-MOREAU, ... H. HIRT, 2014: *Salmonella enterica* Flagellin Is Recognized via FLS2 and Activates PAMP-Triggered Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **7** (4), 657-674.
- GARCÍA, R., J. BAELUM, L. FREDSLUND, P. SANTORUM, C.S. JACOBSEN, 2010: Influence of Temperature and Predation on Survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Expression of *invA* in Soil and Manure-Amended Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **76** (15), 5025-5031.
- GHIGO, J.M., 2001: Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412** (6845), 442-445.
- GOLBERG, D., Y. KROUPITSKI, E. BELAUSOV, R. PINTO, S. SELA, 2011: *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *International Journal of Food Microbiology* **145** (1), 250-257.
- GOUDEAU, D.M., C.T. PARKER, Y. ZHOU, S. SELA, Y. KROUPITSKI, M.T. BRANDL, 2013: The *Salmonella* Transcriptome in Lettuce and Cilantro Soft Rot Reveals a Niche Overlap With the Animal Host Intestine. *Applied and Environmental Microbiology* **79** (1), 250-262.
- GREY, B., T.R. STECK, 2001: Concentrations of Copper Thought To Be Toxic to *Escherichia coli* Can Induce the Viable but Nonculturable Condition. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (11), 5325-5327.
- GU, G., J.M. CEVALLOS-CEVALLOS, G.E. VALLAD, A.H. VAN BRUGGEN, 2013: Organically Managed Soils Reduce Internal Colonization of Tomato Plants by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Phytopathology* **103** (4), 381-388.
- GU, G., J. HU, J.M. CEVALLOS-CEVALLOS, S.M. RICHARDSON, J.A. BARTZ, A.H. VAN BRUGGEN, 2011: Internal Colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Tomato Plants. *PLoS ONE* **6** (11), e27340.
- HEFFRON, F., G. NIEMANN, H. YOON, A. KIDWAI, R. BROWN, J. McDERMOTT, ... J. ADKINS, 2011: *Salmonella*-secreted virulence factors. In: Porwollik, S. (ed) *Salmonella: From Genome to Function*. Caister Academic Press, San Diego, 187-223.
- HEUER, H., K. SMALLA, 2012: Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiology Reviews* **36** (6), 1083-1104.
- HO, C.C., K.Y. YUEN, S.K.P. LAU, P.C.Y. WOO, 2011: Rapid Identification and Validation of Specific Molecular Targets for Detection of *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak Strain by Use of High-Throughput Sequencing Data from Nine Genomes. *Journal of Clinical Microbiology* **49** (10), 3714-3716.

- HOFMANN, A., D. FISCHER, A. HARTMANN, M. SCHMID, 2014: Colonization of plants by human pathogenic bacteria in the course of organic vegetable production. *Frontiers in Microbiology* **5**, 191.
- HOLMES, A., L. BIRSE, R.W. JACKSON, N.J. HOLDEN, 2014: An optimized method for the extraction of bacterial mRNA from plant roots infected with *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiology* **5**, 286.
- HUNTER, P.J., P. HAND, D. PINK, J.M. WHIPPS, G.D. BENDING, 2010: Both Leaf Properties and Microbe-Microbe Interactions Influence Within-Species Variation in Bacterial Population Diversity and Structure in the Lettuce (*Lactuca Species*) Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **76** (24), 8117-8125.
- ISLAM, M., M.P. DOYLE, S.C. PHATAK, P. MILLNER, X.P. JIANG, 2004a: Persistence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Soil and on Leaf Lettuce and Parsley Grown in Fields Treated with Contaminated Manure Composts or Irrigation Water. *Journal of Food Protection* **67** (7), 1365-1370.
- ISLAM, M., M.P. DOYLE, S.C. PHATAK, P. MILLNER, X.P. JIANG, 2005: Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food Microbiology* **22** (1), 63-70.
- ISLAM, M., J. MORGAN, M.P. DOYLE, S.C. PHATAK, P. MILLNER, X.P. JIANG, 2004b: Fate of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on Carrots and Radishes Grown in Fields Treated with Contaminated Manure Composts or Irrigation Water. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (4), 2497-2502.
- JACOBSEN, C.S., T.B. BECH, 2012: Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Research International* **45** (2), 557-566.
- JIANG, X.P., J. MORGAN, M.P. DOYLE, 2002: Fate of *Escherichia coli* O157: H7 in Manure-Amended Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (5), 2605-2609.
- JOHNSON, T.J., S.M. SHEPARD, B. RIVET, J.L. DANZEISEN, A. CARATTOLI, 2011: Comparative genomics and phylogeny of the Inc11 plasmids: A common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Plasmid* **66** (3), 144-151.
- KAPER, J.B., J.P. NATARO, H.L.T. MOBLEY, 2004: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* **2** (2), 123-140.
- KIM, S.R., T. KOMANO, 1997: The plasmid R64 thin pilus identified as a type IV pilus. *Journal of Bacteriology* **179** (11), 3594-3603.
- KISLUK, G., S. YARON, 2012: Presence and Persistence of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium in the Phyllosphere and Rhizosphere of Spray-Irrigated Parsley. *Applied and Environmental Microbiology* **78** (11), 4030-4036.
- KLERKS, M.M., E. FRANZ, M. VAN GENT-PELZER, C. ZIJLSTRA, A.H. VAN BRUGGEN, 2007a: Differential interaction of *Salmonella enterica* serovars with lettuce cultivars and plant-microbe factors influencing the colonization efficiency. *ISME Journal* **1** (7), 620-631.
- KLERKS, M.M., M. VAN GENT-PELZER, E. FRANZ, C. ZIJLSTRA, 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** (15), 4905-4914.
- KROUPITSKI, Y., M.T. BRANDL, R. PINTO, E. BELAUSOV, D. TAMIR-ARIEL, S. BURDMAN, S. SELA, 2013: Identification of *Salmonella enterica* Genes with a Role in Persistence on Lettuce Leaves During Cold Storage by Recombinase-Based In Vivo Expression Technology. *Phytopathology* **103** (4), 362-372.
- KROUPITSKI, Y., D. GOLBERG, E. BELAUSOV, R. PINTO, D. SWARTZBERG, D. GRANOT, S. SELA, 2009: Internalization of *Salmonella enterica* in Leaves is Induced by Light and Involves Chemotaxis and Penetration Through open Stomata. *Applied and Environmental Microbiology* **75** (19), 6076-6086.
- KROUPITSKI, Y., R. PINTO, E. BELAUSOV, S. SELA, 2011: Distribution of *Salmonella typhimurium* in romaine lettuce leaves. *Food Microbiology* **28** (5), 990-997.
- KUDVA, I.T., K. BLANCH, C.J. HOVDE, 1998: Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 Survival in Ovine or Bovine Manure and Manure Slurry. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (9), 3166-3174.
- LAPIDOT, A., U. RÖMLING, S. YARON, 2006: Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *International Journal of Food Microbiology* **109** (3), 229-233.
- LAPIDOT, A., S. YARON, 2009: Transfer of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Contaminated Irrigation Water to Parsley Is Dependent on Curli and Cellulose, the Biofilm Matrix Components. *Journal of Food Protection* **72** (3), 618-623.
- LEE, K., N. KOBAYASHI, M. WATANABE, Y. SUGITA-KONISHI, H. TSUBONE, S. KUMAGAI, Y. HARA-KUDO, 2014: Spread and change in stress resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 on fungal colonies. *Microbial Biotechnology* **7** (6), 621-629.
- LEFF, J.W., N. FIERER, 2013: Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. *PLoS ONE* **8** (3), e59310.
- LI, H., M. TAJKARIMI, B.I. OSBURN, 2008: Impact of Vacuum Cooling on *Escherichia coli* O157:H7 Infiltration Into Lettuce Tissue. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (10), 3138-3142.
- LIM, J.Y., J.W. YOON, C.J. HOVDE, 2010: A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **20** (1), 5-14.
- MAGHODIA, A.B., Y. SPIEGEL, S. SELA, 2008: Interactions between *Escherichia coli* and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Applied Microbiology* **105** (6), 1810-1816.
- MALLON, C.A., F. POLY, X. LE ROUX, I. MARRING, J.D. VAN ELSAS, J.F. SALLES, 2015: Resource pulses can alleviate the biodiversity-invasion relationship in soil microbial communities. *Ecology* **96** (4), 915-926.
- MAY, T., S. OKABE, 2008: *Escherichia coli* Harboring a Natural IncF Conjugative F Plasmid Develops Complex Mature Biofilms by Stimulating Synthesis of Colanic Acid and Curli. *Journal of Bacteriology* **190** (22), 7479-7490.
- MAZURKIEWICZ, P., J. THOMAS, J.A. THOMPSON, M. LIU, L. ARBIBE, P. SANSONETTI, D.W. HOLDEN, 2008: SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Molecular Microbiology* **67** (6), 1371-1383.
- MELLMANN, A., D. HARMSEN, C.A. CUMMINGS, E.B. ZENTZ, S.R. LEOPOLD, A. RICO, ... H. KARCH, 2011: Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. *PLoS ONE* **6** (7), e22751.
- MELOTTO, M., S. PANCHAL, D. ROY, 2014: Plant innate immunity against human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* **5**, 411.
- MONAGHAN, J.M., M.L. HUTCHISON, 2012: Distribution and decline of human pathogenic bacteria in soil after application in irrigation water and the potential for soil-splash-mediated dispersal onto fresh produce. *Journal of Applied Microbiology* **112** (5), 1007-1019.
- MUBIRU, D.N., M.S. COYNE, J.H. GROVE, 2000: Mortality of *Escherichia coli* O157:H7 in Two Soils with Different Physical and Chemical Properties. *J. Environ. Qual.* **29** (6), 1821-1825.
- MUNIESA, M., J.A. HAMMERL, S. HERTWIG, B. APPEL, H. BRÜSSOW, 2012: Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4: a New Challenge for Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology* **78** (12), 4065-4073.
- NEUMANN, C., M. FRAITURE, C. HERNÁNDEZ-REYES, F.N. AKUM, I. VIRLOGEUX-PAYANT, Y. CHEN, ... A. SCHIKORA, 2014: The *Salmonella* effector protein SpvC, a phosphothreonine lyase is functional in plant cells. *Frontiers in Microbiology* **5**, 548.
- NEUMANN, G., S. BOTT, M.A. OHLER, H.P. MOCK, R. LIPPMANN, R. GROSCH, K. SMALLA, 2014: Root exudation and root development of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Tizian) as affected by different soils. *Frontiers in Microbiology* **5**, 2.
- OLAIMAT, A.N., R.A. HOLLEY, 2012: Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology* **32** (1), 1-19.
- OLIVEIRA, M., I. VIÑAS, J. USALL, M. ANGUERA, M. ABADIAS, 2012: Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology* **156** (2), 133-140.
- OLIVER, J.D., 2010: Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **34** (4), 415-425.
- OR, D., B.F. SMETS, J.M. WRAITH, A. DECHESENE, S.P. FRIEDMAN, 2007: Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media – a review. *Advances in Water Resources* **30** (6-7), 1505-1527.
- PARTRIDGE, S.R., Z.Y. ZONG, J.R. IREDELL, 2011: Recombination in IS26 and Tn2 in the Evolution of Multiresistance Regions Carrying bla(CTX-M-15) on Conjugative IncF Plasmids from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55** (11), 4971-4978.
- PAYNE, J.B., J.A. OSBORNE, P.K. JENKINS, B.W. SHELDON, 2007: Modeling the Growth and Death Kinetics of *Salmonella* in Poultry Litter as a Function of pH and Water Activity. *Poultry Science* **86** (1), 191-201.
- PERNA, N.T., G. PLUNKETT, V. BURLAND, B. MAU, J.D. GLASNER, D.J. ROSE, ... F.R. BLATTNER, 2001: Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409** (6819), 529-533.
- PINEDA, A., S.J. ZHENG, J.J. VAN LOON, C.M. PIETERSE, M. DICKE, 2010: Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science* **15** (9), 507-514.
- PINTO, D., V. ALMEIDA, M. ALMEIDA SANTOS, L. CHAMBEL, 2011: Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. *Journal of Applied Microbiology* **110** (6), 1601-1611.
- PIITZSCHKE, A., A. SCHIKORA, H. HIRT, 2009: MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12** (4), 421-426.

- POZA-CARRION, C., T. SUSLOW, S. LINDOW, 2013: Resident Bacteria on Leaves Enhance Survival of Immigrant Cells of *Salmonella enterica*. *Phytopathology* **103** (4), 341-351.
- QUILLIAM, R.S., A.P. WILLIAMS, D.L. JONES, 2012: Lettuce Cultivar Mediates both Phyllosphere and Rhizosphere Activity of *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS ONE* **7** (3), e33842.
- RASKO, D.A., D.R. WEBSTER, J.W. SAHL, A. BASHIR, N. BOISEN, F. SCHEUTZ, ... M.K. WALDOR, 2011: Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome in Germany. *New England Journal of Medicine* **365** (8), 709-717.
- RASTOGI, G., A. SBODIO, J.J. TECH, T.V. SUSLOW, G.L. COAKER, J.H. LEVEAU, 2012: Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *ISME Journal* **6** (10), 1812-1822.
- ROBERT KOCH-INSTITUT, 2011: Bericht: Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011. Berlin.
- SALDAÑA, Z., E. SÁNCHEZ, J. XICOHTENCATL-CORTES, J.L. PUENTE, J.A. GIRÓN, 2011: Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxicigen *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiology* **2**, 119.
- SANTAMARÍA, J., G.A. TORANZOS, 2003: Enteric pathogens and soil: a short review. *International Microbiology* **6** (1), 5-9.
- SCHIKORA, A., A. CARRERI, E. CHARPENTIER, H. HIRT, 2008: The Dark Side of the Salad: *Salmonella typhimurium* Overcomes the Innate Immune Response of *Arabidopsis thaliana* and Shows an Endoparasitic Lifestyle. *PLoS ONE* **3** (5), e24112.
- SCHIKORA, A., A.V. GARCIA, H. HIRT, 2012a: Plants as alternative hosts for *Salmonella*. *Trends in Plant Science* **17** (5), 245-249.
- SCHIKORA, A., I. VIRLOGEUX-PAYANT, E. BUESO, A.V. GARCIA, T. NILAU, A. CHARRIER, ... H. HIRT, 2011: Conservation of *Salmonella* Infection Mechanisms in Plants and Animals. *PLoS ONE* **6** (9), e24112.
- SCHIKORA, M., B. NEUPANE, S. MADHOGARIA, W. KOCH, D. CREMERS, H. HIRT, ... A. SCHIKORA, 2012b: An image classification approach to analyze the suppression of plant immunity by the human pathogen *Salmonella* Typhimurium. *Bmc Bioinformatics* **13**, 171.
- SCHREITER, S., G.C. DING, H. HEUER, G. NEUMANN, M. SANDMANN, R. GROSCH, ... K. SMALLA, 2014: Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Frontiers in Microbiology* **5**, 144.
- SEMENOV, A.M., A.A. KUPRIANOV, A.H. VAN BRUGGEN, 2010: Transfer of Enteric Pathogens to Successive Habitats as Part of Microbial Cycles. *Microbial Ecology* **60** (1), 239-249.
- SEMENOV, A.V., A.H.C. VAN BRUGGEN, L. VAN OVERBEEK, A.J. TERMORSHUIZEN, A.M. SEMENOV, 2007: Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS Microbiology Ecology* **60** (3), 419-428.
- SEMENOV, A.V., L. VAN OVERBEEK, A.J. TERMORSHUIZEN, A.H. VAN BRUGGEN, 2011: Influence of aerobic and anaerobic conditions on survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Luria-Bertani broth, farm-yard manure and slurry. *Journal of Environmental Management* **92** (3), 780-787.
- SHAH, J., P.T. DESAI, D. CHEN, J.R. STEVENS, B.C. WEIMER, 2013: Pre-adaptation to Cold Stress in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Increases Survival during Subsequent Acid Stress Exposure. *Applied and Environmental Microbiology* **79** (23), 7281-7289.
- SHIRRON, N., S. YARON, 2011: Active Suppression of Early Immune Response in Tobacco by the Human Pathogen *Salmonella* Typhimurium. *Plos One* **6** (4), e18855.
- SMALLA, K., S. JECHALKE, E. TOP, 2015: Plasmid Detection, Characterization, and Ecology. *Microbiology Spectrum* **3** (1), 445-458.
- SUSLOW, T.V., M.P. ORIA, L.R. BEUCHAT, E.H. GARRETT, M.E. PARISH, L.J. HARRIS, ... F.F. BUSTA, 2003: Production Practices as Risk Factors in Microbial Food Safety of Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2**, 38-77.
- TEPLITSKI, M., K. WARRINER, J. BARTZ, K.R. SCHNEIDER, 2011: Untangling metabolic and communication networks: interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends in Microbiology* **19** (3), 121-127.
- ÜSTÜN, S., P. MÜLLER, R. PALMISANO, M. HENSEL, F. BÖRNKE, 2012: SseF, a type III effector protein from the mammalian pathogen *Salmonella enterica*, requires resistance-gene-mediated signalling to activate cell death in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *New Phytologist* **194** (4), 1046-1060.
- VAN OVERBEEK, L.S., J. VAN DOORN, J.H. WICHERS, A. VAN AMERONGEN, H.J.W. VAN ROERMUND, P.T.J. WILLEMSSEN, 2014: The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Frontiers in Microbiology* **5**, 104.
- VITAL, M., F. HAMMES, T. EGLI, 2008: *Escherichia coli* O157 can grow in natural freshwater at low carbon concentrations. *Environmental Microbiology* **10** (9), 2387-2396.
- WEINERT, N., Y. PICENO, G.C. DING, R. MEINCKE, H. HEUER, G. BERG, ... K. SMALLA, 2011: PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. *FEMS Microbiology Ecology* **75** (3), 497-506.
- WIEDEMANN, A., I. VIRLOGEUX-PAYANT, A.M. CHAUSSE, A. SCHIKORA, P. VELGE, 2015: Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in Microbiology* **5**, 791.
- XU, H.S., N. ROBERTS, F.L. SINGLETON, R.W. ATTWELL, D.J. GRIMES, R.R. COLWELL, 1982: Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology* **8** (4), 313-323.
- YARON, S., U. RÖMLING, 2014: Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology* **7** (6), 496-516.