

Forschungsbericht

Nr. 188

Reduzierung der Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen durch gezielte Hygiene-Maßnahmen

Verfasser: M. Sc. Mareike Katharina Weber

Projektleiter: Prof. Dr. André Lipski

Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (IEL)

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meckenheimer Allee 172 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2285; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Umwelt,
Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-
Westfalen
Bonn, Dezember, 2017

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. André Lipski

Projektbearbeiter: M. Sc. Mareike Katharina Weber

Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften
Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene
Meckenheimer Allee 168
53115 Bonn

WEBER, M. K. UND LIPSKI, A. (2017): Reduzierung der Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen durch gezielte Hygiene-Maßnahmen. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, Nr. 188, 71 Seiten

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Problemstellung/Wissensstand	- 1 -
1.1.1	Biofilmbildung in der Milchindustrie.....	- 2 -
1.1.2	Antibiotikaresistenzen	- 4 -
1.1.3	Horizontaler Gentransfer	- 6 -
1.1.4	Nachweismethoden für antibiotikaresistente Mikroorganismen	- 9 -
1.2	Zielsetzung	- 12 -
2	Material und Methoden	- 13 -
2.1	Untersuchter Milchviehbetrieb	- 13 -
2.2	Versuchsaufbau	- 13 -
2.3	Molekularbiologischer Ansatz	- 15 -
2.3.1	DNA-Extraktion aus den Tupferabschwemmlösungen	- 15 -
2.3.2	Realtime-PCR zum Nachweis der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene	- 15 -
2.3.3	Absolute Quantifizierung der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene	- 17 -
2.3.4	Berechnung von Keimzahläquivalenten aus den RT-qPCR-Ergebnissen	- 18 -
2.4	Kultivierungsgestützter Ansatz	- 19 -
2.4.1	Kulturelle Keimzahlbestimmung und Vereinzelung von Isolaten.....	- 19 -
2.4.2	Makroskopische und mikroskopische Differenzierung der Isolate	- 20 -
2.4.3	Fettsäureanalyse	- 20 -
2.4.4	DNA-Extraktion und 16S rRNA-Gensequenzierung	- 20 -
2.4.5	Erstellung phylogenetischer Stammbäume	- 21 -
2.4.6	Plasmidextraktion und Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen aus den Isolaten ..	- 21 -
2.5	Mating-Experimente.....	- 22 -
2.5.1	MHK-Bestimmung der Isolate	- 22 -
2.5.2	Plasmidextraktion aus den Isolaten	- 23 -
2.5.3	Erzeugung von Rifampicin-Resistenzen in Rezipienten	- 23 -
2.5.4	Clumping-Assays mit Enterokokken.....	- 24 -
2.5.5	Ablauf der Mating-Experimente.....	- 24 -
3	Ergebnisse	- 26 -
3.1	Molekularbiologischer Ansatz	- 26 -

3.1.1	PMA-Behandlung zur Unterdrückung unspezifischer Signale.....	- 26 -
3.1.2	Nachweis der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene	- 27 -
3.1.3	Berechnung von Keimzahläquivalenten.....	- 28 -
3.2	Kultivierungsgestützter Ansatz	- 32 -
3.2.1	Gesamtkeimzahlen und Keimzahlen antibiotikaresistenter Mikroorganismen	- 32 -
3.2.2	Zusammensetzung der antibiotikaresistenten Biofilmgemeinschaft	- 33 -
3.2.3	Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in den Isolaten	- 35 -
3.2.4	Zusammenhang zwischen Zelldichte und Auftreten von Antibiotikaresistenzen	- 35 -
3.3	Mating-Experimente.....	- 37 -
3.3.1	Feststellung des Resistenzstatus der Isolate	- 37 -
3.3.2	Plasmid-Nachweis in Isolaten	- 38 -
3.3.3	Erzeugung von Rifampicin-Resistenzen	- 39 -
3.3.4	Clumping-Assays mit Enterokokken.....	- 40 -
3.3.5	Mating-Experimente mit Enterokokken	- 41 -
3.3.6	Mating-Experimente mit weiteren Stämmen.....	- 42 -
4	Diskussion	- 43 -
4.1	Besiedelungsdichte an verschiedenen Stellen innerhalb der Melkanlage	- 43 -
4.2	Antibiotikaresistenzen	- 45 -
4.3	Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in Melkanlagen-Biofilmen.....	- 48 -
4.4	Evaluierung der Methoden zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen.....	- 49 -
4.5	Mating-Experimente.....	- 51 -
4.6	Zusammenhang zwischen Zelldichte und Übertragung von Antibiotikaresistenzen.....	- 53 -
5	Zusammenfassung	- 54 -
6	Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis	- 56 -
7	Literatur	- 57 -
8	Anhang	- 63 -
9	Konsequenzen für weitere Forschungsaktivitäten	- 67 -
10	Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen und Demonstrationen	- 68 -
11	Kurzfassung	- 69 -

1 Einleitung

1.1 Problemstellung/Wissensstand

Konsummilch und Milchprodukte wie Käse oder Joghurt stellen ein wichtiges Grundnahrungsmittel dar. Laut Bundesministerium für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) lag die Milcherzeugung in Deutschland im Jahr 2016 bei 32,7 Mio. t. 96 % der Rohmilch gingen als Anlieferungsmilch an milchwirtschaftliche Betriebe. Ein Großteil davon wird zu Konsummilch verarbeitet, deren Erzeugung von Januar bis September 2017 bei 3,6 Mio. t lag. An zweiter und dritter Stelle sind die Erzeugung von Käse (1,9 Mio. t) und Milch- und Molkenmischerzeugnissen/-getränken (1,8 Mio. t) zu nennen (BLE, 2017).

Die durchschnittliche Anzahl der Milchkühe pro Haltung lag deutschlandweit bei 61, wobei dieser Wert zwischen den verschiedenen Bundesländern stark variierte. So lag der Durchschnitt 2016 in Nordrhein-Westfalen bei 70 Kühen/Haltung, während dieser Wert in Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern bei etwa 220 Kühen/Haltung lag (BLE, 2017).

Durch Mastitiden, bakteriell ausgelöste entzündliche Erkrankungen des Euters, entstehen hohe wirtschaftliche Verluste. Diese sind sowohl auf den Rückgang der Milchleistung, als auch auf Produktionsausfälle bei der Milchverarbeitung zurückzuführen. Einen wichtigen Übertragungsweg von Mastitiserregern innerhalb der Herde stellt der maschinelle Melkvorgang dar, bei dem Erreger zwischen verschiedenen Kühen verbreitet werden können. Mastitiden werden in den meisten Fällen durch Antibiotikagabe behandelt. Häufig werden aufgrund der erhöhten Anfälligkeit von Milchrindern gegenüber Mastitis beim Trockenstellen auch präventiv Antibiotikapräparate eingesetzt (Tenhagen et al., 2006; Oliver *et al.*, 2011).

In der Veterinärmedizin müssen seit 2011 die verkauften Antibiotikamengen entsprechend der DIMDI-Arzneimittelverordnung (DIMDI-AV, 2010) an das Tierarzneimittelregister (TAR) weitergegeben werden. Dadurch sollen Erkenntnisse über die Antibiotikaresistenzentwicklung in der Veterinärmedizin, insbesondere bei Lebensmittel liefernden Tieren, gewonnen werden (BVL, 2017). Dies ist vor allem relevant, wenn es zur Entstehung und Weitergabe von Antibiotikaresistenzen kommt. Durch direkten Kontakt zwischen Mensch und Tier, sowie über entsprechend kontaminierte Lebensmittel, könnte demnach ein Austausch von resistenten Erregern und/oder Resistenzgenen zwischen Tier- und Humanmedizin stattfinden (White & McDermott, 2001; Verraes *et al.*, 2013). In den Jahren 2011 bis 2015 hat sich die Abgabemenge an Antibiotika von 1700 auf 800 t mehr als halbiert. Bei den in der Tiermedizin am häufigsten eingesetzten Antibiotikaklassen handelt es sich um Penicilline (ca. 300 t/Jahr) und Tetracycline (ca. 220 t/Jahr) (BVL, 2017).

1.1.1 Biofilmbildung in der Milchindustrie

Biofilme sind mikrobielle Gemeinschaften, die von einer selbst produzierten Matrix umgeben sind und an festen oder beweglichen Oberflächen verschiedenster Materialien adhäreren (Costerton *et al.*, 1995). Sie gewinnen aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens und ihrer Relevanz, z. B. im medizinischen Bereich und in der Lebensmittelindustrie, zunehmend an Bedeutung. Laut aktuellem Forschungsstand liegen Bakterien in ihren natürlichen Habitaten als Biofilme vor (Olsen, 2015). Diese bestehen meist aus einer großen Vielfalt verschiedener Spezies (Jahid & Ha, 2014). Die erhöhte Resistenz von sessilen, in Biofilmen organisierten Bakterien gegenüber Reinigungs- und Desinfektionsmitteln sowie Antibiotika im Vergleich zu freien, planktonischen Mikroorganismen hat Biofilme in den Schwerpunkt der mikrobiellen Forschung gerückt (Gilbert *et al.*, 2002).

Der Zyklus der Biofilmbildung lässt sich in fünf Phasen einteilen (Abbildung 1) (Garnett & Matthews, 2012; Srey *et al.*, 2013). In der ersten Phase kommt es zur reversiblen Anheftung von Bakterien an eine Oberfläche. Dies geschieht durch Bindung an Polysaccharide oder Proteine, die die Oberfläche beschichten. Die Bindung wird durch Oberflächenstrukturen auf der Zelle, wie Pili oder Flagellen, vermittelt (Toyofuku *et al.*, 2015). Die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), einer Matrix aus Polysacchariden, Proteinen und externer DNA, verstärkt die Bindung zur Oberfläche sowie der Zellen untereinander, sodass die Anheftung in Phase 2 irreversibel wird. Die irreversible Anheftung geht einher mit einer drastischen Änderung des Proteinexpressionsmusters und damit des Phänotyps im Vergleich zum planktonischen Zustand (Toyofuku *et al.*, 2015; Gomes *et al.*, 2016).

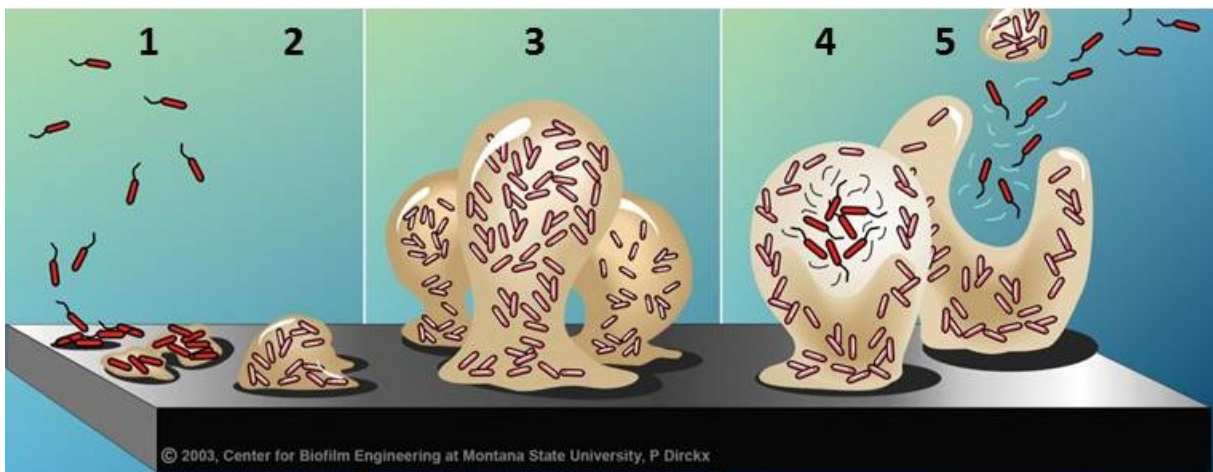


Abbildung 1: Die fünf Phasen der Biofilmbildung. 1: Anheftung einzelner Zellen; 2: EPS-Produktion, verstärkte Adhäsion (Mikrokolonien); 3: Entstehung der Biofilmarchitektur; 4: Weitere Reifung des Biofilms; 5: Ablösung und Ausbreitung einzelner Zellen (Verändert nach: Dirckx, P. & Davies, D., 2003, Center for Biofilm Engineering, Montana State University).

Aus den Mikrokolonien entstehen in Phase 3 der Biofilmbildung dreidimensionale Strukturen, die von Wasser- und Nährstoffkanälen durchzogen sind. Die heterogene Struktur wird von externen Umweltbedingungen, wie der Strömungsgeschwindigkeit, sowie von der Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaft beeinflusst (Toyofuku *et al.*, 2015; ha *et al.*, 2016). Während in Phase 4 eine weitere Reifung des Biofilms stattfindet, wird in Phase 5 über Quorum-Sensing, neben weiteren physiologischen und umweltbedingten Faktoren, die Ablösung einzelner Zellen aus dem Biofilm initiiert. Diese können an anderen Stellen erneut adhären und Biofilme bilden (Abdullahi *et al.*, 2016).

Aufgrund ihres hohen Nährstoffgehaltes und des neutralen pH-Wertes stellt Milch ein optimales Nährmedium für Mikroorganismen dar (Srey *et al.*, 2013). Die Benetzung von Oberflächen der Melkanlage durch Milchbestandteile während des Melkvorgangs kann zur Anheftung von Mikroorganismen und zur Biofilmbildung innerhalb von wenigen Sekunden führen (Abdullahi *et al.*, 2016). Die Biofilmbildung ist dort begünstigt, wo aufgrund von niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten und Volumenströmen sowie materialabhängig eine unzureichende Reinigung und Desinfektion der besiedelten Oberflächen stattfindet (Brooks & Flint, 2008; Jahid & Ha, 2014).

Wegen der verlangsamten Stoffwechselrate der Mikroorganismen innerhalb des Biofilms, und der Diffusionsbarriere, die die EPS-Schicht darstellt, liegen zumeist erhöhte Toleranzen des Biofilms gegenüber Antibiotika sowie Reinigungs- und Desinfektionsmitteln vor (Hathroubi *et al.*, 2016). Diese können bis zu 1000-mal höher liegen als im planktonischen Zustand (Gilbert *et al.*, 2002; Olsen, 2015). Einmal etablierte Biofilme auf Oberflächen mit Lebensmittelkontakt sind deshalb nur schwer zu entfernen und können zu einer stetigen Kontamination der Lebensmittel beitragen (Bremer *et al.*, 2006; Brooks & Flint, 2008). Handelt es sich bei den Biofilmbesiedlern um pathogene Keime, kann dies eine Verbrauchergefährdung verursachen. Sind in den Biofilmen Verderbniserreger enthalten, die Proteasen und Lipasen produzieren und an das Produkt abgeben, werden die Produktqualität und -haltbarkeit negativ beeinflusst (Latorre *et al.*, 2010; Teh *et al.*, 2011, 2014).

Eine Gefahr von Biofilmen am Melkgeschirr besteht in der Verbreitung von Mastitiserregern innerhalb der Milchviehherde. Dies kann, je nach Schwere der Infektion, enorme wirtschaftliche Folgen haben (Melchior *et al.*, 2006). Aufgrund dessen erfolgt eine Behandlung der Rinder mit Antibiotika zur Prävention oder Therapie von bakteriellen Infektionen (Tenhagen *et al.*, 2006; Oliver *et al.*, 2011). Die Antibiotika können anschließend z. B. über die Milch oder fäkale Verunreinigungen in den Biofilm gelangen (Capita & Alonso-Calleja, 2013). Aufgrund der Diffusionsbarriere, die die EPS-Schicht darstellt, kann es in bestimmten Schichten des Biofilms zum Vorliegen von subinhibitorischen bzw.

sublethalen Antibiotikakonzentrationen kommen (Flemming *et al.*, 2016; Hathroubi *et al.*, 2016). Hier können gesteigerte Mutationsraten zum Entstehen von vertikal übertragbaren Antibiotikaresistenzen führen (Høiby *et al.*, 2010; Andersson & Hughes, 2014; Olsen, 2015).

Aufgrund des Selektionsvorteils von resistenten Organismen können sich außerdem im Biofilm vorhandene Resistenzgene durch horizontale Übertragung schnell ausbreiten. Biofilme stellen demnach ein Reservoir für Antibiotikaresistenzgene dar (Balcázar *et al.*, 2015; Flemming *et al.*, 2016). Da diese häufig auf mobilen genetischen Elementen (MGE) lokalisiert sind, könnten Biofilme aufgrund der Heterogenität ihrer Zusammensetzung zudem zur Erweiterung des Wirtsspektrums der MGE und zur Plasmidstabilisierung beitragen (Oliver *et al.*, 2011, Madsen *et al.*, 2012).

1.1.2 Antibiotikaresistenzen

Antibiotika sind Stoffe natürlichen, halbsynthetischen oder synthetischen Ursprungs, die eine bakteriostatische (wachstumshemmende) oder bakterizide (abtötende) Wirkung auf Mikroorganismen haben. Dabei wechselwirken sie mit einem bestimmten Target, das nur im Mikroorganismus vorhanden ist, und somit dessen Wirtsorganismus keinen Schaden zufügt (Davies & Davies, 2010; Capita & Alonso-Calleja, 2013).

Heutzutage genutzte Antibiotika sind zumeist Derivate von natürlich vorkommenden Substanzen. Entsprechende Resistenzen existierten daher schon vor der Nutzung von Antibiotika in der Human- und Tiermedizin. Sie dienten als Schutzmechanismen der antibiotikaproduzierenden Organismen vor der eigenen evolutionären Einschränkung durch die von ihnen an die Umwelt abgegebenen Substanzen (White & McDermott, 2001; Blair *et al.*, 2015). Durch den erhöhten Antibiotikaeinsatz in der Human- und Veterinärmedizin seit der Entdeckung von Antibiotika kam es in den letzten Jahren jedoch zu einer gesteigerten Selektion und damit erhöhtem Vorkommen von (multi-)resistenten Mikroorganismen, nicht nur im klinischen Bereich und in der Tierhaltung, sondern auch in der allgemeinen Umwelt (Heuer *et al.*, 2011; Stokes & Gillings, 2011; Blair *et al.*, 2015; von Wintersdorff *et al.*, 2016).

In Abbildung 2 sind die hauptsächlichen Angriffsziele für Antibiotika innerhalb der Bakterienzelle sowie die entsprechenden Resistenzmechanismen mit jeweils beispielhaft genannten Antibiotikaklassen gegenüber gestellt. Potenzielle Angriffsziele von Antibiotika sind essentielle Stoffwechselwege von Bakterien, DNA-, RNA- und Protein-Synthese sowie die Zellwand und Zellmembran (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

Gegen die Wirkung von Antibiotika gibt es fünf verschiedene Resistenzmechanismen. Dabei handelt es sich um die Aktivierung alternativer Stoffwechselwege anstelle der gehemmten (1),

das Verhindern des Eindringens von Antibiotika in die Bakterienzelle, z. B. durch Herunterregulieren von Porinen in der Zellmembran (2), das aktive Ausschleusen von Antibiotika aus der Zelle durch (Multi-) Effluxpumpen (3), die Synthese von Antibiotika-hydrolysierenden oder -modifizierenden Enzymen (Acetyltransferasen, Phosphotransferasen, etc.) (4), und um verschiedene Modifikationen der Bindungsstellen für Antibiotika auf den Zielstrukturen (5), sodass die Antibiotika ihre Wirksamkeit verlieren (White & McDermott, 2001; Capita & Alonso-Calleja, 2013; Verraes *et al.*, 2013; Blair *et al.*, 2015).

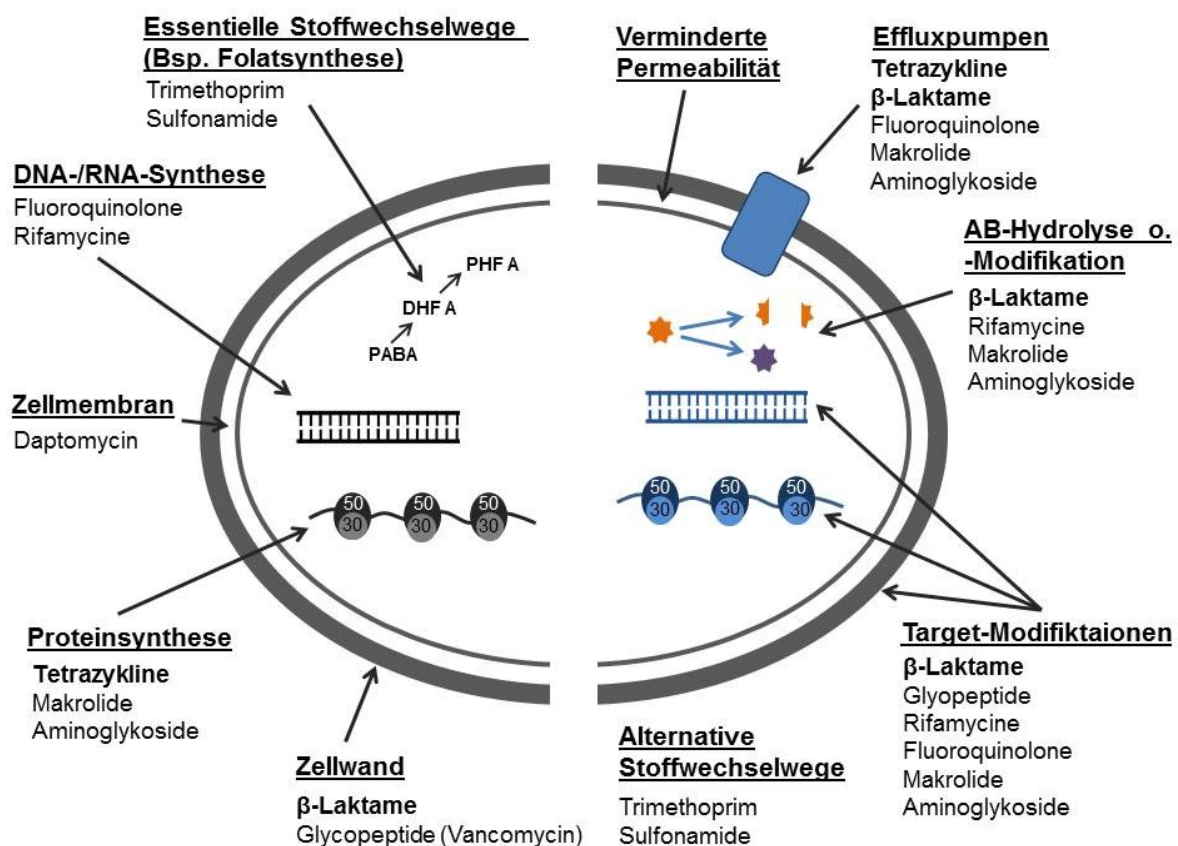


Abbildung 2: Schematische Darstellung der hauptsächlichen Angriffsziele von Antibiotika (AB) in der Bakterienzelle (links) und Resistenzmechanismen (rechts). Zusätzlich sind die entsprechenden Antibiotikaklassen aufgelistet. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Antibiotikaklassen sind fett markiert.

Wie in Abb. 2 zu erkennen, können Antibiotika die bakterielle Zellwand angreifen, indem sie die Peptidoglycansynthese hemmen. β -Laktam-Antibiotika binden zum Beispiel an das Enzym Transpeptidase, inaktivieren es und unterbinden damit die Quervernetzung der Zellwandbausteine. Dies führt zu einer verringerten Zellwandintegrität, sodass die Bakterienzelle dem osmotischen Druck nicht standhalten kann und lysiert (Hall & Mah, 2017). Ein weit verbreiteter Resistenzmechanismus gegen die Wirkung von β -Laktam-

Antibiotika sind β -Laktamasen, Enzyme, die den β -Laktam-Ring hydrolysieren und das Antibiotikum unwirksam machen (Toussaint & Gallagher, 2015). Verschiedene β -Laktamasen unterscheiden sich in ihrer Struktur und damit in der Fähigkeit und Effizienz, unterschiedliche β -Laktam-Antibiotika zu hydrolysieren (Blair *et al.*, 2015). Ein weiterer Mechanismus ist die Veränderung der Zielstruktur auf der Transpeptidase, an die β -Laktame binden (Targetmodifikation). Während β -Laktamasen häufig auf mobilen genetischen Elementen, wie Resistenzplasmiden oder Transposons, codiert sind, kommt die Targetmodifikation eher durch spontane Mutation und anschließende Selektion zustande (Poirel *et al.*, 2010; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2011).

Tetracycline hemmen die Proteinbiosynthese, indem sie sich an die 30S-Untereinheit der Ribosomen anlagern und dort die Bindung der Aminosäure-beladenen tRNA-Moleküle verhindern (Hall & Mah, 2017). Neben der aktiven Ausschleusung von Tetracyclinen aus der Bakterienzelle durch Efflux-Pumpen (codiert z. B. durch *tetA*, *tetK*), gibt es weitere Resistenzgene (*tetM*, *tetO*, *tetW*), die ribosomale Schutzproteine codieren, welche die Bindung von Tetracyclinen an ihren Wirkungsort verhindern (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Während diese beiden Resistenzmechanismen häufig auf mobilen genetischen Elementen, wie konjugativen Plasmiden oder Transposons, codiert, und damit horizontal übertragbar sind, sind auch hier Targetmodifikationen durch Mutationen möglich (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2011; Roberts, 2005; Nguyen *et al.*, 2014).

1.1.3 Horizontaler Gentransfer

Werden genetische Informationen bei der Zellteilung von Mutter- auf Tochterzellen übertragen, spricht man von vertikalem Gentransfer. Im Gegensatz dazu können genetische Informationen nicht nur zwischen verschiedenen Generationen, sondern auch zwischen verschiedenen Bakterienspezies oder -gattungen übertragen werden. In diesem Falle spricht man von horizontalem Gentransfer (HGT) (Capita & Alonso-Calleja, 2013). Für den horizontalen Gentransfer sind drei Mechanismen bekannt: die Transformation, die Transduktion und die Konjugation (Abb. 3) (Verraes *et al.*, 2013). Bei den übertragenen genetischen Elementen handelt es sich zumeist um Plasmide und Transposons, aber auch Bacteriophagen, Insertionssequenzen und genomische Inseln, sowie Kombinationen aus den genannten MGE sind via HGT übertragbar (Sørensen *et al.*, 2005; Verraes *et al.*, 2013).

Bei der Transformation erfolgt die Aufnahme frei vorliegender DNA durch kompetente Bakterienzellen. Voraussetzung für die stabile Integration in die Zelle ist die Rezirkulation, falls es sich bei der aufgenommenen DNA um ein Plasmid handelt, oder die Integration in das Bakteriengenom durch homologe Rekombination (Madsen *et al.*, 2012). Für Letztere muss

der aufgenommene DNA-Abschnitt ausreichend Homologien zu bereits auf dem Bakterienchromosom vorhandenen Sequenzen besitzen (Verraes *et al.*, 2013). Die wenigsten Bakterien sind dauerhaft kompetent zur Aufnahme von DNA, sondern die Kompetenzentwicklung wird durch den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren erst ausgelöst. Da in Biofilmen externe DNA (eDNA) einen wichtigen strukturellen Bestandteil der EPS-Schicht darstellt, ist dort die Transformationsrate vermutlich deutlich erhöht (Madsen *et al.*, 2012; Hall & Mah, 2017). Dafür spricht außerdem, dass das Vorliegen von eDNA sowie die Zell-Zell-Kommunikation über Quorum-Sensing in Biofilmen die Kompetenzentwicklung zur DNA-Aufnahme regulieren können (Flemming *et al.*, 2016). Stressoren wie Nährstoff- oder Sauerstofflimitierung sowie das Vorhandensein von Antibiotika können ebenfalls zur Kompetenzentwicklung beitragen (von Wintersdorff *et al.*, 2016).

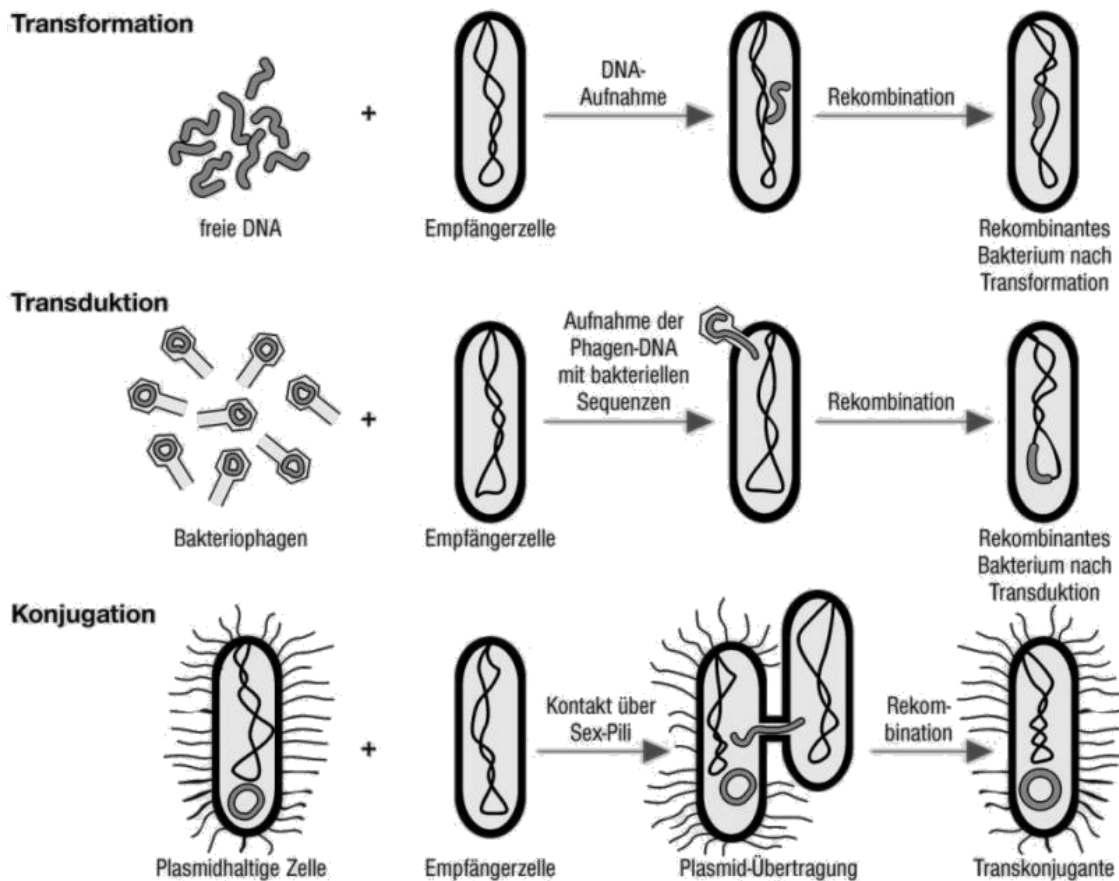


Abbildung 3: Mechanismen des horizontalen Gentransfers (HGT). Verändert nach: <http://www.wissen.de/lexikon/gentransfer> (11/2017).

Der zweite Mechanismus ist die Transduktion. Hier erfolgt die DNA-Übertragung über transduzierende Bakteriophagen von einer Wirtszelle auf die andere. Man unterscheidet zwischen generalisierter Transduktion, bei der beliebige Gene (zufällig) auf die

Empfängerzelle übertragen werden, und spezieller Transduktion, bei der nur dem Insertionsort benachbarte Gene übertragen werden. In der Literatur gibt es bisher keine konkreten Hinweise, dass der HGT mittels Transduktion in Biofilmen gesteigert ist. Da Bakteriophagen häufig ein sehr begrenztes Wirtsspektrum aufweisen, tritt dieser HGT-Mechanismus vermutlich überwiegend zwischen nahe verwandten Spezies auf (Verraes *et al.*, 2013). Allerdings weisen neuere Erkenntnisse aus Metagenomanalysen darauf hin, dass der Mechanismus der Transduktion nicht unterschätzt werden sollte, da in der Umwelt, auch in Biofilmen, eine viel größere Vielfalt an Bakteriophagen vorliegt, als bisher vermutet. Zudem konnte gezeigt werden, dass bestimmte Bakteriophagen ein breites Wirtsspektrum aufweisen und Antibiotikaresistenzgene sogar zwischen verschiedenen Taxa übertragen können (von Wintersdorff *et al.*, 2016).

Beim dritten Mechanismus handelt es sich um die Konjugation. Diese ist ein hochspezifischer Vorgang, bei dem mobile genetische Elemente, zumeist Plasmide oder Transposons, über direkten Zell-Zell-Kontakt von einer Spender- (Donor-) auf eine Empfänger- (Rezipienten-) Zelle übertragen werden. Während der Kontakt bei Gram-negativen Bakterien durch Sex-Pili hergestellt wird, spielen bei Gram-positiven Bakterien andere, bisher noch weitestgehend unbekannte Mechanismen eine Rolle. Bei Enterokokken konnten jedoch bereits Pheromone nachgewiesen werden, die von Empfängerzellen ausgeschüttet werden, um konjugative Plasmide von Donorzellen zu erhalten. Die Donorzellen reagieren darauf mit der Bildung eines Adhäsins, dass zur Aggregation von benachbarten Zellen führt (Verraes *et al.*, 2013). Aufgrund der räumlichen Nähe von Zellen innerhalb eines Biofilms ist es wahrscheinlich, dass die Konjugationsfrequenz erhöht ist.

Der Mechanismus der Konjugation wird häufig auch bei *in vitro* Studien zur Übertragbarkeit von Antibiotikaresistenzen zwischen ausgewählten Donor- und Rezipientenstämmen verwendet, sogenannten Mating-Experimenten (Sørensen *et al.*, 2005). Je nach Zielsetzung der Untersuchung können Reinkulturen von Donor- und Rezipient verwendet werden, oder bei einem der beiden Mating-Partner handelt es sich um eine Mischkultur mit ggf. unbekannter Spezieszusammensetzung aus einem bestimmten natürlichen Habitat (Jutkina *et al.*, 2016).

Insgesamt findet aufgrund der räumlichen Nähe sowie der großen bakteriellen Vielfalt und des damit verbundenen hochvariablen Genpools in Biofilmen der horizontale Gentransfer effizienter und mit höherer Frequenz statt, als im planktonischen Zustand (Sørensen *et al.*, 2005; Madsen *et al.*; 2012; Balcázar *et al.*, 2015; Hathroubi *et al.*, 2016).

1.1.4 Nachweismethoden für antibiotikaresistente Mikroorganismen

In der Mikrobiologie unterscheidet man grundsätzlich zwischen kultivierungsgestützten und molekularbiologischen Nachweismethoden, die jeweils Vor- und Nachteile besitzen. Diese gilt es anhand der zu beantwortenden Fragestellung gegeneinander abzuwägen.

Die grundlegende Voraussetzung für die Detektion von Biofilmbesiedlern mit Hilfe von kultivierungsgestützten Verfahren ist deren Wachstumsfähigkeit auf den verwendeten Nährmedien unter den gewählten Inkubationsbedingungen. Dies stellt einen Nachteil von kultivierungsgestützten Verfahren dar, da die tatsächlich im beprobten Biofilm vorhandene bakterielle Vielfalt nicht annähernd durch kultivierungsgestützte Methoden abgebildet werden kann.

Die Gründe hierfür sind vielseitig. Zum einen gibt es innerhalb von Biofilmen Nährstoff-, pH, Sauerstoff- und gegebenenfalls Hemmstoff-/Antibiotikagradienten (Olsen, 2015; Flemming *et al.*, 2016; Hall & Mah, 2017), welche verschiedensten Organismen das Wachstum in den entsprechend entstehenden Nischen ermöglichen, die mit Hilfe von kultivierungsgestützten Verfahren niemals gleichzeitig abgebildet werden können. Zudem sind die Stoffwechselraten der Mikroorganismen, insbesondere in den unteren Schichten des Biofilms, sehr gering, was zur Unterschätzung der tatsächlichen Keimzahl und Speziesvielfalt durch die mangelnde Erfassung lebender, aber nicht kultivierbarer Organismen (viable but nonculturable, VBNC) führt (de la Fuente-Núñez *et al.*, 2013; Flemming *et al.*, 2016).

Für die kultivierungsgestützte Erfassung von antibiotika-resistenten Bakterien besteht zudem das Problem der Festsetzung von Grenzwerten für Antibiotikakonzentrationen zur Unterscheidung zwischen sensitiven und resistenten Keimen. Dies ist insbesondere in hoch diversen bakteriellen Gemeinschaften ohne Wissen über die genaue Spezieszusammensetzung problematisch, da es eine Vielzahl nationaler, europäischer und internationaler Grenzwerte gibt, die sich teils untereinander, aber auch zwischen verschiedenen Bakteriengattungen und -gruppen stark unterscheiden (Tab. 1, Tüffers, 2017).

Ein klarer Vorteil von kulturellen Verfahren besteht in der Möglichkeit, Isolate zu vereinzeln und auf weitere Eigenschaften zu untersuchen. Neben der Identifizierung und Charakterisierung der Isolate können Kreuzresistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika untersucht sowie minimale Hemmkonzentrationen bestimmt werden. Außerdem können beliebige weitere Untersuchungen, wie Mating-Experimente, Tests auf Biofilmbildungsfähigkeit oder Genomsequenzierungen durchgeführt werden.

Tabelle 1: Grenzwerte für Resistenzen gegen die in der vorliegenden Studie untersuchten Antibiotika nach nationalen, internationalen und europäischen Normen. G+: Gram-positiv; G–: Gram-negativ (Tüffers, 2017).

Antibiotikum	Grenzwert für Resistenz (µg/ml)		
	DIN 58940-4 2004-02 ¹⁾	CLSI Januar 2015	EUCAST Januar 2017
Penicillin	> 0,125 <i>Staphylococcus</i> spp.	> 0,25 <i>Staphylococcus</i> spp.	> 0,125 <i>Staphylococcus</i> spp.
	> 1	> 16 <i>Enterococcus</i> spp.	> 2 <i>Streptococcus</i> spp.
		> 2 Anaerobier	> 0,5 Anaerobier
Ampicillin	> 8	> 32 <i>Enterobacteriaceae</i>	> 8 <i>Enterobacteriaceae</i> ,
		> 16 <i>Enterococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.,
		> 2 Anaerobier	<i>Streptococcus</i> spp., G+ Anaerobier
Cloxacillin	> 1	> 4 <i>Staphylococcus</i> spp.	> 2 G– Anaerobier
Tetracyclin	> 4	> 16 <i>Enterobacteriaceae</i> ,	
		<i>Acinetobacter</i> spp.,	
		<i>Pseudomonas</i> spp.,	
		<i>Staphylococcus</i> spp.,	
		<i>Enterococcus</i> spp., Anaerobier	

¹⁾ Mittlerweile ersatzlos zurückgezogen

Ein Vorteil von molekularbiologischen Verfahren gegenüber den kulturellen Verfahren besteht in der direkten DNA-Extraktion aus der Probe. Hier besteht in der Theorie keine Diskriminierung oder Selektion einzelner Bakteriengruppen durch die gewählten Inkubationsbedingungen, und VBNC-Zellen können ebenfalls detektiert werden. Allerdings ist ein besonders kritischer Punkt der Zellaufschluss bei der DNA-Extraktion, der in den meisten Fällen für leichter aufzuschließende Gram-negative Bakterien effizienter abläuft, als für Gram-positive Bakterien mit robusteren Zellwänden, sodass es in molekularbiologischen Verfahren zu einer Überrepräsentation Gram-negativer Organismen kommen kann (Weber *et al.*, 2014). Die Anwendung enzymatischer Zellaufschlussverfahren kann in diesen Fällen Abhilfe schaffen. Eine weitere Schwierigkeit bei den direkten Verfahren besteht in der mangelnden Unterscheidungsmöglichkeit zwischen DNA aus vermehrungsfähigen Zellen und der DNA lysierter Zellen sowie frei in der Biofilmmatrix vorhandener eDNA.

Zur Vervielfältigung (Amplifizierung) von Genabschnitten wird die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) genutzt. Dabei werden spezifische Primer zum Nachweis bestimmter Genabschnitte verwendet. Die Möglichkeit zur Quantifizierung von Genen aus Gesamt-DNA-Extrakten besteht beim Einsatz dieser als Template in der quantitativen realtime-PCR (RT-qPCR). Während der einzelnen PCR-Zyklen kann dabei die Zunahme der Amplifikate anhand eines messbaren Fluoreszenzanstiegs in Echtzeit verfolgt

werden. Zur Fluoreszenzenerzeugung wird z. B. der in doppelsträngige DNA interkalierende Farbstoff SYBR[®] Green verwendet. Die Fluoreszenz steigt während der exponentiellen Phase der Amplifikation proportional zur Menge der entstandenen Amplifikate an.

Für die Quantifizierung verwendet man den PCR-Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über einen angelegten Schwellenwert ansteigt (threshold cycle, C_T -Wert). Der C_T -Wert korreliert invers mit dem Logarithmus der anfänglichen Kopienzahl, das heißt je höher die Ausgangskonzentration an Template-DNA in der eingesetzten Probe, desto geringer ist der C_T -Wert. Die erhaltenen C_T -Werte können sowohl zur relativen als auch zur absoluten Quantifizierung der DNA-Ausgangsmenge in den Proben herangezogen werden. Bei der relativen Quantifizierung wird der C_T -Wert des nachzuweisenden Gens in Bezug zum C_T -Wert eines Haushaltsgens (housekeeping gene) gesetzt und somit der Gengehalt normalisiert. Eine absolute Quantifizierung der Genkopienzahl in der Probe ist durch die vorherige Erstellung einer Standardkurve mit DNA eines Referenzorganismus mit bekannter Konzentration möglich.

Laut Mühl et al. (2008) können die PCR-Reagenzien, insbesondere die Polymerase, in kommerziell erhältlichen RT-qPCR-Kits mit exogener DNA kontaminiert sein. Diese können beim Einsatz von universellen Primern zur Detektion hoch konservierter Regionen auf bakteriellen 16S rRNA-Genen falsch positive Signale in den Negativkontrollen (no template controls, NTC) verursachen. Eine Möglichkeit zur Elimination dieser Signale ist die Behandlung der Mastermixe mit Propidiummonoazid (PMA) vor der Zugabe der Template-DNA (Hein et al., 2007). Dieser Farbstoff interkaliert in frei vorliegende doppelsträngige DNA-Moleküle. Durch Lichtaktivierung entstehen Farbstoffradikale, die kovalente Bindungen mit der DNA eingehen. Die PCR-Amplifikation entsprechend modifizierter DNA-Moleküle wird dadurch unterbunden.

1.2 Zielsetzung

Aufgrund des Aufbaus von Biofilmen und der phänotypischen Veränderungen, die die enthaltenen Zellen vornehmen, bieten sie eine erhöhte intrinsische Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln und Antibiotika. Zudem können Biofilme ein Reservoir für mobile genetische Elemente darstellen, auf denen Antibiotikaresistenzen codiert sind. Da in bakteriellen Biofilmen eine hohe Zelldichte neben meistens hoch diversen Bakterienpopulationen vorliegt, ist es wahrscheinlich, dass ein Austausch von Antibiotikaresistenzgenen durch horizontalen Gentransfer (HGT) in Biofilmen vermehrt stattfindet (Flemming *et al.*, 2016). Zusätzlich können Biofilme zur Erweiterung des Wirtsspektrums von MGE beitragen (Madsen *et al.*, 2012).

Die antibiotikaresistenten Bakterien können in Biofilmen an verschiedenen Stellen der Melkanlage persistieren, die Milch beim Durchfluss kontaminieren und mit der Anlieferungsmilch in milchverarbeitende Betriebe übertragen werden. Somit könnten sie gegebenenfalls an Verbraucher weitergetragen werden. Zusätzlich besteht die Gefahr der Verbreitung von antibiotikaresistenten Mastitisserregern innerhalb der Milchviehherde. Auch wenn nicht die Erreger direkt, sondern nur ihre enthaltenen Antibiotikaresistenzgene in die Umwelt gelangen, und von dort weiterverbreitet werden, besteht die potenzielle Gefahr der Neuausstattung von humanpathogenen Erregern mit Antibiotikaresistenzen (Oliver *et al.*, 2011; Madsen *et al.*; 2012; Capita & Alonso-Calleja, 2013; Verraes *et al.*, 2013).

Im vorliegenden Projekt sollte der Zusammenhang zwischen erhöhten Bakteriendichten in Biofilmen einer Melkanlage und dem Austausch von Antibiotikaresistenzgenen durch horizontalen Gentransfer mit Hilfe einer Kombination aus kultivierungsgestützten und molekularbiologischen Methoden untersucht werden.

Hierfür wurden Tupferabstrichproben an verschiedenen Stellen der Melkanlage eines Betriebes genommen, der mit ca. 60 Milchrindern den deutschlandweiten Durchschnittswert gut repräsentiert. Es wurden Resistenzen gegenüber den β -Laktam-Antibiotika Cloxacillin, Penicillin G und Ampicillin sowie gegenüber Tetracyclin getestet. Während Cloxacillin in dem untersuchten Milchviehbetrieb als Trockenstellpräparat (Orbenin Extra) auch präventiv eingesetzt wurde, wurden die restlichen Antibiotika seltener und lediglich therapeutisch verabreicht.

2 Material und Methoden

2.1 Untersucher Milchviehbetrieb

Bei dem untersuchten Milchviehbetrieb handelt es sich um die Lehr- und Forschungsstation Gut Frankenforst in Königswinter-Vinxel. Hier werden etwa 60 Milchkühe der Rasse Deutsche Holstein zweimal täglich maschinell gemolken. Anschließend wird die Melkanlage durch ein Cleaning-in-Place (CIP)-System gereinigt und desinfiziert. Hierzu werden abwechselnd die Mittel Circo Super AFM (alkalisch) und Circo Super SFM (sauer) (GEA Farm Technologies, Bönen) eingesetzt. Diese werden entsprechend der Herstellerangaben automatisch auf eine Endkonzentration von 0,4 % dosiert. Die aktiven Komponenten des alkalischen Reinigungs- und Desinfektionsmittels Circo Super AFM sind Natriumhypochlorit und Natriumhydroxid, während es sich bei den aktiven Komponenten des sauren Mittels Circo Super SFM um Phosphor- und Salpetersäure handelt. Die Rohmilch wird bis zur Abholung durch die Molkerei für drei Tage bei 4 °C in einem Sammel-tank (Kryos 6BII, WestfaliaSurge Japy SAS, Saint Apollinaire, Frankreich) gelagert. Nach der Abholung wird auch der Milchsammel-tank durch ein CIP-Verfahren gereinigt und desinfiziert.

Zum Trockenstellen der Milchkühe wird präventiv das Cloxacillin-haltige Präparat Orbenin Extra verabreicht. Penicillin-, Ampicillin- und Tetrazyklin-haltige Präparate werden weniger häufig und lediglich therapeutisch zur Behandlung von akuten Infektionen eingesetzt.

2.2 Versuchsaufbau

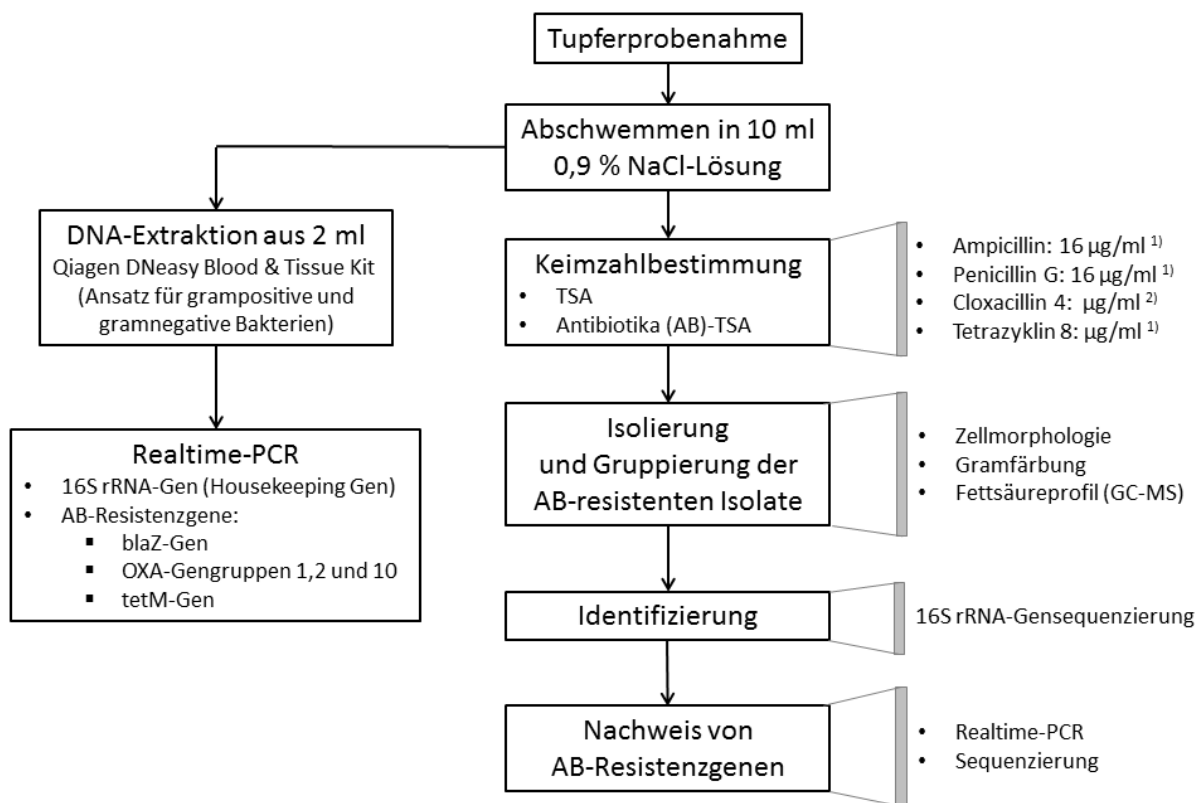
Zur Untersuchung des Resistenzstatus der Biofilme wurden an verschiedenen Stellen innerhalb der Melkanlage Tupferproben genommen. Die Probenahmestellen mit den jeweils beprobten Flächen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Nach dem Abschwemmen der Tupferköpfe in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung wurden die Abstrichproben parallel jeweils in einem molekularbiologischen Ansatz und einem kultivierungsgestützten Ansatz untersucht. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

Mit Hilfe der gewonnenen antibiotikaresistenten Isolate wurden zusätzlich Mating-Experimente zur *in-vitro*-Überprüfung der Übertragbarkeit von Antibiotikaresistenzen via HGT durchgeführt. Die Vorgehensweisen aller Ansätze werden im Folgenden näher erläutert.

Tabelle 2: Bereiche der Tupferprobenahme in der Melkanlage mit im Folgenden verwendeten Abkürzungen und abgetupfter Fläche. n. m.: nicht messbar.

Probenahmeort	Abkürzung	Fläche (cm²)
Melkstand		
Melkbecherinnenraum	MB	n. m.
Melkbecherablagen	MBA	15,7
Filterrohr inkl. Stofffilter	FR	25,1
Edelstahlrohr am Anfang der Druckleitung	DAE	35,2
Milchküche		
Edelstahlrohr am Ende der Druckleitung	DEE	35,2
Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung	DEK	35,2
Auslassstutzen des Milchsammeltanks	ST	75,4



¹⁾DIN-58940-7: 1994-09

²⁾CLSI Tab. 2C, M02 und M07

Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung des Resistenzstatus in den Biofilmpuben aus der Melkanlage. Links: molekularbiologischer Ansatz, rechts: kultivierungsgestützter Ansatz.

2.3 Molekularbiologischer Ansatz

2.3.1 DNA-Extraktion aus den Tupferabschwemmlösungen

Für die Extraktion der Gesamt-DNA wurden 2 x 2 ml Tupferabschwemmlösung abzentrifugiert, in 180 µl Lysepuffer (20 mM Tris HCl, pH 8,2; 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); 1,2 % Triton X-100) resuspendiert, und die DNA jeweils nach dem Herstellerprotokoll für Gram-positive und Gram-negative Bakterien mit dem Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Die DNA-Extrakte wurden anschließend in der Vacufuge (Concentrator 530, Eppendorf, Hamburg) auf etwa die Hälfte des Volumens aufkonzentriert.

2.3.2 Realtime-PCR zum Nachweis der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene

Zur Quantifizierung der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene in den Gesamt-DNA-Extrakten der Tupferabschwemmlösungen, und zur Erstellung von Standardkurven aus Referenzorganismen, wurde der „QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Alle RT-qPCR-Reaktionen wurden mit dem Mastercycler epRealplex (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Zur Verifizierung der korrekten Amplifikate wurden nach jedem RT-qPCR-Lauf Schmelzkurven erstellt und bei Bedarf die entstandenen PCR-Produkte zur Überprüfung der Bandenlänge zusätzlich auf ein Agarosegel aufgetragen (1 % Agarose, Längen-Marker: HyperLadder™ 1 kb, Bionline, Luckenwalde).

Die verwendeten Primer für die Amplifikation der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene sind mit den jeweiligen Referenzstämmen in Tabelle 3 charakterisiert. In Tabelle 4 ist die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze dargestellt und Tabelle 5 enthält die entsprechenden PCR-Programme.

Zum Nachweis verschiedener β -Lactamasen wurden spezifische Primer für das *blaZ*-Gen sowie für die OXA-Gruppen 1, 2 und 10 verwendet. Als Referenzorganismen dienten *Staphylococcus epidermidis* RP62A, *E. coli* E2, *E. coli* W3110 und *Providencia stuartii* P125 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Beate Henrichfreise, Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn). Als Referenzorganismus für das Tetracyclin-Resistenz verleihende *tetM*-Gen wurde *Staphylococcus aureus* 1450194 verwendet. Zur Erstellung von Standardkurven wurden DNA-Extrakte aus Reinkulturen der in Tabelle 3 genannten Referenzorganismen verwendet und mindestens drei Verdünnungsstufen einer dekadischen Verdünnungsreihe in der RT-qPCR eingesetzt.

Tabelle 3: Charakterisierung der in den RT-qPCR-Reaktionen eingesetzten Primer und Referenzorganismen.

Gen (-gruppe)	Bez.	Sequenz (5' → 3')	Amplifikat-länge (bp)	Quelle	Referenz-organismus
16S rRNA	F1048	5'-GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA-3'	146	Maeda <i>et al.</i> (2003)	<i>E. coli</i> E2
	R1194	5'-ACGTCRTCCMCACCTTCCTC-3'			
OXA-1	B1-F	5'-TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT-3'	427		<i>E. coli</i> E2
	B1-R	5'-TTTCTTGGCTTTTATGCTTG-3'			
OXA-2	B2-F	5'-AAGAAACGCTACTCGCCTGC-3'	478	Bert <i>et al.</i> (2002)	<i>E. coli</i> W3110
	B2-R	5'-CCACTCAACCCATCCTACCC-3'			
OXA-10	B10-F	5'-TCAACAAATCGCCAGAGAAG-3'	276		<i>P. stuartii</i> P125
	B10-R	5'-TCCCACACCAGAAAAACCAG-3'			
<i>blaZ</i>	BG-Fneu	5'-GAGATTTGCCTATGCTTCTACT-3'	233	mod. nach Pereira <i>et al.</i> (2014)	<i>S. epidermidis</i> RP62A
	BG-R	5'-CCACCGATYTCKTTTATAATTT-3'			
<i>tetM</i>	tetM-F	5'-ACAGAAAGCTTATTATATAAC-3'	171	Aminov <i>et al.</i> (2003)	<i>S. aureus</i> 1450194
	tetM-R	5'-TGGCGTGTCTATGATGTTTAC-3'			

Um die Amplifikation bereits im Mastermix enthaltener unspezifischer Hintergrund-DNA mit 16S rRNA-Gen-spezifischen Primern zu unterdrücken, wurden alle Mastermixe vor Zugabe der Template-DNA mit Propidiummonoazid (PMA) (0,8 µM Endkonzentration) nach Hein *et al.* (2007) behandelt.

Die behandelten Ansätze wurden zunächst 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend mit einer 400 W Halogenlampe mit einem Abstand von ca. 25 cm bestrahlt. Zum Schutz vor übermäßiger Erhitzung wurden die Proben während der Bestrahlung auf Eis gelagert und bei 150 rpm geschüttelt (Weber *et al.*, 2014).

Tabelle 4: Zusammensetzung der Reaktionsansätze der RT-qPCR.

Komponente	Endkonzentration	Volumen (µl)	Hersteller
QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix 2x	1 x	10	Qiagen, Hilden
Fw-Primer (10 µM)	0,3 µM	0,6	VBC Biotech, Wien,
Rv-Primer (10 µM)	0,3 µM	0,6	AUT
Template-DNA		2	
A. dest.		ad 20	

Tabelle 5: PCR-Programme zur RT-qPCR-Detektion der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene OXA-1, -2, -10, *blaZ* und *tetM*.

		Temperatur (°C)	Dauer	Zyklenzahl
Erster Denaturierungsschritt		95	15 min	1
Denaturierung		94	15 s	
Annaeling	16S rRNA Gen	57,0		35 (16S rRNA-Gene)
	OXA-1			
	OXA-2	52,1	30 s	
	OXA-3			40 (AB-Resistenzgene)
	<i>blaZ</i>	50,0		
	<i>tetM</i>	47,0		
Elongation		72	30 s	
Schmelzkurve		Annealingtemp. - 95	20 min	

2.3.3 Absolute Quantifizierung der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene

Für eine absolute Quantifizierung der 16S rRNA-Gene in den Gesamt-DNA-Extrakten der Tupferproben wurde zunächst mit dem Primerpaar GM3F (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') und GM4R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (Muyzer *et al.*, 1995) ein ca. 1500 bp langes Amplifikat des 16S rRNA-Gens aus dem DNA-Extrakt des Referenzorganismus *E. coli* E2 gewonnen. Die PCR-Bedingungen waren dieselben wie für das Primerpaar M13F/M13R und sind Tabelle 6 zu entnehmen. Der Erfolg der Amplifizierung wurde über die Kontrolle der Bandenlänge durch Auftragen auf ein 1 %iges Agarosegel verifiziert (s. o.). Anschließend wurde das Amplifikat mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und die Konzentration im Plattenphotometer (Epoch Reader, BioTek, USA) mittels Take 3 Mikro-Volumen Platte gemessen. Da damit sowohl die Amplifikatlänge wie auch die Konzentration des PCR-Produktes bekannt waren, konnte über Formel 1 nach Whelan *et al.* (2003) die Genkopienanzahl pro PCR-Reaktionsansatz berechnet werden.

$$\text{Kopien} / \mu\text{l Template} = \frac{\text{DNA - Konzentration} \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \right) * 6,02 * 10^{23} \left(\frac{\text{mol} * \text{Da}}{\text{g}} \right)}{\text{Amplifikatlänge (bp)} * 660 \left(\frac{\text{Da}}{\text{bp} * \text{mol}} \right)} \quad (\text{Formel 1})$$

Aus dem aufgereinigten PCR-Produkt wurde eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt und mit dem Primerpaar F1048/ R1194 (Tab. 3) in der RT-qPCR eingesetzt. Durch Anlegen einer linearen Regression der logarithmierten Kopienzahlen pro Ansatz und den C_T-Werten der jeweiligen Verdünnungsstufen wurde eine Kalibriergerade zur Berechnung der Kopienanzahl pro Reaktionsansatz erstellt.

Um eine absolute Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgene in den Gesamt-DNA-Extrakten der Tupferproben zu erreichen, wurden Klonierungen mit dem „pGEM®-T Vector System“ (Promega, Madison, USA) durchgeführt. Hierfür wurden die mit den entsprechenden Primern aus den Referenzorganismen gewonnenen Amplifikate (Tab. 3) mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor kloniert. Kompetente *E. coli* JM109 Zellen wurden mit dem Vektor transformiert, vektorhaltige Zellen selektiert, ihre DNA extrahiert und als Template in PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Antibiotikaresistenzgene mit Teilen des Vektors eingesetzt (Tabelle 6). Nach gelelektrophoretischer Überprüfung der korrekten Amplifikatlänge (Abschnitt 2.3.2) wurde die Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte plattenphotometrisch gemessen und nach Formel 1 die Genkopienanzahl pro Ansatz berechnet. Nach Einsatz verschiedener Verdünnungsstufen der Amplifikate in der RT-qPCR mit den Primern und Reaktionsbedingungen aus den Tabellen 3-5 konnten Standardkurven erstellt werden. Dies erlaubte, analog zur Quantifizierung der 16S rRNA-Gene, eine Berechnung der Kopienzahl/Ansatz über den C_T-Wert der Reaktion.

Tabelle 6: Charakterisierung der Primer und des PCR-Programmes zur Amplifikation der Klonierungsprodukte.

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Amplifikatlänge	Quelle
M13-F	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	Insert	Messing (1983)
M13-R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	+ ca. 200 bp	
PCR-Programm			
	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklenzahl
Erster Denaturierungsschritt	95	2	
Denaturierung	95	1	10
Annealing	49	1	
Elongation	72	1,5	
Denaturierung	95	1	20
Annealing	44	1	
Elongation	72	1,5	
Letzter Syntheseschritt	72	5	

2.3.4 Berechnung von Keimzahläquivalenten aus den RT-qPCR-Ergebnissen

Um einen direkten Vergleich zwischen den kulturell ermittelten Keimzahlen und den molekularbiologisch via RT-qPCR aus denselben Tupferabschwemmungen gewonnen Daten zur ermöglichen, wurden aus den Kopienanzahlen des molekularbiologischen Ansatzes Keimzahläquivalente berechnet.

Hierfür musste die 20-fache Aufkonzentrierung der DNA aus den Tupferabschwemmlösungen vor Einsatz als Template in der RT-qPCR berücksichtigt werden. Für die Darstellung der Keimzahläquivalente/cm² wurde zudem durch die jeweils abgetupfte Fläche dividiert.

Bei der Berechnung der Gesamtkeimzahl (GKZ)-Äquivalente aus den detektierten 16S rRNA-Genen, musste zusätzlich berücksichtigt werden, dass eine Bakterienzelle mehrere Kopien des 16S rRNA Genes enthalten kann und dass sich die Anzahl der Genkopien pro Zelle zwischen verschiedenen Gattungen oder Spezies stark unterscheiden kann. Zur ungefähren Berechnung der Keimzahläquivalente wurde mit einem durchschnittlichen Wert von 4,2 Genkopien pro Bakterienzelle (Větrovský & Baldrian, 2013) gerechnet. Bei der Berechnung der Keimzahläquivalente der Antibiotikaresistenten wurde angenommen, dass jede Bakterienzelle nur ein Resistenzgen enthält.

2.4 Kultivierungsgestützter Ansatz

2.4.1 Kulturelle Keimzahlbestimmung und Vereinzelung von Isolaten

Für die kulturelle Keimzahlbestimmung wurden aus den Tupferabschwemmlösungen der jeweiligen Probenahmeorte (Abschnitt 2.2) dekadische Verdünnungsreihen erstellt. Aus den Verdünnungsstufen wurde durch Ausplattieren im Oberflächenverfahren auf Trypton-Soja-Agar (TSA) (Merck KGaA, Darmstadt) die Gesamtkeimzahl (GKZ) pro abgetupfte Fläche (KbE/cm²) bestimmt.

Zusätzlich wurden die Keimzahlen der resistenten Mikroorganismen auf mit Antibiotika versetztem TSA bestimmt. Dabei handelte es sich um die drei β -Lactam-Antibiotika Ampicillin, Penicillin G (jeweils 16 μ g/ml) und Cloxacillin (4 μ g/ml) sowie um Tetracyclin (8 μ g/ml). Als Grenzwerte der Antibiotikakonzentrationen für die Differenzierung zwischen Antibiotika-sensiblen und –resistenten Keimen wurden die Angaben des CLSI (2016) sowie aus der DIN 58940-7 herangezogen.

Die Auszählung der Kolonien erfolgte nach 48 h Inkubation bei 30 °C. Die Hauptbesiedler auf TSA sowie optisch unterschiedliche Kolonien auf den mit Antibiotika versetzten Agarplatten wurden nach 72 h Inkubation bei 30 °C auf den entsprechenden Herkunftsmedien vereinzelt.

2.4.2 Makroskopische und mikroskopische Differenzierung der Isolate

Die Koloniemorphologie der Reinkulturen wurde durch die mit dem bloßen Auge bestimmbaren Charakteristika Farbe, Oberfläche und Umriss makroskopisch beschrieben. Zusätzlich wurde die Zellmorphologie mikroskopisch bestimmt (Carl Zeiss Axio Scope.A1, Oberkochen). Eine weitere Differenzierung der Isolate erfolgte durch die Bestimmung des Gramfärbeverhaltens nach Gerhardt *et al.* (1981) und/oder der Durchführung des KOH-Tests als Alternativmethode.

2.4.3 Fettsäureanalyse

Die Erstellung von Fettsäureprofilen diente der Gruppierung der Isolate. Die Fettsäureanalyse erfolgte aus für 48 h bei 30 °C auf TSA inkubierten Reinkulturen. Zunächst wurden mit der Methode nach Sasser (1990) Fettsäuremethylester (FAME) präpariert, anschließend extrahiert und mittels Gaschromatographie und gekoppeltem Massenspektrometer (GC-MS) (7890A und 5975C, Agilent Technologies, Böblingen) analysiert. Falls nötig, wurden die FAMEs im Stickstoffstrom aufkonzentriert und erneut analysiert.

Die Berechnung der äquivalenten Kettenlängen (equivalent chain length, ECL) erfolgte über die Bestimmung des Verhältnisses der Retentionszeiten der unbekannten Peaks zu den Retentionszeiten eines FAME-Standards (MIDI System Calibration Standard, Agilent Technologies, Böblingen). Die Fettsäuren wurden anschließend über ihre ECL-Werte durch den Abgleich mit einer 126 Standardwerte enthaltenden internen Datenbank identifiziert. Zur Verifizierung wurden die Massenspektren der entsprechenden Peaks mit der Software „ChemStation GC-MS Data-Analysis“ Version E.02.00.493 (Agilent Technologies, Böblingen) analysiert.

Abschließend erfolgte die Berechnung der Prozentanteile der einzelnen Fettsäuren über die Peakflächen der als Fettsäuren identifizierten Peaks im Verhältnis zur Gesamtpeakfläche.

2.4.4 DNA-Extraktion und 16S rRNA-Gensequenzierung

Aus den Fettsäuregruppen wurden einzelne Vertreter zur Identifizierung über die Sequenzierung von Teilen des 16S rRNA-Gens ausgewählt. Die DNA-Extraktion erfolgte aus TSB-Übernachtskulturen. Je nach Gram-Färbeverhalten wurde nach dem Protokoll des Herstellers des Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden) für Gram-positive oder -negative Bakterien vorgegangen. Die Amplifizierung der 16S rRNA-Gene mit dem Primerpaar GM3/GM4, die Längenkontrolle der Amplifikationsprodukte und deren Aufreinigung erfolgte wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben.

Zum Ansequenzieren eines etwa 700 bp langen vorderen Bereichs des 16S rRNA Gens wurde das PCR-Produkt mit dem Primer GM8Rneu (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') (G. Muyzer, unveröffentlicht) vermischt und durch den externen Dienstleister SeqLab (Göttingen) sequenziert. Zur genaueren Identifizierung wurde bei Bedarf zusätzlich eine weitere Sequenzierung des hinteren Genabschnitts mit dem Primer GM1F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAAT-3') (Muyzer *et al.*, 1993) vorgenommen.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas Lite 2.6.2 (Technelysium, South Brisbane, AUS) ausgewertet und geschnitten. Zum Erhalt der Vollsequenz wurden die mit den Primern GM8Rneu und GM1F erhaltenen Teilsequenzen mit dem Programm BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) zusammen gefügt. Die Identifizierung der Isolate auf Speziesebene erfolgte über den Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit den in den Online-Datenbanken „EzTaxon-e server“ (Yoon *et al.*, 2017) und „Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)“ (Altschul *et al.*, 1997) hinterlegten 16S rRNA-Gensequenzen von Typstämmen.

2.4.5 Erstellung phylogenetischer Stammbäume

Zur Darstellung der evolutionären Distanz zwischen den identifizierten antibiotikaresistenten Bakterienisolaten und ihren nächstähnlichen Typstämmen wurden phylogenetische Stammbäume aus den 16S rRNA Gensequenzen erstellt. Zunächst wurde mit dem Programm MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) ein ClustalW-Alignment (Thompson *et al.*, 1994) der Isolatsequenzen und der Sequenzen ihrer nächstähnlichen Typstämme erstellt. Anschließend wurde aus diesem ein phylogenetischer Stammbaum mit dem Neighbor-Joining-Algorithmus (Saitou & Nei, 1987) berechnet. Die Korrektheit der Stammbaumtopologie wurde mit Hilfe eines Bootstrap-Verfahrens (Felsenstein, 1985) mit 1.000 Wiederholungen überprüft.

2.4.6 Plasmidextraktion und Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen aus den Isolaten

Aus ausgewählten antibiotikaresistenten Bakterienisolaten wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Kits „NucleoSpin® Plasmid-Kit“ (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) und „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Mit Hilfe der in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen RT-qPCR-Reaktionen wurden die Extrakte zur Detektion von eventuell auf Plasmiden lokalisierten Antibiotikaresistenzgenen verwendet. Bei positivem Nachweis wurden die gewonnenen Resistenzgen-Amplifikate mit den für die RT-qPCR eingesetzten Primern (Tabelle 3) sequenziert (s. Abschnitt 2.4.4) und die erhaltenen Sequenzen via „BLAST“ (Altschul *et al.*, 1997) mit bereits hinterlegten Sequenzen verglichen.

2.5 Mating-Experimente

Zur Überprüfung der *in-vitro* Übertragbarkeit von mobilen genetischen Elementen durch antibiotikaresistente Isolate aus der Melkanlage wurden Mating-Experimente durchgeführt. Um geeignete Donor- und Rezipientenstämme aus der Vielzahl der Isolate zu identifizieren, wurden zunächst Vorversuche zur MHK-Bestimmung und Plasmidextraktion sowie Clumping-Assays nach Conwell *et al.* (2017) durchgeführt. Zusätzlich wurden Selektionsmechanismen überprüft, um Transkonjuganten von Donatoren zu unterscheiden. Hierzu gehörte die Erzeugung von Rifampicin-Resistenzen in potenziellen Rezipienten sowie die Selektion anhand von unterschiedlichen Stoffwechselwegen.

Für einige Mating-Experimente wurden als Rezipienten die Stämme *E. coli* MT102RN und *Salmonella* Enteritidis Fa8065 von M. Dolejská (Universität für Veterinär- und pharmazeutische Wissenschaften, Brünn, Tschechien; Dolejská *et al.*, 2011) zur Verfügung gestellt. Beide Stämme sind gegen Rifampicin resistent. Während *E. coli* MT102RN zusätzlich eine Resistenz gegen Nalidixinsäure aufwies, besaß *Salmonella* Enteritidis Fa8065 eine weitere Resistenz gegenüber Natriumazid.

2.5.1 MHK-Bestimmung der Isolate

Um aus den Isolaten geeignete Donor- und Rezipientenstämme für Mating-Experimente zu ermitteln, wurden zunächst die minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) für die Antibiotika Ampicillin, Cloxacillin, Penicillin G und Tetracyclin bestimmt. Die MHK-Bestimmung erfolgte mittels Mikrodilution in 96-well Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT) in Anlehnung an die DIN 58940-7.

TSB-Übernachtskulturen der Isolate wurden auf eine Zelldichte von ca. $1,0 \times 10^6$ KbE/ml eingestellt. Anschließend wurden ab der zweiten Spalte 50 µl Trypton-Soja-Bouillon (TSB) in jeder Spalte der Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl Antibiotikastocklösung (1024 µg/ml) in die erste Spalte der Mikrotiterplatte gegeben. Davon wurden 50 µl in die nächste Spalte übertragen, sodass durch sukzessives 1:1 Verdünnen in TSB ohne Antibiotikum und Verwerfen von 50 µl der letzten Spalte die Antibiotikakonzentrationen pro Spalte nach Zugabe der Kultur letztlich von 512 µg/ml bis 1 µg/ml reichten. Abschließend wurde in jede Spalte 50 µl der eingestellten Vorkultur gegeben, um eine Zelldichte von $5,0 \times 10^5$ KbE/ml zu erreichen. Für jedes Isolat wurde eine Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum und eine unbeimpfte Negativkontrolle mitgeführt. Nach 24 h Inkubation bei 30 °C erfolgte die Auswertung durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm im Plattenphotometer (Epoch Reader, BioTek, USA).

Die ermittelte MHK wurde im Abschluss durch Ausstreichen auf festen Medien mit der entsprechenden Antibiotikakonzentration noch einmal überprüft. Zusätzlich wurden Kreuzresistenzen von ausgewählten Isolaten durch Ausstreichen auf den jeweils anderen Antibiotika-haltigen TSA-Medien mit den in Abschnitt 2.4.1 angegebenen Konzentrationen überprüft.

2.5.2 Plasmidextraktion aus den Isolaten

Um zu überprüfen, ob potentielle Donorstämme Antibiotikaresistenz-verleihende Plasmide als möglicherweise mobile genetische Elemente enthalten, wurden aus ausgewählten Isolaten Plasmide mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Zusätzlich wurde das Extraktionsprotokoll durch Austausch des Kit-eigenen Lysepuffers gegen einen selbst hergestellten Lysepuffer (20 mM Tris HCl, pH 8,2; 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); 1,2 % Triton X-100) und durch den Einsatz von Lysozym (20 mg/ml) modifiziert.

Das Vorhandensein von Plasmiden wurde durch Auftragen der Extrakte auf ein Agarosegel (1 % Agarose, Längen-Marker: HyperLadderTM 1 kb, Bioline, Luckenwalde) überprüft. Als Positivkontrolle für in hoher Kopienanzahl (high-copy) in der Zelle vorhandene kleine Plasmide diente ein Plasmid enthaltender Klon der Spezies *E. coli* JM109 aus Abschnitt 2.3.3. Als Positivkontrolle für in geringer Kopienanzahl (low-copy) in der Zelle enthaltene große Plasmide diente der Stamm *Corynebacterium crudilactis* JZ16^T, der anhand seiner Genomsequenz nachweislich ein entsprechendes Plasmid besitzt (Zimmermann *et al.*, 2016).

2.5.3 Erzeugung von Rifampicin-Resistenzen in Rezipienten

Um Transkonjuganten von Donatoren zu unterscheiden, sollte das hierfür verwendete Medium neben dem Antibiotikum, gegen das eine Resistenz übertragen wurde, auf ein weiteres Rezipienten-spezifisches Merkmal selektieren. Dafür wurden potenzielle Rezipientenstämme zunächst in sublethalen Rifampicin-Konzentrationen inkubiert und anschließend die Rifampicin-Konzentration täglich sukzessive um 50-100 % gesteigert. Das Wachstum wurde mittels Messung der optischen Dichte (OD) im Plattenphotometer (Epoch Reader, BioTek, USA) ermittelt und die neuen MHKs durch Ausstreichen auf festen Nährmedien mit entsprechender Rifampicin-Konzentration verifiziert. Eine Resistenz wurde bei Rifampicin-Konzentrationen von > 1 µg/ml angenommen.

2.5.4 Clumping-Assays mit Enterokokken

Mit verschiedenen Stämmen der Spezies *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* wurden Clumping-Assays mit der Methode von Conwell *et al.* (2017) durchgeführt. Die Methode beruht auf der mikroskopischen Betrachtung des Verhaltens der Zellen nach Zugabe des sterilfiltrierten Kulturüberstandes des jeweiligen potenziellen Mating-Partners sowie dem eigenen Kulturüberstand und sterilem Medium als Kontrollen. Schüttet ein Stamm Pheromone aus, die sich im Kulturüberstand befinden und einen Plasmid-enthaltenden Stamm zur Aktivierung des Konjugationsapparates veranlassen, verklumpen die Zellen unter dem Mikroskop. Pheromon-produzierende Stämme werden in Folge dessen als nicht Plasmid-enthaltende potenzielle Rezipienten betrachtet, auf die Pheromone mit Verklumpen reagierende Stämme als potenzielle Donatoren.

2.5.5 Ablauf der Mating-Experimente

Der schematische Ablauf der Mating-Experimente ist am Beispiel der Übertragung einer Tetracyclin-Resistenz auf Rifampicin-resistente Rezipienten in Abbildung 5 dargestellt.

Donor- und Rezipientenstämme wurden in ihren jeweiligen Antibiotika-haltigen Selektivmedien über Nacht bei 30 °C inkubiert und anschließend ihre OD im Küvettenphotometer (Genesys 10S VIS, Thermo Scientific, Waltham, USA) auf den 0,5 McFarland Standard eingestellt (entspricht ca. $1,5 \times 10^8$ KBE/ml). Die eingestellten Kulturen wurden in einem bestimmten Verhältnis (meistens 1:1) vermischt und 50 µl des Gemischs auf einen Filter der Porengröße 0,45 µm aufgetragen. Dieser wurde über Nacht auf einer Agarplatte inkubiert, die das zu übertragene Antibiotikum in für den Rezipienten sub-letaler Konzentration enthielt, um den Selektionsdruck zu steigern.

Nach der Inkubation wurde der Filter in 4 ml steriler Ringerlösung abgeschwemmt, eine Verdünnungsreihe erstellt und auf drei verschiedenen Medien ausplattiert, die folgende Selektionsmarker enthielten:

1. Das Antibiotikum, gegen welches die Resistenz übertragen werden sollte (Wachstum von Donatoren und Transkonjuganten).
2. Das Antibiotikum, gegen welches nur der Rezipient eine Resistenz aufweist sowie ggf. einen weiteren Selektionsmarker (z. B. X-Gal) (Wachstum von Rezipienten und Transkonjuganten).
3. Beide unter 1 und 2 genannten Selektionsmarker (Wachstum ausschließlich von Transkonjuganten).

Zum Ausstreichen auf dem Selektivmedium für Transkonjuganten wurde zusätzlich die Filterabschwemmlösung um den Faktor 20 aufkonzentriert, um auch geringe Transkonjuganten-Konzentrationen erfassen zu können.

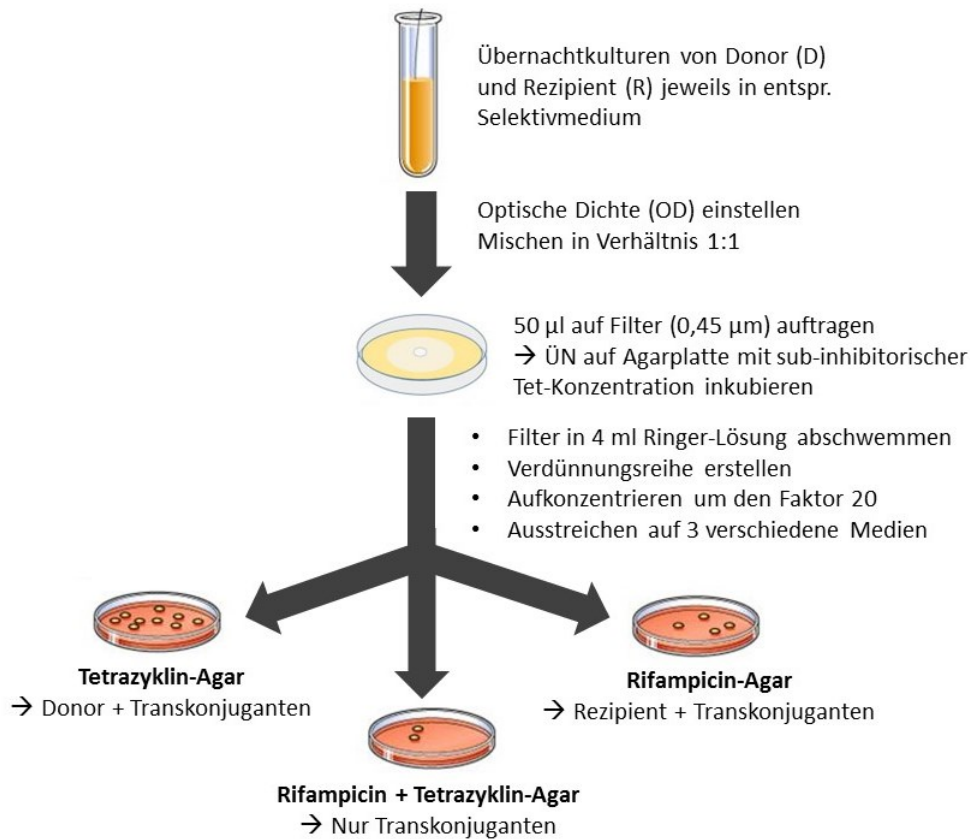


Abbildung 5: Schematischer Ablauf eines Mating-Experimentes am Beispiel der Übertragung einer Tetracyclin-Resistenz auf Rifampicin-resistente Rezipienten.

In einigen Versuchen wurden die Übernachtskulturen vor dem Aufbringen auf den Filter zum Entfernen von Antibiotika-Rückständen zunächst zentrifugiert, in steriler Ringerlösung einmal gewaschen und anschließend in derselben Menge Ringerlösung resuspendiert. Zudem wurde neben den 50 µl Ansätzen zusätzlich 100 µl des Gemisches aus Donor und Rezipienten auf den Filter ausplattiert. Teilweise wurden die Filter auf TSA inkubiert, dem kein Antibiotikum zur Erzeugung eines Selektionsdrucks zugesetzt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Molekularbiologischer Ansatz

3.1.1 PMA-Behandlung zur Unterdrückung unspezifischer Signale

In Abbildung 6 ist ein Vergleich zwischen den Amplifikationsplots zum RT-qPCR-Nachweis der 16S rRNA-Gene aus dem DNA-Extrakt einer Reinkultur von *S. epidermidis* RP62A mit und ohne vorherige PMA-Behandlung des Mastermixes gezeigt. Es erfolgte eine Behandlung des Mastermixes mit verschiedenen PMA-Konzentrationen.

Während in der Negativkontrolle (no template control, NTC) des unbehandelten Mastermixes bei der RT-qPCR-Amplifikation der 16S rRNA-Gene ein Signal nach ca. 28 Zyklen detektiert wurde, wurde dieses in den beiden mit 0,625 μ M und 1,25 μ M PMA behandelten Proben bei einer Gesamtzahl von 35 Zyklen komplett unterdrückt. Während das Amplifikationsplot bei der mit der geringeren PMA-Konzentration behandelten Probe keine starken Abweichungen zur unbehandelten Probe aufwies, zeigte sich ein untypischer Kurvenverlauf für die höhere PMA-Konzentration.

Somit musste für jede Charge des „QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix“ (Qiagen, Hilden) die niedrigste nötige PMA-Konzentration neu ermittelt werden, die das Signal der Negativkontrolle gerade unterdrückte, ohne unspezifische Kurvenverläufe zu produzieren.

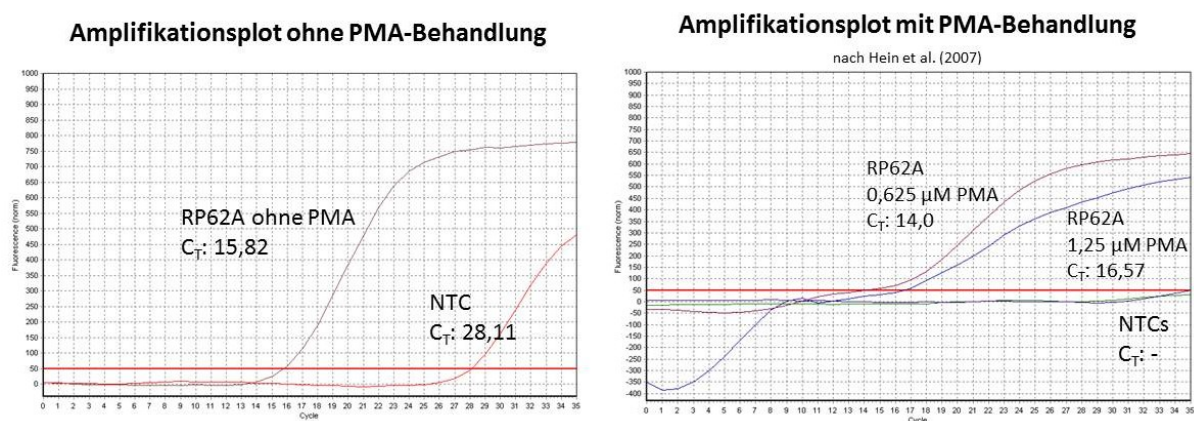


Abbildung 6: Vergleich der Amplifikationsplots der RT-qPCR-Reaktionen zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene ohne (links) und mit (rechts) vorheriger Behandlung des Mastermixes mit Propidiummonoazid (PMA).

3.1.2 Nachweis der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene

In Tabelle 7 ist eine Zusammenfassung der mittels RT-qPCR nachgewiesenen 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene aus den Gesamt-DNA-Extrakten der Tupferproben dargestellt. Die Quantität ergibt sich dabei aus den C_T-Werten. Je höher die Ausgangs-DNA-Menge in der Probe, desto schneller geht die Amplifikation in die exponentielle Phase über, und desto geringer ist folglich der C_T-Wert. Die erhaltenen C_T-Werte für die Amplifikation der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene einer Probenahme, die auch zur Berechnung der Keimzahläquivalente (Abschnitt 3.2.3) herangezogen wurden, sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 7: Mittels RT-qPCR in den Gesamt-DNA-Extrakten der Tupferproben nachgewiesene Gene bzw. Gengruppen. Angegeben sind die Probenahmeorte, an denen Signale detektiert wurden sowie die Reihenfolge des Auftretens der Signale. Die Angaben beziehen sich auf insgesamt drei Probenahmen. ¹⁾ Quantität der Gene gemessen an den C_T-Werten. DNA-Extraktionsprotokoll G +: für Gram-positive Bakterien; G -: für Gram-negative Bakterien.

Gen/Gengruppe	Probenahmeort	Quantität ¹⁾
16S rRNA	alle	Melkbecherablage
		> Auslassstutzen des Sammel tanks (2x) bzw. Ende der Druckleitung (Kunststoffrohr) (1x)
		> Filterrohr inkl. Stofffilter ≈ Anfang der Druckleitung (Edelstahlrohr) ≈ Ende der Druckleitung (Edelstahlrohr)
<i>blaZ</i>	nicht detektiert	/
OXA-1	nicht detektiert	/
OXA-2	nur Melkbecherablage	/
OXA-10	nicht detektiert	/
<i>tetM</i>	alle	Reihenfolge variiert stark je nach Probenahme und Extraktionsprotokoll (G + o. G -)

Tabelle 8: C_T-Werte für die Amplifikation der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene aus den DNA-Extrakten der Tupferabschwemmlösungen, sortiert nach Ort der Probenahme. DNA-Extraktionsprotokoll: G +: für Gram-positive Bakterien, G -: für Gram-negative Bakterien.

Probenahmeort	16S rRNA-Gene		OXA-2-Gene		<i>tetM</i> -Gene	
	G +	G -	G +	G -	G +	G -
Melkbecherablage	18,33	21,51	32,50	34,36	29,67	31,89
Filterrohr inkl. Stofffilter	28,45	32,23	/	/	/	35,31
Ende Druckleitung (Edelstahlrohr)	31,40	34,08	/	/	/	36,15
Ende der Druckleitung (Kunststoffrohr)	21,38	22,06	/	/	26,2	25,36
Auslassstutzen Milchsammeltank	23,79	28,18	/	/	/	35,62

Insgesamt wies die Ablage des Melkgeschirrs bei jeder Probenahme den geringsten C_T-Wert und damit die größte Ausgangsmenge an 16S rRNA-Genen auf. Während, je nach Probenahmezeitpunkt, der Auslassstutzen des Sammeltanks oder das Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung die zweithöchsten Signale aufwiesen, lagen die Signale aller weiteren beprobten Rohrleitungen darunter und untereinander etwa im selben Bereich.

Für die β -Lactamase-Gene bzw. Gengruppen *blaZ*, OXA-1 und OXA-10 wurden in den DNA-Extrakten sämtlicher Probenahmeorte keine Signale detektiert. Im Gegensatz dazu konnten Signale für die OXA-2-Gengruppe ausschließlich in den DNA-Extrakten der Melkbecherablage detektiert werden. *tetM*-Gene wurden dagegen an allen Probenahmeorten nachgewiesen. Die C_T-Werte für die Amplifikation der *tetM*-Gene variierten teilweise stark, abhängig vom Ort der Probenahme und dem verwendeten Extraktionsprotokoll. Auch bei Probenahmen desselben Ortes zu verschiedenen Zeitpunkten konnte es zu Variationen kommen, sodass keine allgemeine Aussage zu der quantitativen Häufigkeit des Auftretens von *tetM*-Genen an den verschiedenen Stellen innerhalb der Melkanlage möglich ist.

In Abbildung 15 im Anhang sind für jede RT-qPCR-Reaktion mit den DNA-Extrakten der jeweiligen Referenzorganismen (Tab. 3) die Amplifikationsplots und das Bestimmtheitsmaß der Standardkurven sowie die Effizienz der Amplifikation dargestellt. Zusätzlich sind die Amplifikationsplots für die OXA-2 und *tetM*-Gene aus den Gesamt-DNA-Extrakten der Tupferproben beispielhaft für einen Probenahmezeitpunkt in Abbildung 16 im Anhang dargestellt.

3.1.3 Berechnung von Keimzahläquivalenten

Vor der Berechnung der Keimzahläquivalente erfolgte eine absolute Quantifizierung der 16S rRNA- und Antibiotikaresistenzgene mittels RT-qPCR, wie unter Abschnitt 2.3.3 beschrieben. In Formel 1.1 ist beispielhaft die Berechnung der Kopienanzahl/ μ l Template im aufgereinigten PCR-Produkt des 16S rRNA-Gens des Referenzorganismus *E. coli* E2 gezeigt:

$$\frac{40,85 \left(\frac{ng}{\mu l} \right) * 10^{-9} \frac{g}{ng} * 6,02 * 10^{23} \frac{mol * Da}{g}}{1500 bp * 660 \frac{Da}{bp * mol}} = 2,5 * 10^{10} \text{ Kopien}/\mu l \text{ (Formel 1.1)}$$

Durch Verdünnen des Templates und Einsatz in der RT-qPCR konnte eine lineare Regression der logarithmisch aufgetragenen Kopienanzahl/μl Template-DNA und dem C_T-Wert erfolgen (Abb. 7). Durch Umformen der Regressionsgeradengleichung und Einsatz des jeweiligen C_T-Wertes ließ sich im Folgenden damit die Konzentration der Template-DNA in den Tupfer-DNA-Extrakten berechnen. Analog wurde zur Erstellung der Standardkurven für die Berechnung der Antibiotikaresistenzgenkopien in den Tupferproben vorgegangen.

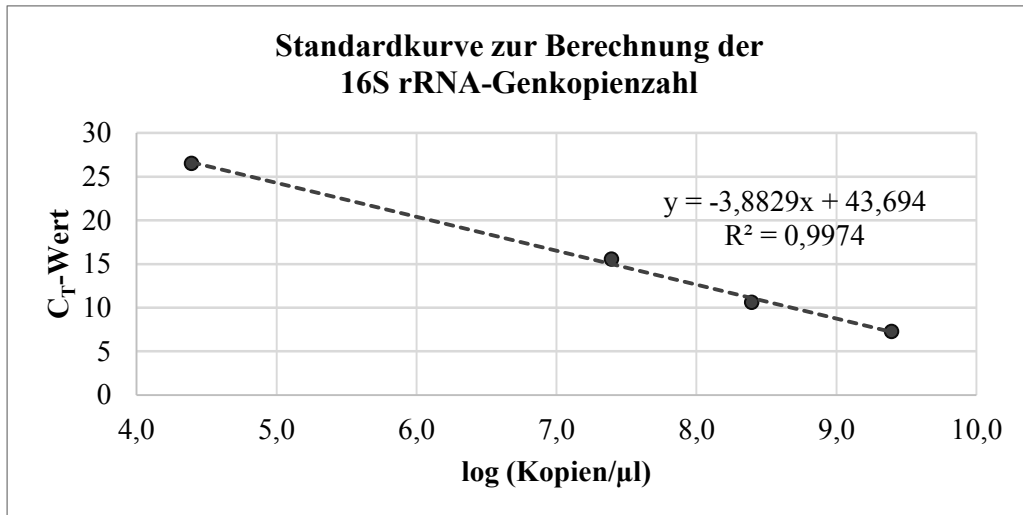


Abbildung 7: Zur Berechnung der Kopienanzahl herangezogene lineare Regression der logarithmierten Kopienanzahl/μl Template-DNA und dem mittels RT-qPCR ermittelten C_T-Wert einer dekadischen Verdünnungsreihe des 16S rRNA-Gens des Referenzorganismus *E. coli* E2.

In Abbildung 8 sind die molekularbiologisch aus den RT-qPCR-Ergebnissen berechneten Keimzähläquivalente den kulturell auf TSA ermittelten Gesamtkeimzahlen (GKZ) und Keimzahlen der Antibiotikaresistenten gegenübergestellt. Da nur OXA-2 und *tetM*-Gene molekularbiologisch nachgewiesen wurden, werden hier nur die kulturell ermittelten Keimzahlen auf Cloxacillin- und Tetracyclin-haltigem TSA dargestellt.

Die mit dem Extraktionsprotokoll für Gram-positive Bakterien erhaltenen DNA-Extrakte lieferten im Fall der 16S-rRNA-Gene stärkere Signale und damit geringere C_T-Werte in der RT-qPCR, als die mit dem Protokoll für Gram-negative Bakterien erhaltenen DNA-Extrakte aus denselben Tupferabschwemmungen (Tab 8). Im Gegensatz dazu wurden Signale für den *tetM*-Nachweis lediglich in den DNA-Extrakten nach Gram-negativen Protokoll für das Filterrohr, das Edelstahlrohr am Ende der Druckleitung und den Auslassstutzen des Milchsammeltanks detektiert. An den Stellen, wo für beide Extraktionsprotokolle Signale auftraten, war der C_T-Wert für den nach Gram-negativem Protokoll gewonnenen DNA-

Extrakt aus der Melkbecherablage geringer als für den nach dem Gram-positiven Protokoll gewonnenen Extrakt (Tab 8).

Entsprechend sind die berechneten Keimzahläquivalente für die GKZ aus dem Gram-positiven DNA-Extraktionsprotokoll in allen Fällen höher, als die aus dem Gram-negativen Extraktionsprotokoll, während dies bei den Tetracyclin-resistenten Keimzahläquivalenten in den meisten Fällen umgekehrt ist (Abb 8).

Die molekularbiologisch ermittelten GKZ-Äquivalente lagen überwiegend oberhalb der kulturell ermittelten GKZ. Besonders ausgeprägt waren die Unterschiede in der kulturell und molekularbiologisch ermittelten GKZ in den Rohrleitungssystemen der Melkanlage. So lag die kulturell ermittelte GKZ im Edelstahlrohr am Ende der Druckleitung unterhalb der Nachweisgrenze, während die molekularbiologisch ermittelten GKZ-Äquivalente zwischen $1,0 \times 10^3$ und $1,0 \times 10^4$ KbE-Äquivalenten/cm², und damit etwa im Bereich des Filterrohrs lagen.

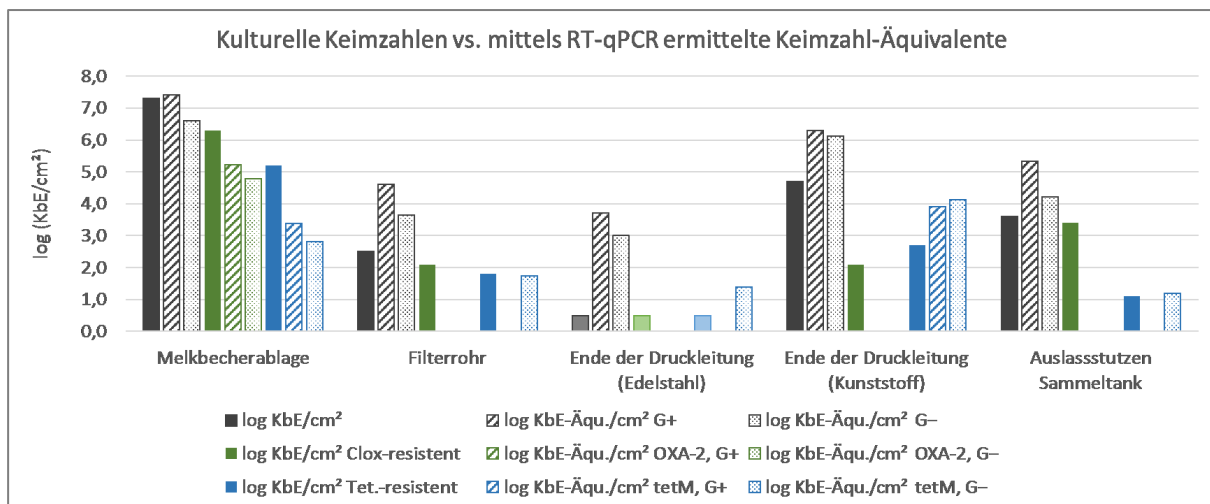


Abbildung 8: Gegenüberstellung der kulturell (durchgehende Füllung) und molekularbiologisch mittels RT-qPCR (Musterfüllung) ermittelten Keimzahlen bzw. Keimzahläquivalente an verschiedenen Probenahmestellen der Melkanlage. Dargestellt sind die Gesamtkeimzahl (GKZ) (anthrazit) sowie die Keimzahlen der Cloxacillin- (grün) und Tetracyclin- (blau) Resistenten. Blasser dargestellte Balken repräsentieren Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens. DNA-Extraktionsprotokoll G +: für Gram-positive Bakterien; G -: für Gram-negative Bakterien.

Die Melkbecherablage wies sowohl kulturell als auch molekularbiologisch die höchste GKZ auf, gefolgt vom Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung, dem Auslassstutzen des Milchsammel-tanks, dem Filterrohr, und dem Edelstahlrohr am Ende der Druckleitung.

Während aus den Ergebnissen der RT-qPCR zum Nachweis der OXA-2-Genngruppe Keimzahläquivalente für Cloxacillin-resistente Bakterien nur für die Melkbecherablage berechnet werden konnten, wurden Cloxacillin-resistente Mikroorganismen kulturell an allen Probenahmeorten nachgewiesen. Auf der Melkbecherablage lag die kulturell ermittelte Keimzahl der Cloxacillin-Resistenten etwa eine log-Stufe über den molekularbiologisch ermittelten Keimzahl-Äquivalenten.

Im Gegensatz dazu lag die kulturell ermittelte Keimzahl der Tetracyclin-Resistenten lediglich auf der Melkbecherablage um etwa zwei log-Stufen höher als die molekularbiologisch ermittelten Keimzahl-Äquivalente. An allen anderen Probenahmeorten waren die kulturell und molekularbiologisch ermittelten Keimzahlen der Tetracyclin-Resistenten etwa gleich hoch (Filterrohr und Auslassstutzen), oder die molekularbiologisch ermittelten Keimzahl-Äquivalente waren um eine log-Stufe höher, wie am Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung. Obwohl auf dem Edelstahlrohr am Ende der Druckleitung kulturell keine Keime nachweisbar waren, wurden an dieser Stelle *tetM*-Gene mittels RT-qPCR detektiert.

3.2 Kultivierungsgestützter Ansatz

3.2.1 Gesamtkeimzahlen und Keimzahlen antibiotikaresistenter Mikroorganismen

In Abbildung 9 sind die kulturell ermittelten Gesamtkeimzahlen (GKZ) und die Keimzahlen antibiotikaresistenter Mikroorganismen auf den verschiedenen Antibiotika-TSA dargestellt.

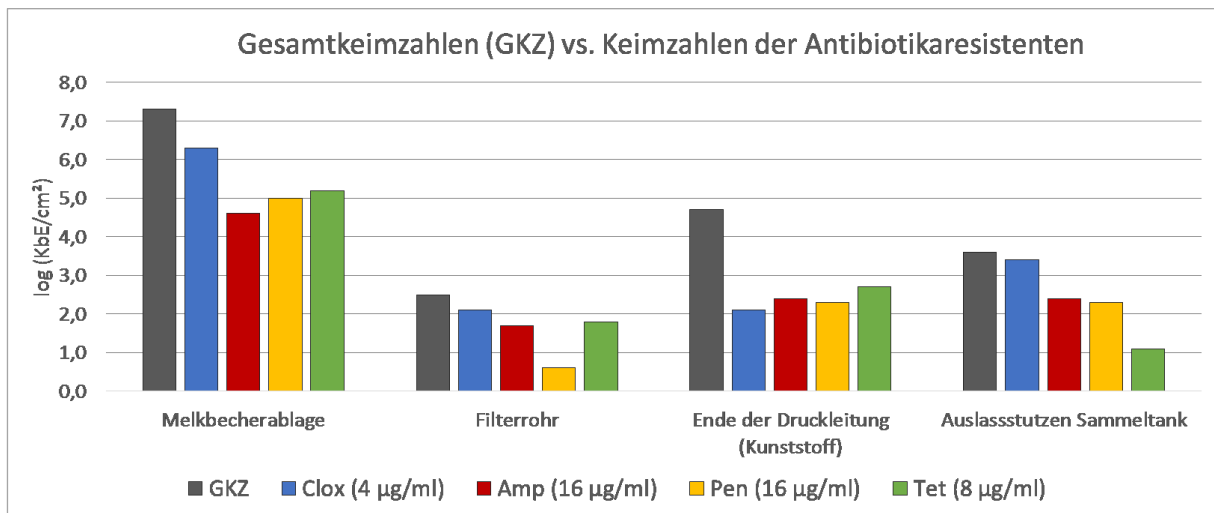


Abbildung 9: Kulturell ermittelte Gesamtkeimzahlen (GKZ) (anthrazit) sowie Keimzahlen resistenter Mikroorganismen gegen die in den angegebenen Konzentrationen eingesetzten Antibiotika Cloxacillin (blau), Ampicillin (rot), Penicillin G (gelb) und Tetracyclin (grün).

Die Melkbecherablage war mit ca. $2,0 \times 10^7$ KbE/cm² die am stärksten besiedelte Stelle innerhalb der Melkanlage, gefolgt vom Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung, dem Auslassstutzen des Milchsammeltanks und dem Filterrohr inkl. Stofffilter hinter dem Milchabscheider. Die GKZ von Letzterem war mit ca. $3,2 \times 10^2$ KbE/cm² um 5 log-Stufen geringer als die GKZ der Melkbecherablage.

Mit Ausnahme des Kunststoffrohrs am Ende der Druckleitung lag an allen Probenahmeorten die Keimzahl der Cloxacillin-resistenten Mikroorganismen etwa in derselben Höhe wie die Gesamtkeimzahl. An der Melkbecherablage und dem Auslassstutzen des Milchsammeltanks war sie zudem um etwa eine log-Stufe höher als die Keimzahlen der Ampicillin- und Penicillin-Resistenten. Ansonsten waren die Keimzahlen der Resistenten gegenüber den drei getesteten β -Lactam-Antibiotika etwa gleich hoch (Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung), oder die Keimzahl der Penicillin-Resistenten war geringer als die der gleich aufliegenden Keimzahlen der Cloxacillin- und Ampicillin-Resistenten (Filterrohr).

Die Keimzahl der Tetracyclin-resistenten Mikroorganismen lag an den meisten beprobten Stellen im selben Bereich wie die der Resistenten gegenüber den β -Lactam-Antibiotika. Eine Ausnahme bildet hier der Auslassstutzen des Milchsammeltanks, wo die Keimzahl der

Tetracyclin-Resistenten um eine bis zwei log-Stufen unterhalb der Keimzahlen der β -Lactam-Antibiotika-Resistenten lag.

Während die Unterschiede zwischen der GKZ und den Keimzahlen aller Antibiotikaresistenten am Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung etwa 2,5 log-Stufen betrugen, waren die Unterschiede an allen anderen Probenahmeorten geringer.

3.2.2 Zusammensetzung der antibiotikaresistenten Biofilmgemeinschaft

In Abbildung 10 ist ein phylogenetischer Stammbaum, basierend auf den 16S rRNA Gensequenzen der nachgewiesenen Bakteriengattungen, dargestellt. Die Bereiche der vier detektierten Phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Actinobacteria* sind durch Klammern sowie farblich markiert. Gattungen, die von mehr als einem Isolat repräsentiert werden, sind durch Dreiecke dargestellt, deren Breite proportional zur Anzahl der enthaltenen Isolate ist. Wenn die Gattung mehr als eine Spezies enthielt, ist die Anzahl der vertretenen Spezies in Klammern hinter dem Gattungsnamen aufgeführt. Die mittels Farbschema dargestellten Resistenzen entsprechen dem Isolierungsmedium, von dem die Isolate stammen.

Bei den Gram-negativen Phyla *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* spielten vor allem die Gattungen *Acinetobacter* und *Chryseobacterium* eine Rolle. Beide waren mit hohen Anzahlen an Isolaten sowie großen Speziesvielfalten vertreten. Zudem wurden Isolate von TSA-Platten mit allen vier getesteten Antibiotika gewonnen. Das Phylum *Proteobacteria* zeichnet sich grundsätzlich durch eine hohe Spezies- und Gattungsvielfalt aus.

Das Gram-positive Phylum *Firmicutes* enthält eine große Vielfalt der den Milchsäurebakterien zuzuordnenden Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *Enterococcus*. Zusätzlich wurde die Gattung *Staphylococcus* detektiert. Alle diesem Phylum zugeordneten Isolate stammten entweder von Cloxacillin- oder Tetracyclin-enthaltendem TSA.

Das ebenfalls Gram-positive Phylum *Actinobacteria* wies eine hohe Spezies- und die zweithöchste Gattungsvielfalt auf. Besonders die Gattungen *Kocuria* und *Microbacterium* waren mit mehreren Isolaten aus verschiedenen Spezies vertreten.

Passend zu den hohen Keimzahlen Cloxacillin-resistenter Mikroorganismen wurden die meisten Isolate von Cloxacillin-haltigem TSA gewonnen.

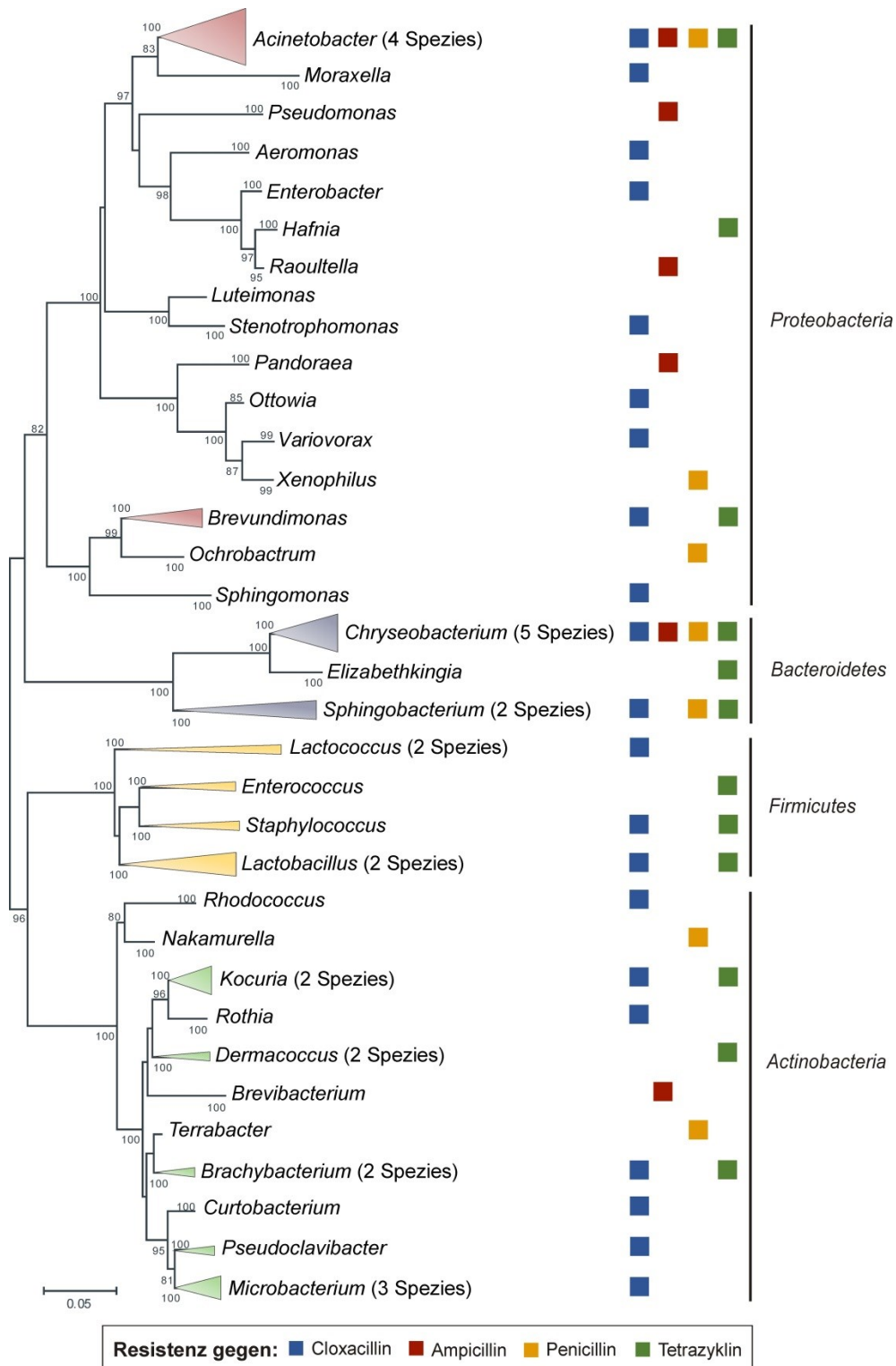


Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf den 16S rRNA Gensequenzen der Isolate. Dargestellt sind die Verwandtschaftsverhältnisse auf Gattungsebene. Dreiecke repräsentieren mehr als ein Isolat pro Gattung, ihre Höhe ist proportional zur Anzahl der Isolate. Die Anzahl verschiedener Spezies ist in Klammern hinter jeder Gattung angegeben. Die im Isolierungsmedium enthaltenen Antibiotika sind farblich hinter den Gattungsbezeichnungen gekennzeichnet.

3.2.3 Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in den Isolaten

In Tabelle 9 sind die Bakteriengattungen der Isolate aufgeführt, in deren Plasmid-DNA-Extrakten Resistenzgene mittels RT-qPCR nachgewiesen werden konnten. Alle sequenzierten Genabschnitte der Isolate stimmten untereinander zu 100 % überein. In den Tabellen 13 und 14 im Anhang sind die Übereinstimmungen der sequenzierten OXA-2 und *tetM*-Gene der Isolate mit in der Datenbank BLAST hinterlegten Gensequenzen dargestellt.

Tabelle 9: In den Plasmid-DNA-Extrakten der Isolate mittels RT-qPCR nachgewiesene Gene/Gengruppen mit Auflistung der Gattungen, in denen die Gene detektiert wurden.

Gen/ Gengruppe	Gattung
<i>blaZ</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingobacterium</i>
OXA-2	<i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Raoultella</i>
<i>tetM</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Staphylococcus</i>

Während die *blaZ*- und *tetM*-Gene sowohl in Gram-positiven als auch Gram-negativen Gattungen detektiert wurden, wurden in dieser Studie β -Lactamase-Gene der OXA-2 Gengruppe nur in Gram-negativen Bakterien nachgewiesen. In der Gattung *Acinetobacter* wurden alle drei Resistenzgene bzw. –gruppen detektiert.

Der Abgleich der Gensequenzen der Isolate mit der Datenbank zeigte eine hohe Übereinstimmung mit bereits hinterlegten Gensequenzen (Tab 13, 14). So wies die 120 bp lange *tetM*-Gensequenz der Isolate eine hohe Übereinstimmung (> 99 %) mit Gensequenzen verschiedener *Staphylococcus*- und *Enterococcus*-Spezies auf. Zudem zeigte sich eine 100 %ige Übereinstimmung der 409 bp langen OXA-2-Gensequenz der Isolate mit den teilweise laut Datenbankeintrag auf Integrons, Transposons und Plasmiden lokalisierten Gensequenzen von überwiegend Gram-negativen Bakterien der Gattungen *Acinetobacter*, *Aeromonas*, und *Pseudomonas*.

3.2.4 Zusammenhang zwischen Zelldichte und Auftreten von Antibiotikaresistenzen

Abbildung 11 zeigt den Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der relativen Häufigkeit des Auftretens von Antibiotikaresistenzen am Beispiel der Tetracyclinresistenz. Dabei sind die Daten aus dem molekularbiologischen und kultivierungsgestützten Ansatz für die jeweiligen Probenahmeorte jeweils farblich voneinander abgehoben.

Auf der Primärachse ist das Verhältnis der kulturell ermittelten log-Keimzahlen der Tetracyclin-Resistenten zur GKZ dargestellt. Auf der Sekundärachse ist die relative Häufigkeit des Auftretens einer Tetracyclin-Resistenz für das molekularbiologische Verfahren als Verhältnis der C_T -Werte zwischen dem RT-qPCR-Nachweis der *tetM*- zu den 16S rRNA-Genen dargestellt. Da ein geringer Wert ein hohes relatives Vorkommen von *tetM*-Genen im Verhältnis zu 16S rRNA-Genen aufzeigt, wurde die Skala invertiert, um eine direkte Vergleichbarkeit des molekularbiologischen mit dem kultivierungsgestützten Ansatz zu ermöglichen.

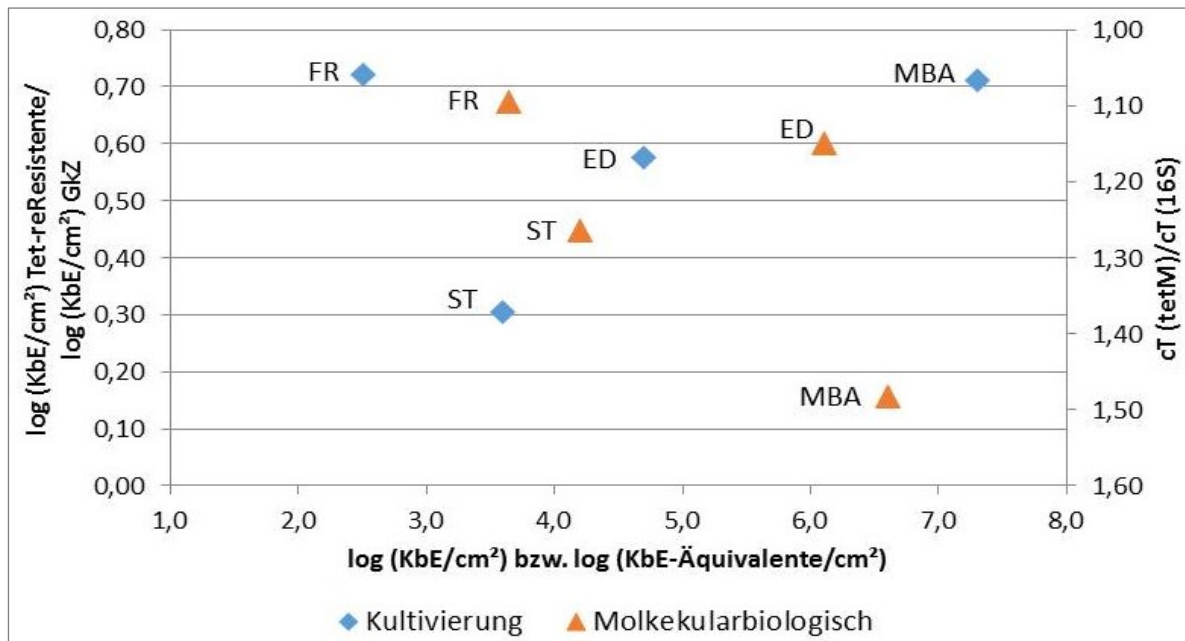


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Zelldichte und Häufigkeit des Auftretens von Antibiotikaresistenzen am Beispiel der Tetracyclin-Resistenz. Auf der Primärachse (links) sind die Datenpunkte für das kultivierungsgestützte Verfahren (blau), auf der Sekundärachse (rechts) die Datenpunkte für das molekularbiologische Verfahren (orange) aufgetragen. Die Abkürzungen für die Probenahmeorte neben den Datenpunkten sind: MBA, Melkbecherablage; FR, Filterrohr; ED, Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung; ST, Auslassstutzen des Milchsammeltanks.

Betrachtet man die Datenpunkte für den Auslassstutzen des Milchsammeltanks (ST) und des Kunststoffrohrs am Ende der Druckleitung (ED) beider Ansätze, sowie den Datenpunkt für die Melkbecherablage (MBA) des kultivierungsgestützten Verfahrens, ergibt sich eine ansteigende Tendenz für die Häufigkeit des Auftretens von Tetracyclin-Resistenzen mit steigender Gesamtkeimzahl. Jedoch sind auch einige Ausreißer zu verzeichnen. Trotz relativ geringer Gesamtkeimzahlen wurden sowohl im molekularbiologischen als auch im kultivierungsgestützten Verfahren im Filterrohr (FR) verhältnismäßig viele Tetracyclinresistenzen nachgewiesen. Im DNA-Extrakt der Melkbecherablage wurden mittels

RT-qPCR im molekularbiologischen Verfahren dagegen im Vergleich zur hohen GKZ verhältnismäßig wenig *tetM*-Gene nachgewiesen. Somit stellt dieser Punkt einen Ausreißer in die entgegengesetzte Richtung dar.

Insgesamt lässt die Grafik keine eindeutige Aussage zu, ob mit steigender Gesamtkeimzahl der Anteil der antibiotikaresistenten Mikroorganismen zunimmt.

3.3 Mating-Experimente

Vor der Durchführung von Mating-Experimenten wurden Kreuzresistenz- und MHK-Bestimmungen, Plasmid-Extraktionen und Clumping-Assays durchgeführt, um eine Vorauswahl von geeigneten Mating-Partnern zu treffen.

3.3.1 Feststellung des Resistenzstatus der Isolate

In Tabelle 11 sind die ermittelten MHK-Werte für ausgewählte antibiotikaresistente Isolate aus der Melkanlage sowie für weitere potenzielle Donor- oder Rezipientenstämme dargestellt. Stellte sich ein Stamm durch Ausstreichen auf verschiedenen Antibiotika-TSA oder durch seine MHK gegen ein getestetes Antibiotikum bereits als geeigneter Mating-Partner heraus, wurden keine MHK-Bestimmungen für weitere Antibiotika durchgeführt. Tabelle 12 im Anhang zeigt das Wachstumsverhalten ausgewählter Isolate auf ihrem ursprünglichen Isolationsmedium sowie auf mit den drei weiteren untersuchten Antibiotika versetztem TSA.

Die meisten aus der Melkanlage stammenden Isolate zeichneten sich durch einen hohen Resistenzstatus aus, welcher durch hohe MHKs gegenüber allen vier getesteten Antibiotika gekennzeichnet ist. Zudem lagen häufig Resistenzen gegenüber mehreren Antibiotika vor, was für das Vorhandensein von Kreuzresistenzen spricht. Hohe MHK-Werte für alle getesteten Antibiotika lagen bei verschiedenen Spezies der Gattungen *Acinetobacter* und *Chryseobacterium*, aber auch bei Isolaten der Gattungen *Kocuria* und *Sphingobacterium* vor.

Auch als potenzielle Rezipienten untersuchte Stämme wie *E. coli* DSM 498 und JM109 sowie *Pseudomonas putida* DSM 6125 zeichneten sich durch hohe MHK-Werte für die getesteten Antibiotika aus. Dennoch kamen die Stämme *E. coli* MT102RN und *Salmonella* Enteritidis Fa8065 von Dolejská *et al.* (2011) sowie *Enterococcus faecium* E2/14 und *Brachybacterium nesterenkovi* M255 aufgrund von niedrigen MHK-Werten für andere, nicht in der Anlage verwendete Antibiotika als Rezipienten in Frage.

Für diese Stämme bestätigte sich auch die in Bouillon ermittelte MHK durch Ausstrich auf festen Nährmedien, die mit der entsprechenden Antibiotikakonzentration versetzt waren. Im

Gegensatz dazu konnte auf mit 10 µg/ml Tetracyclin versetztem TSA Wachstum von *Stenotrophomonas* sp. BG28 festgestellt werden. Somit stimmte die MHK auf festem und flüssigem Medium nicht überein.

Tabelle 10: Minimale Hemmkonzentrationen (MHKs) für antibiotikaresistente Isolate aus der Melkanlage und weitere Stämme, die als Mating-Partner in Frage kamen (*). n. d.: nicht durchgeführt.

Stamm	MHK (µg/ml)			
	Cloxacillin	Ampicillin	Penicillin	Tetracyclin
<i>Acinetobacter guillouiae</i> A1-ST31	> 512 ¹⁾	256	128	> 512 ¹⁾
<i>Acinetobacter guillouiae</i> AO3A2	n. d. ²⁾	128	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾
<i>Acinetobacter albensis</i> A5-ST23	> 512 ¹⁾	> 512 ¹⁾	> 512 ¹⁾	> 512 ¹⁾
<i>Brachybacterium faecium</i> BG14	64	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾
<i>Brachybacterium nesterenkovi</i> M255*	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	0,015
<i>Chryseobacterium bovis</i> A4-ST20	256	256	128	> 512 ¹⁾
<i>Chryseobacterium lactis</i> AO5P3	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	512	n. d. ²⁾
<i>Enterococcus faecalis</i> AO2T2	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	32
<i>Enterococcus faecium</i> E2/14*	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	0,03
<i>Escherichia coli</i> DSM 498 (K12)*	> 512 ¹⁾	8	64	> 512 ¹⁾
<i>Escherichia coli</i> JM109*	> 128 ¹⁾	16	64-128 ³⁾	64
<i>Escherichia coli</i> MT102RN*	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	2
<i>Flavobacterium oceanosedimentum</i> AO3C3	8	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾
<i>Kocuria salsicia</i> A4-ST27	> 512 ¹⁾	> 512 ¹⁾	> 512 ¹⁾	256
<i>Pseudomonas putida</i> DSM 6125*	> 128 ¹⁾	64	> 128 ¹⁾	> 128 ³⁾
<i>Raoultella terrigena</i> JZ-RK-65*	n. d. ²⁾	32	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾
<i>Salmonella</i> Enteritidis Fa8065*	n. d. ²⁾	16	n. d. ²⁾	1
<i>Serratia marcescens</i> F1C1*	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	80
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> BG35	n. d. ²⁾	n. d. ²⁾	64	n. d. ²⁾
<i>Sphingobacterium hotansense</i> A1-ST5	64-128 ³⁾	64	64-128 ³⁾	> 512 ¹⁾
<i>Stenotrophomonas</i> sp. BG28	512	64	n. d. ²⁾	10

¹⁾ Wachstum wird durch die größte eingesetzte Antibiotikakonzentration nicht gehemmt

²⁾ Nicht durchgeführt, wenn sich der Stamm für ein anderes Antibiotikum schon als geeigneter Mating-Partner herausstellte

³⁾ Deutliche Wachstumshemmung schon bei der niedrigeren angegebenen Konzentration, vollständige Verhinderung erst bei der höheren Konzentration

3.3.2 Plasmid-Nachweis in Isolaten

Als Schnelltest zum Nachweis von Plasmiden, wurde mit kommerziell erhältlichen Kits Plasmid-DNA aus ausgewählten antibiotikaresistenten Isolaten extrahiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse für die Plasmid-Extraktion aus den Positivkontrollen mit jeweils einem kleinen high-copy (A) und einem großen low-copy

(B) Plasmid enthaltenden Stamm sowie mit verschiedenen Extraktionsprotokollen aus den zwei Isolaten *Aeromonas media* AO5C3 und *Enterococcus faecalis* AO2T2 (C).

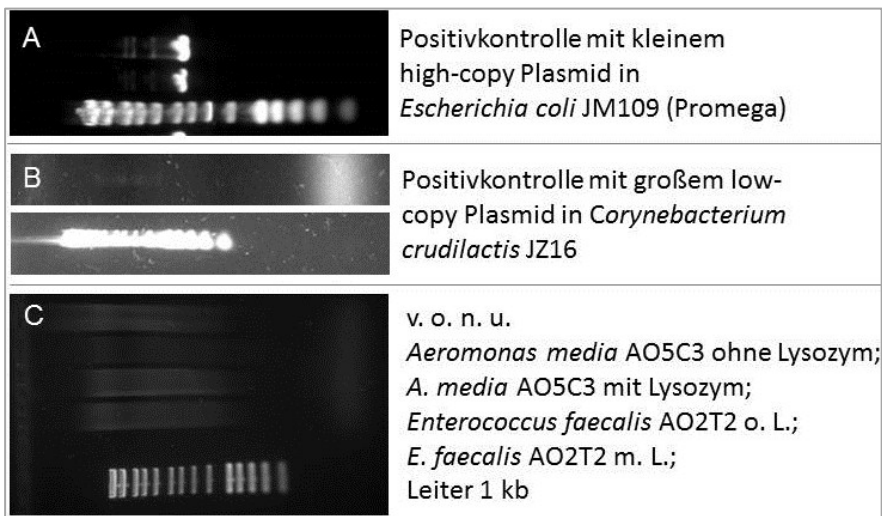


Abbildung 12: Plasmid-DNA-Extrakte der Positivkontrollen *E. coli* JM109 (A), *C. crudilactis* JZ16 (B), und von den antibiotikaresistenten Isolaten *A. media* AO5C3 und *E. faecalis* AO2T2 mit und ohne Lysozymbehandlung auf Agarosegel (1 %). Als Längenstandard diente in allen Fällen die HyperLadder 1 kb von Bioline (Luckenwalde).

Während man auf dem Agarosegel mit dem high-copy Plasmid aus *E. coli* JM109 eine deutlich sichtbare sowie drei weitere schwache Banden erkennen kann, welche die verschiedenen Konformationen des Plasmides darstellen, waren die entsprechenden Banden für das low-copy Plasmid aus *C. crudilactis* JZ16 nur bei starker Belichtung des Gels erkennbar. In allen Plasmid-DNA-Extrakten aus verschiedenen Isolaten, repräsentiert durch Abb. 9C, waren keine deutlich distinkten Banden auf dem Agarosegel erkennbar. Trotzdem wurden unter Einsatz der entsprechenden Plasmid-DNA-Extrakte der Isolate als Template in der RT-qPCR Antibiotikaresistenzgene detektiert (Abschnitt 3.2.3).

3.3.3 Erzeugung von Rifampicin-Resistenzen

Falls potenzielle Donor- und Rezipientenstämme nicht oder unzureichend anhand ihrer Kolonimorphologie zu unterscheiden waren, wurde ein weiteres Kriterium benötigt, um potenzielle Transkonjuganten auf dem der zu übertragenden Resistenz entsprechenden Antibiotika-Agar von Donor-Kolonien zu unterscheiden.

Hierfür wurden potenzielle Rezipientenstämme in sukzessive gesteigerten Rifampicin-Konzentrationen inkubiert, um eine entsprechende Resistenz durch Punktmutation zu erzeugen. Während dieses Verfahren bei *E. faecium* E2/14 zu einer Erhöhung der Rifampicin-MHK von 0,01 µg/ml auf über 512 µg/ml führte, gelang die Resistenzерzeugung in dem

weiteren potenziellen Rezipientenstamm *Brachybacterium nesterenkovi* M255 nicht. Die Rifampicin-MHKs für verschiedene Donorstämme lagen in den meisten Fällen unterhalb von 1 µg/ml. So lag die MHK für den Donorstamm *E. faecalis* AO2T2 bei 0,01 µg/ml.

3.3.4 Clumping-Assays mit Enterokokken

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse des Clumping-Assays mit dem Tetracyclin-resistenten Isolat *Enterococcus faecalis* AO2T2 vom Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung und dem aus Speiseeis isolierten Stamm *Enterococcus faecium* E2/14 gezeigt.

Wie in Abb. 13A gezeigt, fanden schwache Verklumpungsreaktionen der *E. faecalis*-Zellen schon bei Zugabe von sterilem TSB statt. Die Zugabe des sterilfiltrierten eigenen Kulturüberstandes sowie des sterilfiltrierten Kulturüberstandes von *E. faecium* E2/14 riefen jeweils starke Verklumpungsreaktionen der *E. faecalis*-Zellen hervor.

Weder durch die Zugabe von TSB, noch von einem der beiden Kulturüberstände konnte dagegen in der *E. faecium* E2/14-Kultur ein Verklumpen der Zellen ausgelöst werden. Nach Conwell *et al.* (2017) handelt es sich demnach bei *E. faecalis* AO2T2 um einen potenziellen Donor, bei *E. faecium* E2/14 um einen potenzieller Rezipienten für Mating-Experimente. Weitere antibiotikaresistente *Enterococcus*-Isolate reagierten nicht mit Verklumpen auf die Zugabe von sterilfiltrierten Kulturüberständen und eigneten sich somit nicht als Donatoren.

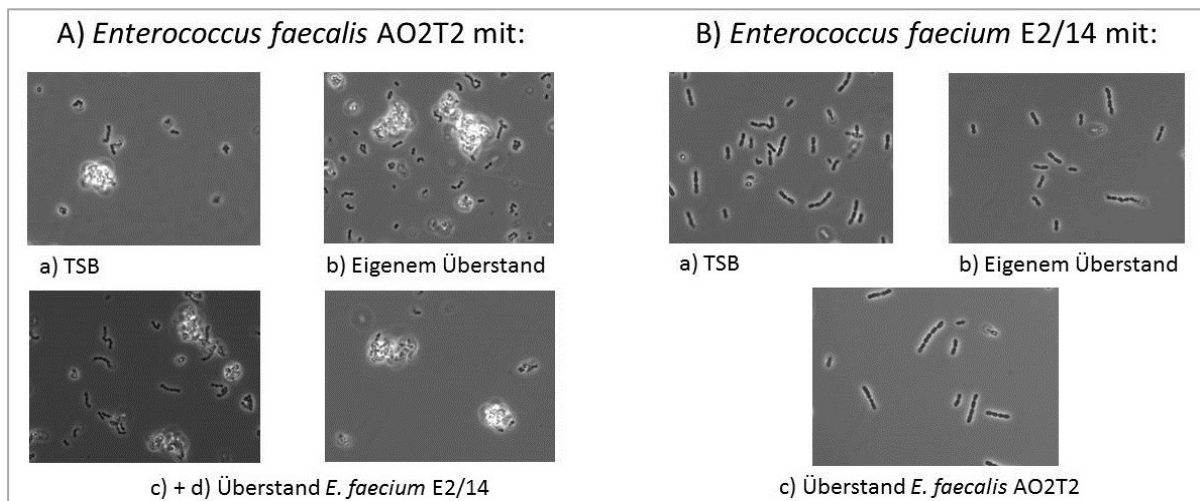


Abbildung 13: Ergebnis des Clumping-Assays nach Conwell *et al.* (2017) mit dem Tetracyclin-resistenten Isolat *E. faecalis* AO2T2 (A) und dem Speiseeisisolat *E. faecium* E2/14 (B).

Aufgrund der Ergebnisse des Clumping-Assays wurden *E. faecalis* AO2T2 und *E. faecium* E2/14 als Mating-Partner zur Übertragung einer Tetracyclin-Resistenz ausgewählt. Weil die beiden *Enterococcus*-Stämme anhand ihrer Koloniemorphologie nicht unterscheidbar waren,

wurde ein als Unterscheidungskriterium die im Rezipienten *E. faecium* E2/14 erzeugte Rifampicin-Resistenz verwendet.

3.3.5 Mating-Experimente mit Enterokokken

Beim ersten durchgeführten Mating-Experiment zur Übertragung einer Tetracyclin-Resistenz von *E. faecalis* AO2T2 (Donor) auf *E. faecium* E2/14 (Rezipient) (Schema siehe Abb. 5) wurde Wachstum auf dem mit Rifampicin und Tetracyclin versetzten Doppelselektivagar festgestellt. Nachdem einige Kolonien vereinzelt wurden, erfolgte die Identifizierung auf Speziesebene über die 16S rRNA-Gensequenzierung (Abschnitt 2.4.4). Hierbei stellte sich heraus, dass es bei den gewachsenen Kolonien um *E. faecalis* und damit um den Donor handelte.

Als zweites Kriterium für die Unterscheidung von Transkonjuganten wurde daraufhin das Vorhandensein der β -Galactosidase überprüft. Dieses Enzym, welches nur der Rezipient *E. faecium* besitzt, spaltet das chromogene Substrat X-Gal, wodurch eine Blaufärbung der Kolonien entsteht. Da es zu keiner direkten Farbreaktion auf dem mit Rifampicin und Tetracyclin versetzten Doppelselektivagar kam, wurden dort gewachsene Kolonien abgeimpft und auf X-Gal-haltiges Medium überführt.

Wie im Ablaufschema des Mating-Experiments in Abbildung 14 zu sehen, stellte sich durch die 16S rRNA-Gensequenzierung der blau gefärbten Kolonien heraus, dass es sich weiterhin um die Donor-Spezies *E. faecalis* handelte.

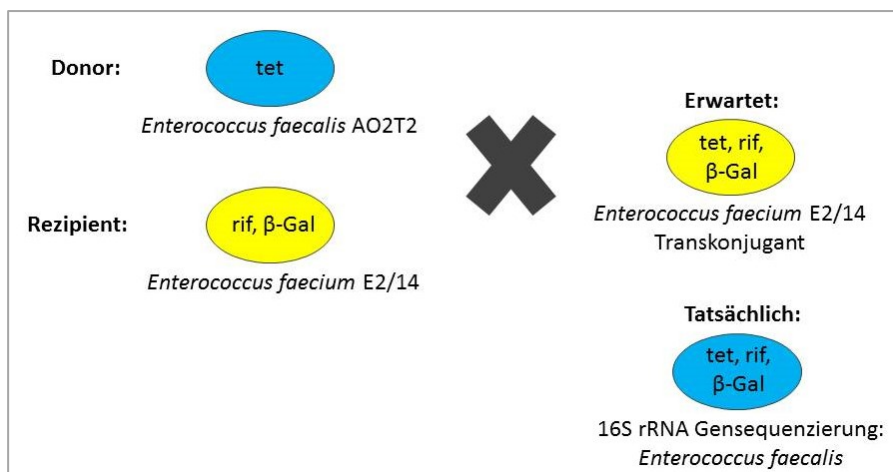


Abbildung 14: Ablauf des Mating-Experiments zur Übertragung einer Tetracyclin-Resistenz von *E. faecalis* AO2T2 (blau) auf *E. faecium* E2/14 (gelb). tet, Tetracyclin-Resistenz; rif, Rifampicin-Resistenz; β -Gal, Enzym β -Galactosidase.

3.3.6 Mating-Experimente mit weiteren Stämmen

In Tabelle 11 sind beispielhaft zwei durchgeführte Mating-Experimente mit ihren Ergebnissen aufgeführt. In beiden Fällen zeigte sich ein Wachstum auf dem Selektivagar für Transkonjuganten. Eine Verifizierung über die 16S rRNA-Gensequenzierung der gewachsenen Kolonien zeigte aber im Fall des Matings zwischen *S. marcescens* F1C1 und *E. coli* MT102RN, dass es sich um die Donorspezies handelte.

Beim Mating-Experiment zur Übertragung einer Ampicillin-Resistenz des Donors *Raoultella terrigena* JZ-RK-65 auf den Rezipienten *Salmonella* Enteritidis Fa8065 zeigte sich ein rasenartiges Wachstum auf der um den Faktor 20 aufkonzentrierten Abschwemmlösung des Filters, auf dem das Mating stattgefunden hatte. Auf dem Ausstrich der ursprünglichen Abschwemmlösung war dagegen kein Wachstum auf dem Dreifachselektivagar feststellbar. Nach Vereinzeln von Kolonien aus dem Rasen zeigte die Sequenzierung, dass es sich tatsächlich um die Rezipientenspezies *Salmonella enterica* handelte. Das erfolgreich verlaufene Mating ließ sich allerdings trotz mehrfacher Wiederholungen nicht reproduzieren.

Bei den meisten durchgeführten Mating-Experimenten zeigte sich kein Wachstum auf dem Selektivagar für Transkonjuganten (Daten nicht gezeigt). Anfängliche Mating-Experimente, bei denen unterschiedliche Koloniemorphologien als Unterscheidungsmerkmal zwischen Donor und Rezipienten bzw. Transkonjuganten heran gezogen wurden, brachten verschiedene Schwierigkeiten mit sich. Obwohl teilweise optisch unterschiedliche Kolonietypen auf dem entsprechenden Selektivmedium beobachtet wurden, zeigte ein erneuter Ausstrich oder die Identifizierung, dass es sich um verschiedene Wachstumsstadien des Donors handelte. Zusätzlich kam es auf Rifampicin-haltigen Selektivmedien für Transkonjuganten mehrfach zu Wachstum, woraufhin die vereinzelt Kolonien jedoch als Donatoren identifiziert wurden.

Tabelle 11: Ergebnisse der Mating-Experimente zur Übertragung verschiedener Antibiotikaresistenzen. Tet, Tetracyclin; Amp, Ampicillin; Rif, Rifampicin; Nal, Nalidixinsäure; NA, Natriumazid. 10¹, um den Faktor 20 aufkonzentrierte Probe; 10⁰ ursprüngliche Probe.

Donor	Rezipient	Zu übertragende Resistenz	Selektionsmarker Transkonjuganten	Ergebnis des Matings	Identifizierung ¹⁾
<i>Serratia marcescens</i> F1C1	<i>Escherichia coli</i> MT102RN	Tet	Rif, Nal	Einzelkolonie auf Selektivagar	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Raoultella terrigena</i> JZ-RK-65	<i>Salmonella</i> Enteritidis Fa8065	Amp	Rif, NA	Rasen auf 10 ¹ , kein Wachstum auf 10 ⁰	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>

¹⁾ Identifizierung über 16S rRNA-Gensequenzierung

4 Diskussion

4.1 Besiedelungsdichte an verschiedenen Stellen innerhalb der Melkanlage

Insgesamt gab es große Unterschiede in den Gesamtkeimzahlen der verschiedenen Probenahmeorte innerhalb der Melkanlage. Die mittels RT-qPCR ermittelten Gesamtkeimzahl-Äquivalente lagen an allen Probenahmeorten oberhalb der kulturell ermittelten. Gründe hierfür sind die Diskriminierung von auf TSA nicht vermehrfähigen Mikroorganismen im kulturellen Verfahren sowie die zusätzliche Erfassung von toten und ruhenden Zellen im molekularbiologischen Verfahren (s. Abschnitt 4.4).

Die Melkbecherablagen waren bei allen drei Probenahmen mit Gesamtkeimzahlen von ca. 10^7 KbE/cm² die Stellen mit der höchsten Besiedelungsdichte in der gesamten Melkanlage. Der Hauptgrund hierfür liegt höchstwahrscheinlich in der mangelhaften Reinigung dieser Stellen, da sie nicht vom CIP-Verfahren zur Säure- und Laugenreinigung der Melkanlage erfasst werden. Obwohl die Melkbecherablagen genau genommen nicht mit zur Melkanlage zählen, da sie keinem direkten Milchdurchfluss unterliegen, wurden sie aufgrund des engen Kontaktes zum Kuheuter und den Melkbechern, und damit als potenzielle Überträger von Mastitiserregern innerhalb der Herde, trotzdem in die Untersuchung mit einbezogen. Bei allen Probenahmen waren deutliche Reste von Fäzes, oder weiteren Staub-/Schmutzpartikeln, mit bloßem Auge auf den Melkbecherablagen zu erkennen. Der Grund hierfür ist, dass während der Reinigung des gesamten Melkstandes mit dem Hochdruckreiniger nach dem Melken die Melkbecherablagen vom dort abgelegten Melkgeschirr abgedeckt und damit nicht erreichbar sind. Zusätzlich sind die Voraussetzungen für den Eintrag und die Vermehrung von Mikroorganismen dort optimal. Durch den engen Kontakt zu den Milchkühen und deren Eutern während des Melkvorganges kann es nicht nur zur Oberflächenkonditionierung mit Milchbestandteilen kommen, sondern auch zum Eintrag von Mastitiserregern oder Kommensalen der Eutermikrobiota. Da die Melkbecher nach dem Melkvorgang gereinigt werden, wird durch Auflegen der noch nassen Melkbecher auf die Ablagen Flüssigkeit eingetragen. Diese sammelt sich dort an, da kein Ablauf für Flüssigkeit in den Ablagen vorgesehen ist. In dem so entstehenden Milieu können sich Mikroorganismen stark vermehren. Durch die mangelhafte Reinigung ist es denkbar, dass an dieser Stelle bereits ältere, reife Biofilme persistieren können.

Da die Melkbecher sowohl in engem Kontakt zu ihren Ablagen, als auch während des Melkvorgangs zum Kuheuter stehen, wäre dort eine ähnlich hohe Besiedelungsdichte zu erwarten wie auf ihren Ablagen. Hier wurden allerdings in den meisten Probenahmen nur sehr geringe Keimzahlen bzw. Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze detektiert. Dies kann

zum einen daran liegen, dass die Melkbecher nach jedem Melken von Reinigungsflüssigkeit durchspült werden und somit weniger stark adhärierende Mikroorganismen mit dem Flüssigkeitsstrom ausgetragen werden, bevor es zur Biofilmbildung kommt. Zum anderen findet ein häufigerer Austausch der Zitzengummis statt, während andere Teile der Melkanlage nicht so häufig ersetzt werden. Ein weiterer Grund könnten Schwierigkeiten bei der Probenahme sein. Durch Einführen des Tupfers in den relativ engen Melkbecher konnte die Fläche ggf. nicht mit so großer Kraft abgerieben werden, wie dies an anderen Stellen der Melkanlage möglich war. Somit hätten stark adhärierende Biofilme nicht effizient entfernt werden können.

Die Rohrleitungen in der Melkanlage wiesen insgesamt, mit Ausnahme des Kunststoffrohrs am Ende der Druckleitung, eher geringe Besiedlungsdichten im Bereich 10^2 - 10^3 KbE/cm² auf. Als Gründe sind, neben einer effektiven Reinigung und Desinfektion durch das angewendete CIP-Verfahren, die vergleichsweise hohen Strömungsgeschwindigkeiten in den Rohrleitungen zu nennen. Die Strömungsgeschwindigkeit von Flüssigkeiten kann durch die Ausübung von Scherkräften starken Einfluss auf die Anhaftung von Mikroorganismen und damit auf die Biofilmzusammensetzung und -architektur haben. So entstehen bei hohen Scherraten dünnere, dichter gepackte Biofilme (Kwok *et al.*, 1998). Dies erschwert womöglich auch eine Erfassung über eine Tupferprobenahme, sodass ggf. die tatsächlichen Keimzahlen in den Rohrleitungen unterschätzt wurden.

Insgesamt waren in der beprobten Melkanlage, mit Ausnahme des Rohmilchsammeltanks, die Edelstahloberflächen weniger stark besiedelt als die Kunststoffoberflächen (z. B. Melkbecherablage). Dies fällt besonders beim Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung auf, wo die kulturell ermittelten Gesamtkeimzahlen zwischen 10^3 - 10^5 KbE/cm² lagen. Dort wurden die Tupferabstriche direkt an der Verbindung zwischen dem Edelstahlrohr und dem Kunststoffrohr am Ende der Druckleitung genommen. Diese waren ohne Verbindungsstück direkt aufeinander geschoben. An dieser Verbindungsstelle kann es zur vermehrten Ablagerung von Milchbestandteilen kommen. Diese Oberflächenkonditionierung erleichtert die Anlagerung von Mikroorganismen und die darauffolgende Biofilmbildung. Eine verstärkte Materialabnutzung, zu der es eher bei Kunststoff- als bei Edelstahlteilen kommt, kann durch die entstehenden Oberflächenrauigkeiten zusätzlich die Reinigung und Desinfektion erschweren (Song *et al.*, 2015).

Obwohl es sich beim Auslassstutzen des Milchsammeltanks ebenfalls um eine Edelstahloberfläche handelt, wurden hier hohe Gesamtkeimzahlen im Bereich zwischen 10^4 - 10^6 KbE/cm² nachgewiesen. Ein Grund ist, dass der Auslassstutzen nicht nach jedem Melkvorgang durch die CIP-Reinigung der Melkanlage erfasst wird. Stattdessen wird er,

zusammen mit dem Rohmilchsammeltank, alle drei Tage nach der Abholung der Milch durch die Molkerei mit Hilfe eines eigenen CIP-Verfahrens gereinigt. In der Zwischenzeit kommt es vereinzelt zur Milchprobenahme durch Mitarbeiter des Versuchsguts, wobei die Milchreste durch Abspülen mit Leitungswasser manuell entfernt werden. Verbleibende Milch- und Leitungswasserreste begünstigen wiederum die Anlagerung und Vermehrung von Mikroorganismen und deren Biofilmbildung. Da der Auslassstutzen des Sammeltanks kein in sich geschlossenes Rohrleitungssystem ist, wie die Melkanlage, können hier auch biofilmbildende Umweltkeime aus Staub, über Aerosole, aber auch über Melkerhände und Insekten eingetragen werden. Beim nächsten Durchfluss während des Melkens können diese sich dann mit der Rohmilchmikrobiota vermischen, mit der Milch in den Sammeltank gelangen und somit in milchverarbeitende Betriebe weitergetragen werden. Aufgrund der von Biofilmen am Auslassstutzen des Milchsammeltanks ausgehenden indirekten Verbrauchergefährdung, wurde auch dieser Probenahmeort in die Untersuchung mit einbezogen, obwohl er streng genommen keinen Bestandteil der Melkanlage darstellt.

Insbesondere in den Rohleitungen der Melkanlage wurden starke Unterschiede zwischen den kulturell und molekularbiologisch ermittelten GKZ festgestellt. Ein Grund hierfür könnte sein, dass es sich bei einem großen Teil der dort ansässigen Biofilmbesiedler um Milchsäurebakterien handelt. Dies wurde in anderen Untersuchungen derselben Melkanlage bereits bestätigt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund ihrer hohen Nährstoffansprüche lassen sich Milchsäurebakterien schwer auf TSA kultivieren. Stattdessen sollte als Nährmedium zum Nachweis dieser Bakterien ein de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) Agar bei anaerober Inkubation verwendet werden. Da die DNA der kulturell nicht nachweisbaren Milchsäurebakterien aus der Tupferabschwemmung trotzdem extrahiert werden konnte, sind die höheren KbE-Äquivalente in den Rohrleitungen vermutlich durch die entsprechend höheren Signale in der RT-qPCR zu erklären.

4.2 Antibiotikaresistenzen

Wie in Abb. 9 zu sehen, waren die kulturell ermittelten Keimzahlen für Cloxacillin-resistente Mikroorganismen in den meisten Fällen etwa gleich hoch wie die GKZ. Eine Erklärung für das hohe Auftreten von Cloxacillin-Resistenzen in den Melkanlagen-Biofilmen ist der präventive Einsatz eines Cloxacillin-haltigen Präparates zum Trockenstellen der Milchkühe im untersuchten Milchviehbetrieb. Während gegen klinische Mastitiden therapeutisch häufig Penicillin, oder Mischungen aus Ampicillin und Cloxacillin oder Tetracyclin verabreicht werden, kommt Cloxacillin in den meisten Fällen präventiv zur Vorbeugung von Mastitiden beim Trockenstellen zum Einsatz. Die präventive Gabe von Antibiotika zum Trockenstellen ist gängige Praxis in deutschen, sowie auch in europäischen und internationalen

Milchviehbetrieben (Tenhagen *et al.*, 2006; Olde Riekerink *et al.*, 2010; Oliver *et al.*, 2011). Der so entstehende Selektionsdruck kann zum Entstehen und zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzen geführt haben (Bush, 2013). Aufgrund ihrer heterogenen Zusammensetzung und der fördernden Wirkung von Biofilmen auf den horizontalen Gentransfer konnten sich die Resistenzgene vermutlich über die gesamte Melkanlage verbreiten. Diese Beobachtungen decken sich mit Berichten aus der Literatur, wonach Multispezies-Biofilme das Wirtsspektrum für Resistenzgen-enthaltende mobile genetische Elemente (MGE) erweitern können und ein Reservoir für diese darstellen (Madsen *et al.*, 2012; Flemming *et al.*, 2016). Cloxacillin-Resistenzen werden meist durch OXA- β -Lactamasen der Gruppe D codiert, die häufig auf MGE in Gram-negativen Bakterien nachgewiesen werden (Bush & Jacoby, 2010; Poirel *et al.*, 2010). Von den prominentesten OXA- β -Lactamase-Gruppen 1, 2 und 10 (Bush & Jacoby, 2010) wurden in der untersuchten Melkanlage lediglich positive Signale für die OXA-2-Gruppe in den Tupfer-DNA-Extrakten der Melkbecherablage und in Plasmid-DNA-Extrakten von ausgewählten Isolaten detektiert.

Im Gegensatz zu den Keimzahl-Äquivalenten der GKZ lagen die für die Melkbecherablage aus dem Nachweis der OXA-2-Gene berechneten Keimzahl-Äquivalente deutlich unterhalb der kulturell ermittelten Keimzahl der Cloxacillin-Resistenten. An allen anderen Probenahmeorten, an denen hohe Keimzahlen Cloxacillin-Resistenter kulturell nachweisbar waren, wurde keins der untersuchten β -Lactamase codierenden Resistenzgene detektiert. Dies spricht dafür, dass die Vielfalt der Resistenzgene in den Biofilmen sehr hoch ist und andere als die untersuchten Gene für die hohe Anzahl an Resistenten verantwortlich sind.

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen Penicillin- und Ampicillin-Resistenzen, da die Keimzahlen der Resistenten gegen beide Antibiotika an den meisten Stellen innerhalb der Melkanlage gleich hoch waren. Da es sich bei beiden Antibiotika, wie auch bei Cloxacillin, um β -Lactam-Antibiotika handelt, kann es zur horizontalen Weitergabe eines MGE mit einem β -Lactamase-codierenden Gen gekommen sein. Das entsprechende Enzym könnte zur Spaltung beider Antibiotika geführt haben. Ebenfalls möglich wäre das Vorkommen einer β -Lactamase, die alle drei untersuchten β -Lactam-Antibiotika spalten kann. Aufgrund der Unterschiede zwischen Cloxacillin- und Ampicillin-/Penicillin-resistenten Keimzahlen ist eine wahrscheinlichere Erklärung jedoch das Auftreten verschiedener β -Lactamasen neben weiterer Resistenzmechanismen als hydrolysierender Enzyme. Ebenfalls dafür spricht, dass es sich bei Ampicillin und Penicillin um Penicillinase-sensitive Antibiotika handelt, während Cloxacillin durch entsprechende Enzyme nicht inaktiviert wird. Dementsprechend wären beim Vorkommen von nur einer Penicillinase in den Biofilmen nicht so hohe Keimzahlen Cloxacillin-resistenter Mikroorganismen zu erwarten. Aus der Literatur

geht hervor, dass mehrere tausend verschiedene β -Lactamasen mit stark variierender Affinität zu verschiedenen β -Lactam-Antibiotika bekannt sind (Poirel *et al.*, 2010; Bush, 2013), somit ist das Auftreten verschiedener Gene in den hoch diversen Melkanlagen-Biofilmen sehr wahrscheinlich. Zudem besteht die Möglichkeit, dass verschiedene Antibiotikaresistenzen auf demselben MGE codiert sind (Poirel *et al.*, 2010; von Wintersdorff *et al.*, 2016).

Trotz des unterschiedlichen Wirkmechanismus von Tetracyclin wurden an allen untersuchten Stellen hohe Keimzahlen Tetracyclin-resistenter Organismen nachgewiesen. Diese waren in den meisten Fällen etwa gleich hoch wie die Keimzahlen der Penicillin- und Ampicillin-Resistenten (Abb. 9). Das Antibiotikum Tetracyclin wird im untersuchten Betrieb selten und nur therapeutisch zur Behandlung von akuten Infektionen eingesetzt. Ein möglicher Grund für den hohen Resistenzstatus der Biofilme könnte, neben der generell erhöhten Stabilisierung von Resistenz-vermittelten Plasmiden, die schlechte biologische Abbaubarkeit von Tetracyclin sein. Dieses wird unverändert ausgeschieden und kann in der Umwelt länger persistieren und einen stetigen Selektionsdruck auf die Mikroorganismen ausüben (Heuer *et al.*, 2011; Capita & Alonso-Calleja, 2013). Ein möglicher Eintragungsweg von Tetracyclin-Resistenzen kann daher u. a. durch Darm-Besiedler aus dem Fäzes der Milchrinder resultieren. Gegen Tetracyclin sind verschiedene Resistenzmechanismen bekannt, wovon Effluxpumpen und ribosomale Schutzproteine die häufigsten sind. Deren Auftreten unterscheidet sich zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Während Effluxpumpen häufiger bei Gram-negativen Bakterien zu finden sind, kommen ribosomale Schutzproteine eher in Gram-positiven Organismen vor (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). In der vorliegenden Studie wurde nur auf das ribosomale Schutzprotein codierende *tetM*-Gen untersucht. *tetM*-Gene sind häufig auf MGE wie Transposons und Plasmiden codiert und damit horizontal übertragbar. Neben dem positiven RT-qPCR-Nachweis in den Biofilm-DNA-Extrakten aller Probenahmeorte, konnte das Gen auch in Plasmid-DNA-Extrakten von Reinkulturen detektiert werden. Der Nachweis sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Gattungen in dieser, wie auch in anderen Studien, spricht für die Übertragung durch HGT und das breite Wirtsspektrum der entsprechenden MGE (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001).

In diese Studie konnten keine Einflussparameter auf die Mikrobiota festgestellt werden, die eine Übertragbarkeit der Befunde auf andere landwirtschaftliche Produktionseinrichtungen einschränken oder sogar ausschließen. Die Vermutung, dass in Milchvieh-haltenden Betrieben durch häufigen und präventiven Antibiotikaeinsatz hohe Resistenzraten der in Biofilmen ansässigen Mikrobiota auftreten können, lässt sich somit auch auf andere landwirtschaftliche Tierhaltungsbetriebe übertragen. Hier sind insbesondere die Liegeflächen und Tränken von Geflügel- und Schweinemastbetrieben zu nennen, auf denen sich

entsprechende Biofilme bilden können, die zur Akquirierung und Weiterverbreitung von Antibiotikaresistenzgenen beitragen können. Publikationen über die Korrelation von Mikroorganismendichte und der Abundanz von Antibiotika-resistenten Bakterien bzw. von Resistenzgenen in Geflügel- und Schweinemastbetrieben sind nicht bekannt. Eine vergleichende Bewertung ist daher nicht möglich.

Eine Gefahr der Übertragung von antibiotikaresistenten Bakterien auf Verbraucher ist direkt nur durch den Verzehr von Rohmilch und Rohmilchprodukten gegeben (Tenhagen *et al.*, 2006). Dennoch erfreut sich dieses Ernährungsverhalten immer größerer Beliebtheit, sodass auch die Wahrscheinlichkeit eines solchen Übertragungsweges zunimmt. Jedoch kann es durch den Eintrag der antibiotikaresistenten Biofilmbildner mit der Milch in milchverarbeitende Betriebe auch dort zur Neuausstattung von potenziellen Pathogenen mit Antibiotikaresistenzgenen kommen (Oliver *et al.*, 2011; Madsen *et al.*, 2012). Hier besteht die Möglichkeit, dass die Erreger eine Sekundärinfektion des Lebensmittels nach dem Pasteurisieren verursachen, wodurch die Verbrauchergefährdung erhöht wird. Gelangen antibiotikaresistente Mikroorganismen mit dem Spülwasser der Melkanlage oder über Dung in die Umwelt, können sich die enthaltenen Antibiotikaresistenzgene dort ebenfalls weiter verbreiten (Heuer *et al.*, 2011). Schlussendlich kann es auf verschiedenen Wegen zur Neuausstattung von Pathogenen mit klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen kommen (White & McDermott, 2001; Madsen *et al.*, 2012), auf die Biofilme in Melkanlagen einen direkten oder indirekten Einfluss haben.

4.3 Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in Melkanlagen-Biofilmen

Die bakterielle Gemeinschaft der antibiotikaresistenten Bakterien in den Melkanlagen-Biofilmen war hochdivers. Es wurden hohe Spezies- und Gattungsvielfalten der typischen Milch-assoziierten Phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Actinobacteria* detektiert (Abb. 10).

Für die nachgewiesenen Bakterien kommen verschiedene Quellen, wie die Stallumgebung (Einstreu, Futter), Staub, Aerosole, Fäzes, Melkerhände und das Kuheuter in Frage, die zunächst die Milch und daraus resultierend die Melkanlage kontaminieren. Zusätzlich können Mikroorganismen durch von der Vakuumpumpe während des Melkvorgangs angesaugte Staubpartikel, oder mit dem Spülwasser nach der Reinigung und Desinfektion in die Melkanlage gelangen.

Vor allem die Gattungen *Acinetobacter* und *Chryseobacterium* zeichneten sich durch hohe Speziesvielfalten mit Resistenzen gegen alle vier getesteten Antibiotika aus. In anderen Arbeiten wurde bereits ein hohes Biofilmbildungsvermögen verschiedener Spezies dieser

Gattungen gezeigt (Tüffers, 2017; Weber, unveröffentlicht). Somit können antibiotika-resistente, biofilmbildende Vertreter der Gattungen den Eintrag und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen in der Melkanlage begünstigen.

Aus dem Phylum *Firmicutes* wurden verschiedene Milchsäurebakterien, unter anderem die Spezies *Enterococcus faecalis* nachgewiesen. Diese enthält häufig Tetracyclin-Resistenz vermittelnde, horizontal übertragbare Transposons. Somit stellen diese Milchsäurebakterien ein potenzielles Reservoir für Antibiotikaresistenzgene dar (Gomes *et al.*, 2016). Ähnlich verhält es sich mit der nachgewiesenen Spezies *Staphylococcus aureus*. Dieser Mastitiserreger besitzt als Virulenzfaktor zur Besiedelung der Kuhzitze zumeist ein gutes Biofilmbildungsvermögen (Gomes *et al.*, 2016). Zudem handelt es sich bei *blaZ* um ein Staphylokokken-spezifisches β -Lactamase-Gen, weshalb antibiotikaresistente *S. aureus* Isolate in Biofilmen der Melkanlage ein hohes Risiko für die Verbreitung von antibiotikaresistenten Mastitisserregern innerhalb der Herde darstellen. Zusätzlich besteht die Gefahr der Neuausstattung dieser Erreger mit weiteren Resistenzgenen durch HGT, wodurch effektive Behandlungsmaßnahmen beim Auftreten einer Mastitis begrenzt sind. Dafür spricht der Nachweis des *tetM*-Gens, jedoch nicht des *blaZ*-Gens, in dem genannten *S. aureus* Isolat (Tab. 9).

Der Nachweis von einigen antibiotikaresistenten Isolaten, deren Übereinstimmung der 16S rRNA-Gensequenz mit ihrem nächstähnlichen Typstamm geringer als 98,7 % war, spricht für das Vorhandensein von neu zu beschreibenden Spezies in Melkanlagen-Biofilmen.

Die hohe bakterielle Diversität sowie das Vorkommen verschiedener Kombinationen von Resistenzen bestätigt die Theorie, dass Biofilme ein Reservoir für Antibiotikaresistenzgene darstellen und das Wirtsspektrum von auf MGE gelegenen Antibiotikaresistenzgenen erweitern (Flemming *et al.*, 2016). Zusätzlich bestätigen sich die Assoziationen zwischen dem erhöhten Selektionsdruck durch den vermehrten Antibiotikaeinsatz in Tierhaltungsbetrieben und der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen, auch zwischen verschiedenen, nicht nahe verwandten, Gattungen (Blair *et al.*, 2015; von Wintersdorff *et al.*, 2016).

4.4 Evaluierung der Methoden zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen

Mit Hilfe der Kultivierung der Tupferabstrichproben auf TSA bzw. Antibiotika-versetztem TSA konnte eine hohe Speziesvielfalt der bakteriellen Gemeinschaft der Melkanlagen-Biofilme dargestellt werden. Trotzdem ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Auswahl des Mediums sowie der Inkubationsbedingungen einige Bakteriengruppen diskriminiert hat. Hierzu zählen zum Beispiel obligate Anaerobier, oder Organismen mit speziellen Nährstoffansprüchen. Dies zeigt sich in der Diskrepanz zwischen den kulturell und

molekularbiologisch ermittelten GKZ in den Rohrleitungen der Melkanlage. Der Unterschied könnte, wie bereits in Abschnitt 4.1 diskutiert, durch Unterschätzen der Milchsäurebakterien zustande gekommen sein. Einen weiteren Unterschied könnten VBNC-Zellen ausgemacht haben, die besonders in Biofilmen vermehrt auftreten, sich aber mit Hilfe von Standardmethoden nicht kultivieren lassen (Flemming *et al.*, 2016).

Ein Vorteil der kulturellen Keimzahlbestimmung lag in der Möglichkeit zur Vereinzelung von Isolaten. Durch deren Identifizierung sowie weiterer Charakterisierung hinsichtlich Kreuzresistenzen gegen die getesteten Antibiotika, oder ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung, konnten Aussagen zum potenziell von ihnen ausgehen Risiko als Mastitiserreger, Verderbniserreger oder Humanpathogene getroffen werden. Letztendlich konnten mit den resistenten Isolaten Mating-Experimente durchgeführt werden, um die Übertragbarkeit ihrer Antibiotikaresistenzen *in vitro* zu überprüfen.

Bei molekularbiologischen Methoden ist der kritische Punkt der vollständige Zellaufschluss bei der DNA-Extraktion. Besonders Gram-positive Bakterien mit massiven Zellwänden lassen sich in den meisten Fällen nur mit Enzymen aufschließen (Weber *et al.*, 2014). Um diese mögliche Fehlerquelle so gering wie möglich zu halten, wurde die DNA-Extraktion aus den Tupferproben mit zwei verschiedenen Protokollen jeweils für Gram-positive und Gram-negative Bakterien durchgeführt. Während sich aufgrund der geringeren C_T-Werte im RT-qPCR-Nachweis der 16S rRNA-Gene ein effizienterer Aufschluss von Gram-positiven Bakterien vermuten ließe, war genau das Gegenteil beim *tetM*-Nachweis zu beobachten. Zu Effizienz und Vollständigkeit des Zellaufschlusses lassen sich insgesamt in der vorliegenden Arbeit keine weiteren Aussagen treffen.

Aufgrund der oftmals sehr geringen DNA-Konzentrationen in den Tupfer-DNA-Extrakten, wurden die RT-qPCR-Reaktionen mit einer relativ hohen Zyklenanzahl von bis zu 45 Zyklen durchgeführt. Die PMA-Behandlung des Mastermixes vor Zugabe der Template-DNA stellte dabei eine effektive Methode zur Unterdrückung von positiven Signalen in den Negativkontrollen zum Nachweis der 16S rRNA-Gene dar. Bei der Nachweisreaktion für das *blaZ*-Gen musste, abweichend von der Originalmethode nach Pereira *et al.* (2014), ein neuer Primer designend und eingesetzt werden. Der Grund hierfür war, dass sich keine Signale in der DNA des Referenzorganismus detektieren ließen. Dies könnte daran liegen, dass sich in das mit 78 bp relativ kurze Amplifikationsprodukt nicht ausreichend SYBR[®] Green Moleküle anlagern konnten, um Fluoreszenzsignale oberhalb der angelegten Schwelle zu erzeugen. Nach Einsatz des selbst designten Primers zur Verlängerung des Amplifikationsprodukts auf 233 bp und Herabsetzen der Annealingtemperatur im Vergleich zur Originalquelle konnten positive Signale in der Referenz detektiert werden. Während in den Tupfer-DNA-Extrakten

kein Nachweis des *blaZ*-Gens erfolgte, konnte es in verschiedenen Isolaten detektiert werden. Ein möglicher Grund hierfür ist das geringe Vorkommen des Gens in der Gesamtpopulation, sodass dessen Konzentration in den Tupfer-DNA-Extrakten zu gering war, um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen.

Der Vorteil des gezielten Nachweises von bakteriellen Genen mittels RT-qPCR ist die Diskriminierung von eukaryotischen Mikroorganismen, wie Hefen oder Schimmelpilzen. Diese sind aufgrund ihres unterschiedlichen Metabolismus intrinsisch gegen die getesteten Antibiotika resistent, werden aber auf den eingesetzten TSA-Medien dennoch als „resistente“ Kolonien gezählt. Trotzdem stellen die für die Berechnung der Keimzahl-Äquivalente aus den RT-qPCR-Ergebnissen getroffenen Annahmen eine gewisse Verfälschung dar. Zunächst ist die Annahme einer durchschnittlichen Anzahl von 4,2 16 rRNA-Genen pro Bakterienzelle kritisch zu betrachten, da diese an den verschiedenen Abstrichorten, je nach tatsächlicher Spezieszusammensetzung, stark abweichen kann. Zusätzlich ist die Annahme von nur einem Resistenzgen pro Bakterienzelle kritisch zu sehen, da, je nach MGE, auf dem die Resistenz codiert ist, mehrere Kopien des Gens oder des gesamten MGEs vorliegen können. Zudem wurde keine Lebend-Tot-Diskriminierung vor der DNA-Extraktion vorgenommen, sodass auch die DNA toter Zellen und eDNA aus der EPS-Schicht extrahiert wurde. Zum Vergleich der beiden Verfahren war die Berechnung allerdings ausreichend gut geeignet.

4.5 Mating-Experimente

In der vorliegenden Arbeit brachte kein Mating-Experiment einen Transkonjuganten hervor, bzw. positive Matings waren nicht erneut reproduzierbar. Somit konnte die *in vitro* Übertragbarkeit der Antibiotikaresistenzen der Melkanlagen-Isolate nicht gezeigt werden.

Im Vergleich zur Literatur wurde zur Verifizierung der gewachsenen „Transkonjuganten“ eine Identifizierung über die 16S rRNA-Gensequenzierung vorgenommen. Dies erfolgte in den meisten Studien nicht, sondern alle auf dem entsprechend ausgewähltem Selektivmedium für Transkonjuganten gewachsene Zellen wurden als solche gewertet, oder das zu übertragende Resistenzgen wurde mittels RT-qPCR nachgewiesen (Conwell *et al.*, 2017). In den entsprechenden Studien wurde als Selektionsmarker häufig ebenfalls Rifampicin eingesetzt, gegen das der Rezipient eine (zuvor erzeugte) Resistenz aufwies, der Donor jedoch nicht. In der vorliegenden Untersuchung konnte jedoch in mehreren Mating-Experimenten gezeigt werden, dass auch der Donor in der Lage war, vermutlich durch spontane Mutation eine Rifampicin-Resistenz zu erwerben und somit auf dem Selektivmedium für Transkonjuganten zu wachsen. Der alleinige Nachweis des zu übertragenen Resistenzgens wäre in diesen Fällen also nicht ausreichend gewesen, um die auf dem Doppelselektivmedium gewachsenen Kolonien als Transkonjuganten zu bestätigen.

Obwohl das zuvor durchgeführte Clumping-Assay die verwendeten *Enterococcus*-Stämme als potenziell geeignete Mating-Partner identifizierte, konnte keine erfolgreiche Übertragung der Tetracyclin-Resistenz von *E. faecalis* AO2T2 auf *E. faecium* E2/14 nachgewiesen werden. Stattdessen fand möglicherweise eine Übertragung des β -Galactosidase-Gens vom Rezipienten auf den Donor statt, da einige vom Doppelselektivmedium für Transkonjuganten gewonnenen *E. faecalis*-Stämme nach dem Überführen auf X-Gal-haltiges Medium in der Lage waren, den Farbstoff zu spalten und als blaue Kolonien zu wachsen. Bei der Inkubation des Donors ohne den Rezipienten zeigte sich ebenfalls Wachstum auf dem Selektivmedium für Transkonjuganten, jedoch war keine der 60 vereinzelt Kolonien in der Lage, eine Blaufärbung durch X-Gal-Spaltung hervorzurufen. Dies zeigt, dass eine Rifampicin-Resistenz durch Punktmutation entstanden ist, jedoch der Rezipient zwingend notwendig war, um eine X-Gal-Spaltung durch den Donor nach dem Mating zu ermöglichen. Die Verklumpung des potenziellen Donors *E. faecalis* AO2T2 durch Zugabe des Kulturüberstandes von *E. faecium* E2/14 könnte auch auf andere Ursachen zurückzuführen sein, als auf die Reaktion auf Pheromone. So könnten auch Stress oder sekundäre Stoffwechselprodukte aus dem eigenen Kulturüberstand die Verklumpung der Donorzellen ausgelöst haben (Abb. 13).

Insgesamt ist die Durchführung von Mating-Experimenten zwar eine geeignete *in vitro* Methode, um die Faktoren zu überprüfen, welche den Genaustausch über HGT beeinflussen könnten, jedoch birgt sie auch einige Schwächen. So spielen in Multispezies-Biofilmen viele weitere Faktoren eine Rolle beim HGT, wie Zell-Zell-Kommunikation über Quorum-Sensing (Toyofuku *et al.*, 2015), das Vorhandensein von EPS und darin enthaltenen Substanzen (z. B. subinhibitorischen Antibiotika-Konzentrationen), usw. (Flemming *et al.*, 2016). Aus der Literatur geht hervor, dass das Transkonjugant/Donor-Verhältnis nach dem Mating in Biofilmen mit 10^{-3} - 10^{-1} viel höher ist als im planktonischen Zustand mit $< 10^{-5}$ (Sørensen *et al.*, 2005). Auch wenn die Mikroorganismen bei Filter-Matings in einem Biofilm-ähnlichen Zustand angezogen werden, ist die Vergleichbarkeit mit einem natürlichen Biofilm sehr gering (Sørensen *et al.*, 2005).

Ein weiteres Problem war die Selektion geeigneter Donor-Stämme, weil nicht bekannt war, ob die Resistenzen der gewonnenen Biofilm-Isolate intrinsisch bedingt, durch Mutation hervorgerufen, oder tatsächlich auf horizontal übertragbaren MGE Elementen gelegen waren.

4.6 Zusammenhang zwischen Zelldichte und Übertragung von Antibiotikaresistenzen

Anhand der bisherigen Erkenntnisse ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der erhöhten Besiedelungsdichte in Biofilmen und der erhöhten Frequenz der Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen mittels HGT feststellen. So zeigt Abb. 11 deutlich, dass es sowohl Stellen mit relativ geringer Besiedelungsdichte, aber hohen Anteilen von Tetracyclin-resistenzen gab (Filterrohr), aber auch Stellen mit hoher Besiedelungsdichte, an denen die relative Häufigkeit von *tetM*-Genen gering war.

Als Grund für diese Beobachtungen ist zu nennen, dass die Frequenz des HGT vermutlich nicht von der Zelldichte alleine, sondern von vielen verschiedenen Faktoren abhängt. Als wichtiger Faktor ist die Spezieszusammensetzung und -vielfalt der einzelnen Biofilme zu nennen, die sich, je nach Probenahmeort, stark unterscheiden kann. Weiterhin ist die Ausstattung der vorzufindenden Biofilmbesiedler mit Antibiotikaresistenzgenen und deren Mobilisierbarkeit und horizontale Übertragbarkeit von Bedeutung. Auch die Zusammensetzung der Biofilmmatrix ist von Bedeutung. So kann zum Beispiel das Vorliegen von eDNA in der EPS-Schicht die Kompetenzentwicklung bestimmter Spezies zur Aufnahme freier DNA (Transformation) triggern (Madsen *et al.*, 2012). Des Weiteren stellt die EPS-Schicht eine wichtige Voraussetzung für die Zell-Zell-Kommunikation über Quorum-Sensing, oder andere Signalmoleküle dar (Toyofuku *et al.*, 2015; Flemming *et al.*, 2016).

An Stellen mit hohem relativen Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen trotz geringer GKZ ist eine Absättigung der vorhandenen Bakterien mit den entsprechenden Resistenzgenen denkbar.

Weiterhin spielen das Alter und die Architektur von Biofilmen vermutlich eine große Rolle. So ist eine horizontale Übertragung von Resistenzgenen in älteren, reiferen Biofilme, wie sie vermutlich auf den Melkbecherablagen vorzufinden sind, häufig nur eingeschränkt in den oberen Schichten des Biofilms möglich (Madsen *et al.*, 2012; Kouzel *et al.*, 2015).

5 Zusammenfassung

Biofilme in Melkanlagen können ein Reservoir für Antibiotikaresistenzgene darstellen. Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung von Multispezies-Biofilmen in natürlichen Habitaten sowie der räumlichen Nähe der Zellen untereinander, findet ein Austausch dieser Antibiotikaresistenzen durch horizontalen Gentransfer in Biofilmen vermutlich vermehrt statt. In milcherzeugenden Betrieben kann dies zur Neuausstattung von Mastitiserregern mit Antibiotikaresistenzen mit der Folge von hohen wirtschaftlichen Verlusten führen. Durch den Eintrag der antibiotikaresistenten Mikroorganismen in die Milch und Weitergabe der Resistenzen an Organismen entlang der Verarbeitungskette kann zudem eine Verbrauchergefährdung nicht ausgeschlossen werden.

Im vorliegenden Projekt wurde die Arbeitshypothese untersucht, dass in Biofilmen einer Melkanlage ein Zusammenhang zwischen der Zelldichte und dem vermehrten Auftreten von Antibiotikaresistenzen existiert. Dafür wurden Tupferproben von verschiedenen Stellen der Melkanlage genommen und in einem parallelen Ansatz kulturell und molekularbiologisch auf Antibiotikaresistenzen untersucht. Einige Isolate wurden in Mating-Experimenten eingesetzt, um die horizontale Übertragbarkeit der enthaltenen Antibiotikaresistenzen *in vitro* zu überprüfen.

An verschiedenen Stellen innerhalb der Melkanlage konnten Biofilme nachgewiesen werden, in denen insbesondere Cloxacillin-Resistenzen weit verbreitet waren. Gegen Penicillin, Ampicillin und Tetracyclin lagen geringere Resistenzraten vor, die sich untereinander kaum unterschieden. Das vermehrte Auftreten von Cloxacillin-Resistenzen wurde durch den präventiven Einsatz von Cloxacillin-enthaltenden Trockenstellern erklärt. Die höchste Besiedlungsdichte wiesen die Melkbecherablagen auf, was durch die Nähe zum Kuheuter ein besonderes Risiko darstellt.

Insgesamt lagen die molekularbiologisch mittels RT-qPCR berechneten GKZ-Äquivalente in allen Fällen höher als die kulturell ermittelten GKZ. Dies war auf den Nachweis von nicht kultivierbaren Mikroorganismen sowie eDNA zurückzuführen. Während OXA-2-Gene nur in den DNA-Extrakten der Melkbecherablage detektiert wurden, konnte das *tetM*-Gen an allen Probenahmeorten nachgewiesen werden. Insgesamt waren die hohen kulturell ermittelten Keimzahlen an Antibiotikaresistenten nicht alleine auf die nachgewiesenen Resistenzgene zurückzuführen. Vielmehr wurden die Resistenzen vermutlich durch eine Vielzahl verschiedener Resistenzgene vermittelt.

Weder mit den molekularbiologischen noch mit den kulturellen Daten konnte die Arbeitshypothese eindeutig bestätigt oder widerlegt werden. Vielmehr spielen neben der

erhöhten Zelldichte vermutlich weitere Faktoren, wie das Alter und die Spezieszusammensetzung der Biofilme eine Rolle bei der Effizienz der horizontalen Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen.

Keines der *in vitro* Mating-Experimente erbrachte positive Ergebnisse, was auf die mangelnde Vergleichbarkeit von *in vitro* Studien mit den Verhältnissen in natürlichen Multispezies-Biofilmen zurückzuführen ist.

6 Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis

In der vorliegenden Studie konnte ein positiver Zusammenhang zwischen dem präventiven Einsatz von Cloxacillin-haltigen Trockenstellpräparaten und dem vermehrten Auftreten entsprechender Antibiotikaresistenzen gezeigt werden. Obwohl die präventive Gabe von Antibiotikahaltigen Trockenstellern weiterhin gängige Praxis in Milchviehbetrieben ist, sollte über Alternativen nachgedacht werden. So könnte häufiger zwischen verschiedenen Wirkstoffen gewechselt werden, um den Selektionsdruck für die Entstehung und Weitergabe der entsprechenden Antibiotikaresistenzen gering und zeitlich begrenzt zu halten. Dabei muss darauf geachtet werden, dass alle genutzten Präparate eine gute Wirksamkeit gegen die in der Herde am häufigsten auftretenden Mastitiserreger aufweisen. Zudem sollte es idealerweise keine bisher bekannten Resistenzgene geben, die Kreuzresistenzen gegen die eingesetzten verschiedenen Präparate verleihen. Somit würde sich das Risiko für schwer behandelbare oder chronische Mastitisinfektionen durch antibiotikaresistente Mastitiserreger evtl. verringern (Gomes *et al.*, 2016).

Um der Biofilmbildung an verschiedenen Stellen innerhalb der Melkanlage entgegen zu wirken, könnten einige Modifikationen am Aufbau der Melkanlage vorgenommen werden. So könnten zum Beispiel die Melkgeschirre zwischen den Melkvorgängen magnetisch aufgehängt werden, statt wie bisher auf die Melkbecheranlagen aufgesteckt. Dies würde das Risiko des Eintrages von antibiotikaresistenten Bakterien von den dicht besiedelten Melkbecherablagen in die Melkanlage eliminieren. Beim derzeitigen Aufbau der Melkbecherablagen sollte vermehrt auf deren Reinigung geachtet sowie die Ansammlung von Wasser, Milch und Schmutzpartikeln vermieden werden. Der Auslassstutzen stellt einen Bereich dar, dessen Besiedelungsdichte bei verschiedenen Probenahmen stark variierte. Dies war vermutlich davon abhängig, wie lange die CIP-Reinigung des Sammel tanks nach Abholung der Anlieferungsmilch her war. Hier sollte auf die Hygiene bei der Entnahme von Milchproben und dem anschließenden Ausspülen des Stutzens vermehrt geachtet werden, um die Ablagerung von Milchbestandteilen als Nährboden für Biofilmbildner zu verringern.

Potenziell stellt die Milch kein großes Risiko als Überträger von antibiotikaresistenten Mikroorganismen auf den Konsumenten dar, weil die entsprechenden Keime durch die Pasteurisierung abgetötet werden. Das ändert sich, wenn der Trend zum Verzehr von Rohmilch und -produkten weiter zunimmt. Hier sollten die Risiken eindeutig mit dem Verbraucher kommuniziert werden.

7 Literatur

- Abdullahi UF, Igwenagu E, Mu'azu A, Aliyu S, Umar MI.** 2016. Intrigues of biofilm: a perspective in veterinary medicine. *Vet World* 9:12-18.
- Altschul SF, Madden TL, Schaeffer AA, Zhang J, Lipman DJ et al.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Aminov R, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R.** 2003. Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol* 67(1):22-32.
- Andersson DI, Hughes D.** 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Rev Microbiol* 12:465-478.
- Balcázar JL, Subirats J, Borrego CM.** 2015. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol* 6:1261.
- Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N.** 2002. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR–restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 50(1):11-18.
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV.** 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Rev Microbiol* 13:42-51.
- Bremer PJ, Fillery S, McQuillan AJ.** 2006. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int J Food Microbiol* 106:254-262.
- Brooks JD, Flint SH.** 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int J Food Sci Tech* 43:2163-2176.
- Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE).** 2017. Bericht zur Markt- und Versorgungslage mit Milch und Milcherzeugnissen.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL).** 2017. GERMAP 2015. Antibiotika-Resistenz und -verbrauch. ISBN 978-3-9818383-0-5.
- Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Ch* 54: 969-976.
- Bush K.** 2013. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann NY Acad Sci* 1277:84-90.
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC.** 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 3:110.
- Capita R, Alonso-Calleja C.** 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crc Cr Rev Food Sci* 53:11-48

- Conwell M, Daniels V, Naughton PJ, Dooley, JSG.** 2017. Interspecies transfer of vancomycin, erythromycin and tetracycline resistance among *Enterococcus* species recovered from agrarian sources. *BMC Microbiol* 17:19.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** 1995. Microbiol biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711-745.
- Davies J, Davies D.** 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74(3):417-433.
- De la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock REW.** 2013. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr Opin Microbiol* 16:580-589.
- Dolejská M, Rybarikova J, Janoszowska D, Roubalova E, Cizek A et al.** Plasmids carrying bla_{CTX-M-1} and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother* 66:757-764.
- Felsenstein, JJ.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol* 39(4):783–791.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S.** 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Rev Microbiol* 14:563-575.
- Garnett JA, Matthews S.** 2012. Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective. *Curr Protein Pept Sc* 13:739-755.
- Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Briggs Phillips G et al.** 1981. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Fraser WW.** 2002. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol* 46:203-256.
- Gomes F, Saavedra MJ, Henriques M.** 2016. Bovine mastitis/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathog Dis* 74:ftw006.
- Hall CW, Mah TF.** 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 41:276-301.
- Hall, TA.** 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S* 41:95–98.
- Hathroubi S, Mekni MA, Domenico P, Nguyen D, Jacques M.** 2016. Biofilms: Microbial shelters against antibiotics. *Microb Drug Resist* 23:147-156.
- Hein I, Schneeweiss W, Stanek C, Wagner M.** 2007. Ethidium monoazide and propidium monoazide for elimination of unspecific DNA background in quantitative universal real-time PCR. *J Microbiol Meth* 71:336-339.

- Heuer H, Schmitt H, Smalla K.** 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* 14:236-243.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O.** 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Ag* 35:322-332.
- Jahid IK, Ha SD.** 2014. The paradox of mixed-species biofilms in the context of food safety. *Compr Rev Food Sci F* 13:990-1011.
- Jutkina J, Rutgersson C, Flach CF, Larsson DGJ.** 2016. An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance. *Sci Total Environ* 548-549:131-138.
- Kouzel N, Oldewurtel ER, Maier B.** 2015. Gene transfer efficiency in Gonococcal biofilms: role of biofilm age, architecture, and pilin antigenic variation. *J Bacteriol* 197(14):2422-2431.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K.** 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870-1874.
- Kwok WK, Picioreanu C, Ong SL, Van Loosdrecht MCM, Ng WJ, Heijnen JJ.** 1998. Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol Bioeng* 58: 400-407.
- Latorre AA, Van Kessel JS, Karns JS, Zurakowski MJ, Schukken YH et al.** 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci* 93:2792-2802.
- Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Takashiba S et al.** 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunol Med Mic* 39:81-86.
- Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ.** 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:183-195.
- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J.** 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J* 171:398-407.
- Messing, J.** 1983. New M13 vectors for cloning. *Method Enzymol* 101:20 78.
- Mühl H, Kochem AJ, Disqué C, Sakka SG.** 2008. Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents fort he universal 16S rRNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagn Micr Infec Dis* 66:41-49.
- Muyzer, G, de Waal EC, Uitterlinden AG.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59 (3):695–700.

- Muyzer G, Teske A, Wirsén CO, Jannasch HW.** 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol* 164:165–172.
- Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN.** 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem* 395:559-575.
- Olde Riekerink RGM, Barkema HW, Scholl DT, Poole DE, Kelton DF.** 2010. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Prev Vet Med* 97:20-28.
- Oliver SP, Murinda SE, Jayarao BM.** 2011. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathog Dis* 8:337-355.
- Olsen I.** 2015. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34:877-886.
- Pereira L, Harnett G, Hodge M, Cattell J, Speers D.** 2014. Real-time PCR assay for detection of bla_Z genes in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 52(4): 1259-1261.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P.** 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Ch* 54:24-38.
- Roberts MC.** 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245:195-203.
- Saitou N, Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4):406-425.
- Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. Seiten 199-204 in *Methods in Phytobacteriology*. Z. Klement; K. Rudolph and D. C. Sands, ed. Akademiai Kiado, Budapest, HU.
- Schwarz S, Chaslus-Dancla E.** 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* 32: 201-225.
- Song F, Koo H, Ren D.** 2015. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. *Crit Rev Oral Biol M* 94:1027-1034.
- Sørensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N, Wuertz S.** 2005. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nature Rev Microbiol* 3:700-710.
- Srey S, Jahid IK, Ha SD.** 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31:572-585.

- Stokes HW, Gillings MR.** 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 35:790-819.
- Teh KH, Flint S, Palmer J, Lindsay D, Andrewes P, Bremer P.** 2011. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. *Int Dairy J* 21:742-747.
- Teh KH, Flint S, Palmer J, Andrewes P, Bremer P, Lindsay D.** 2014. Biofilm – An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *Int Dairy J* 34:32-40.
- Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W.** 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 89:2542-2551.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22 (22):4673–4680.
- Toussaint KA, Gallagher JC.** 2015. β -Lactam/ β -Lactamase inhibitor combinations: from then to now. *Ann Pharmacother* 49:86-98.
- Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N.** 2015. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci, Biotech, Biochem* 80:7-12.
- Tüffers S.** 2017. Experimente zur Bewertung der Übertragbarkeit von Antibiotikaresistenzen via horizontalem Gentransfer in Biofilmen. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät.
- Verraes C, van Boxtael S, van Meervenne E, van Coillie E, Herman L et al.** 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *Int J Environ Res Public Health* 10:2643-2669.
- Větrovský T, Baldrian P.** 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS one* 8(2), e57923.
- Weber M, Geißert J, Kruse M, Lipski A.** 2014. Comparative analysis of bacterial community composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide. *J Dairy Sci* 97:6761-6776.
- Von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Wolffs PFG et al.** 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front Microbiol* 7:173.
- Whelan JA, Russell NB, Whelan MA.** 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods* 278:261-269.
- White DG, McDermott PF.** 2001. Emergence and transfer of antibacterial resistance. *J Dairy Sci* 84:E151-E155.

- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J.** Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613-1617.
- Zimmermann J, Rückert C, Kalinowski J, Lipski A.** 2016. *Corynebacterium lactis* sp. nov., isolated from raw cow's milk. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:5288-5293.

8 Anhang

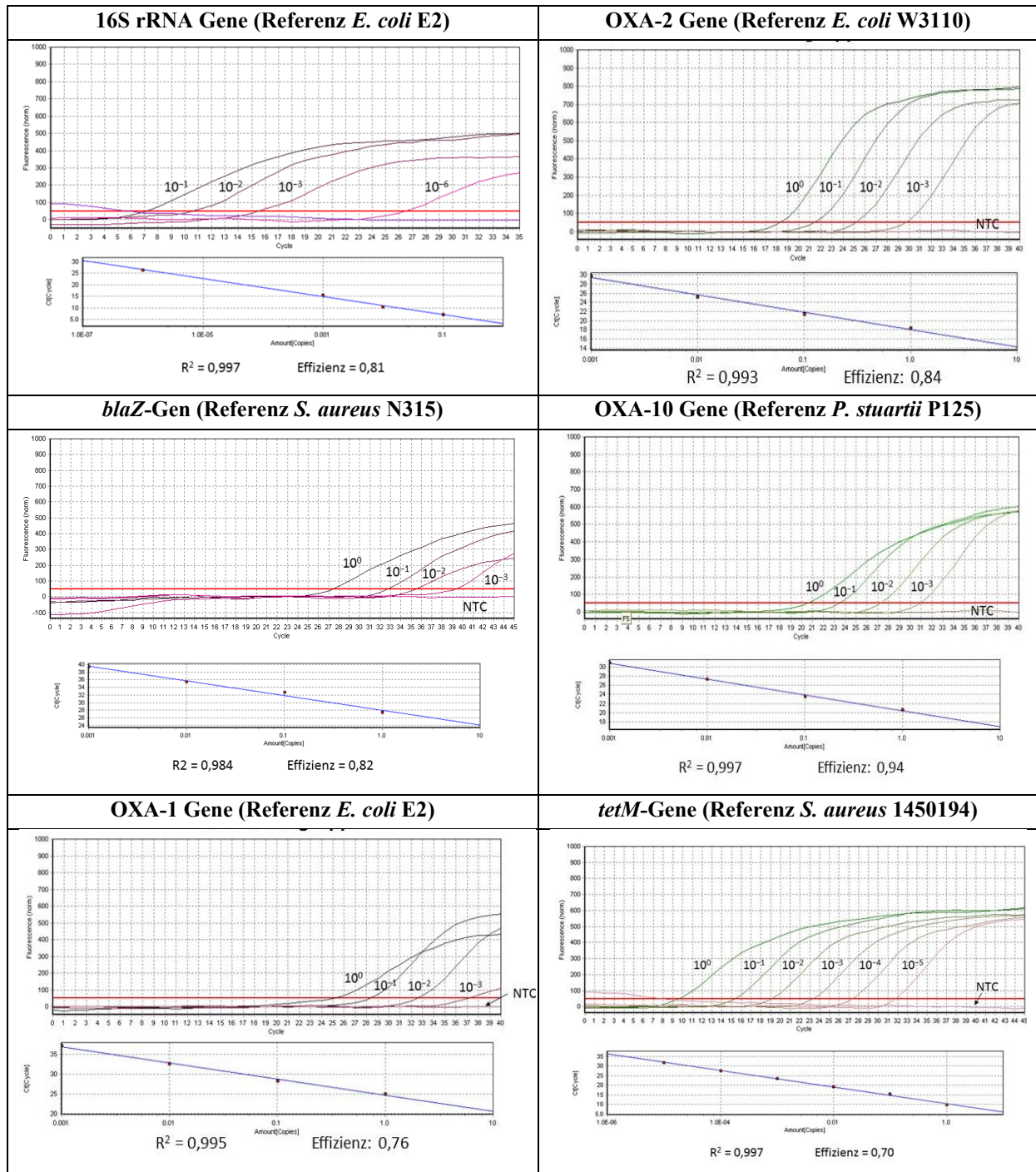


Abbildung 15: RT-qPCR-Amplifikationsplots zur Erstellung von Standardkurven aus den DNA-Extrakten der Referenzorganismen für den Nachweis der 16S rRNA, *blaZ*-, OXA-1, -2, und 10 sowie *tetM*-Gene bzw. Gengruppen. Angegeben sind außerdem das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Standardkurven und die Effizienz der jeweiligen Amplifikation.

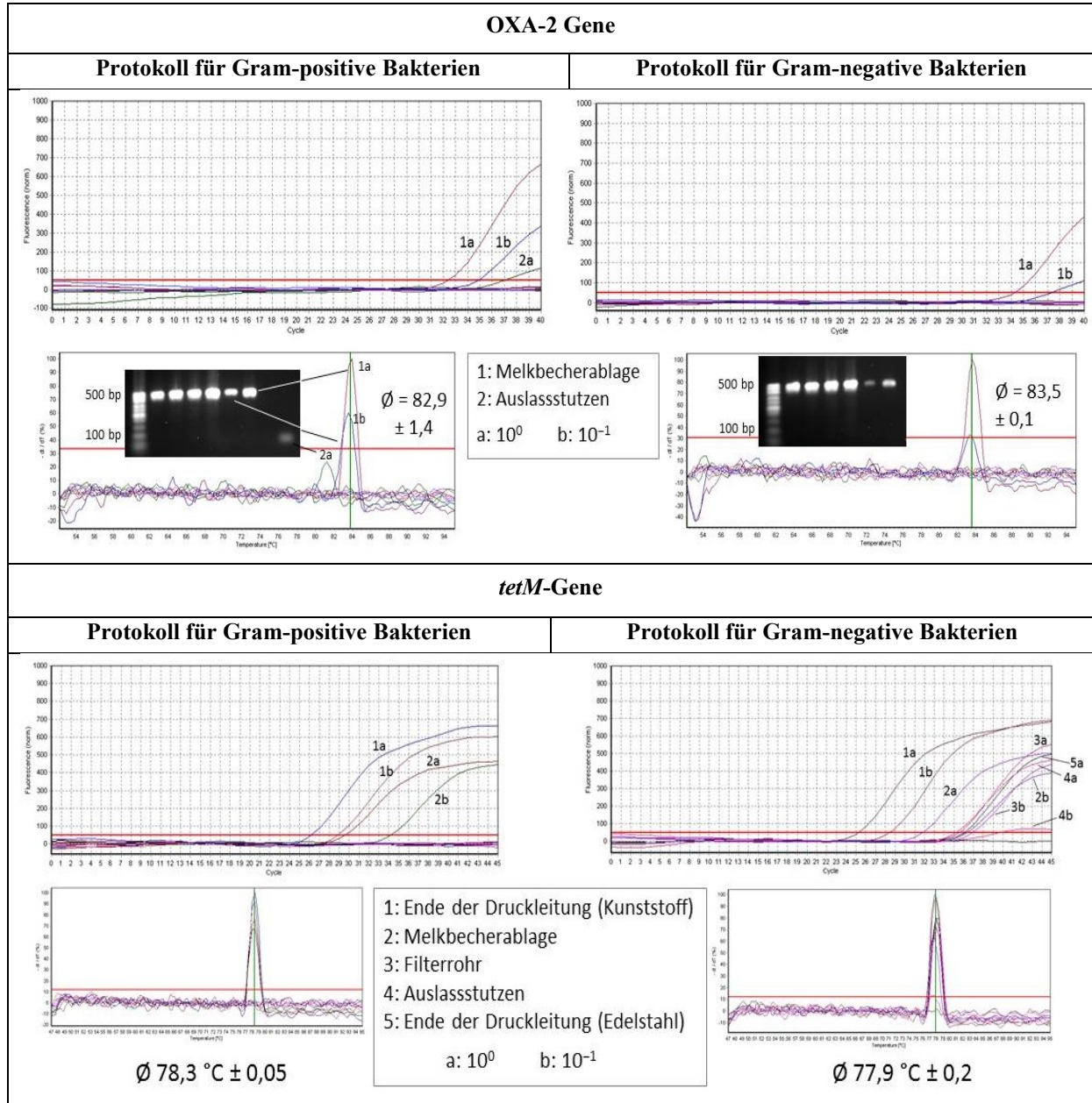


Abbildung 16: RT-qPCR-Amplifikationsplots für den Nachweis der OXA-2- und *tetM*-Gene bzw. Gengruppen in den Gesamt-DNA-Extrakten der Tupferabschwemmungen. Links: DNA-Extraktionsprotokoll für Gram-positive Bakterien, rechts: Protokoll für Gram-negative Bakterien. Zur Verifizierung der korrekten Amplifikate sind zudem die Schmelzkurven und Banden nach Auftragen auf ein 1 % Agarosegel gezeigt.

Tabelle 12: Wachstum ausgewählter Isolate aus Melkanlagen-Biofilmen auf allen getesteten Antibiotika-TSA. * kennzeichnet das ursprüngliche Isolationsmedium; bei keiner Angabe handelt es sich um Hauptbesiedler auf TSA ohne Antibiotikum. ++ Wachstum wie auf TSA ohne Antibiotikum; + im Vergleich zu TSA leicht eingeschränktes Wachstum; (+) schwaches Wachstum; – kein Wachstum.

Stamm	Antibiotikum			
	Cloxacillin (4 µg/ml)	Ampicillin (16 µg/ml)	Penicillin (16 µg/ml)	Tetracyclin (8 µg/ml)
<i>Acinetobacter albensis</i> A5-ST23	++*	(+)	++	++
<i>Acinetobacter guillouiae</i> AO3A2	++	++*	++	++
<i>Acinetobacter heamolyticus</i> AO5C2	++*	(+)	+	(+)
<i>Aeromonas media</i> AO5C3	++*	++	++	(+)
<i>Brachybacterium feacium</i> BG14	+*	–	–	–
<i>Brachybacterium nesterenkovi</i> AO3T2	–	–	–	+*
<i>Brevbacterium casei</i> AO4A2	++	+*	+	–
<i>Brevundimonas nasdae</i> AO5C4	++*	++	++	–
<i>Chryseobacterium</i> spp. A1-ST2	++	–	–	++
<i>Chryseobacterium bovis</i> A4-ST20	++*	+	+	+
<i>Dermaococcus abyssii</i> A1-ST3	++	–	–	++
<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> A1-ST38	+	+	+	++*
<i>Enterococcus faecalis</i> AO2T2	++	+	–	++*
<i>Flavobacterium oceanosedimentum</i> AO3C3	++*	–	–	–
<i>Hafnia paralvei</i> A5-ST37	++	++	++	++*
<i>Kocuria kristinae</i> A2-ST17	++*	–	–	++
<i>Kocuria salsicia</i> A4-ST27	++	++*	++	++
<i>Lactococcus raffinolactis</i> A1-ST1	+	+	–	–
<i>Luteimonas aestuarii</i> A5-ST10	++	++	++	++
<i>Microbacterium aurantaicum</i> AO4C4	++*	–	–	–
<i>Microbacterium pumilum</i> A2-ST6	+	–	–	++
<i>Moraxella osloensis</i> A1-ST15	+*	+	+	–
<i>Nakamurella panacisegetis</i> BG36	+	(+)	+*	–
<i>Ochrobactrum theophenicorans</i> AO5P2	++	++	++*	–
<i>Ottowia</i> spp. A1-ST13	+*	(+)	(+)	(+)
<i>Raoultella ornitholytica</i> AO4A1	+	+*	(+)	+
<i>Pandoraea apista</i> AO4A4	++	++*	++	++
<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> A5-ST21	++*	+	–	++
<i>Pseudomonas coleopterorum</i> A5-ST29	+	++*	+	+
<i>Rhodococcus qingshengii</i> AO4C3	+*	–	–	(+)
<i>Sphingobacterium hotanense</i> A1-ST5	++	++	++	++
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> BG19	++*	–	+	++
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> BG35	++	++	++*	++
<i>Stenotrophomonas</i> spp. BG28	++*	++	++	++
<i>Terrabacter</i> spp. A1-ST32	++	+	++*	++
<i>Variovorax ginsengisoli</i> A2-ST24	+*	+	+	+

Tabelle 13: In NCBI-Datenbank hinterlegte Referenzsequenzen zu den sequenzierten *tetM*-Amplifikaten der Isolate.

Referenzsequenzen aus der NCBI-Datenbank	Gesamtlänge d. Gens	Acc.-No.	Übereinstimmung (%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> HF4, <i>tetM</i> -Gen	1920 bp	KT281952	119/120 bp (99 %)
<i>Staphylococcus aureus</i> D10, <i>tetM</i> -Gen		KT281947	
<i>Staphylococcus xylosus</i> HF9, <i>tetM</i> -Gen		KT281950	
<i>Staphylococcus xylosus</i> Y1, <i>tetM</i> -Gen		KT281951	
<i>Enterococcus hirae</i> R17, Tet-Resistenz (ribosomales Schutzprotein), plasmidkodiert	1920 bp	CP015517	
<i>Enterococcus faecium</i> E39, Tet-Resistenz (ribosomales Schutzprotein)	1920 bp	CP011281	
<i>Enterococcus faecium</i> UW8175, <i>tetM</i> -Gen	1920 bp	CP011830	

Tabelle 14: In NCBI-Datenbank hinterlegte Referenzsequenzen zu den sequenzierten OXA-2-Amplifikaten der Isolate.

Referenzsequenzen aus der NCBI-Datenbank	Gesamtlänge/ Position d. Gens	Acc.-No.	Übereinstimmung (%)
<i>Acinetobacter bereziniae</i> YMC 06/10/R1547-IMP-1/VIM-2, Klasse-I-Integron, enth. DNA-Integrase (intI1) und blaOXA-2	3099 bp (2060...2887)	EU014166	409/409 bp (100 %)
<i>Aeromonas hydrophila</i> , Klasse-I-Integron, enth. unbekanntes Gen und blaOXA-2	1278 bp (73...900)	DQ519078	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Klasse-I-Integron, enth. DNA integrase (int1), Acetyltransferase (aacA1) und blaOXA-32	2193 bp (673...1500)	AF315351	
<i>Corynebacterium asperum</i> , Klasse-I-Integron, enth. enth. u.a. DNA-Integrase (intI1), und blaOXA-2	5720 bp (2407...3282)	AJ871915	
Plasmid IncP-1 beta pB10-2	2574 bp (1457...2284)	AY600086	
<i>Vibrio cholerae</i> , Plasmid pAS1	15723 bp (6973...7800)	DQ310703	
<i>Acinetobacter baumannii</i> 340, Klasse-I-Integron, enth. u.a. DNA-Integrase, blaVIM-2 und blaOXA-2	4424	AM749812	

9 Konsequenzen für weitere Forschungsaktivitäten

Um den Zusammenhang zwischen dem Einsatz von Cloxacillin und dem massiven Auftreten von Antibiotikaresistenzen gegenüber diesem Antibiotikum zu überprüfen, wäre eine Möglichkeit das Umstellen des Trockenstellers auf ein anderes Präparat. Als Voraussetzung müsste das neue Präparat eine ebenso gute Wirkung gegen die in dem untersuchten Milchviehbetrieb dominanten Mastitiserreger aufweisen und entsprechende Cloxacillin-Resistenz verleihende Gene keine Kreuzresistenz gegenüber des neuen Präparates vermitteln. Da im untersuchten Milchviehbetrieb *S. aureus* häufig als Mastitiserreger auftritt, würde als Alternative zu Cloxacillin nur Cefquinom als Cephalosporin der 4. Generation mit vergleichbar guter Wirksamkeit in Frage kommen.

Die neue Arbeitshypothese würde dementsprechend lauten, dass das Absetzen oder Umstellen des Trockenstellers eine schnelle Änderung des Resistenzstatus gegenüber Cloxacillin bewirkt. Folglich sollte sich das Auftreten von Cloxacillin-Resistenzen verringern, während vermutlich aufgrund des Selektionsdrucks neue Resistenzgene gegenüber dem neuen Wirkstoff verbreitet werden.

Der Resistenzstatus der Biofilme gegenüber Cloxacillin und Cefquinom sollte vor dem Umstellen des Trockenstellers mit Hilfe von kulturellen Untersuchungen wie in der vorliegenden Arbeit sowie mittels Metagenomanalysen erfasst werden. Im Idealfall können so alle bereits vorhandenen Resistenzgene und deren Häufigkeit erfasst werden. Nach dem Umstellen des Trockenstellers sollte eine zeitliche Analyse der Veränderung des Resistenzstatus durch weitere kulturelle und molekularbiologische Methoden stattfinden. Neben den oben genannten Methoden kommt auch hier die Quantifizierung ausgewählter Resistenzgene mittels RT-qPCR in Frage. Prominente Gene, die Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 4. Generation verleihen, sind zum Beispiel TEM-, SHV- und CTX-M-Gene (Cantón *et al.*, 2012).

10 Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen und Demonstrationen

Posterpräsentation „Milking machine biofilms: bacterial community composition and prevalence of antibiotic resistance“ auf FEMS Congress of European Microbiologists in Valencia, Spanien.

Am Projekt beteiligte Masterarbeiten:

Göpfert, Bettina. 2015. Korrelation der Bakteriendichte mit der Abundanz von Antibiotika-Resistenzgenen in Biofilmen einer landwirtschaftlichen Produktionsanlage. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät.

Savin, Mykhailo. 2016. Analyse der Abundanz von Antibiotikaresistenzen in Biofilmen einer Melkanlage. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät.

Tüffers, Sina. 2017. Experimente zur Bewertung der Übertragbarkeit von Antibiotikaresistenzen via horizontalem Gentransfer in Biofilmen. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät.

Kuhlmann, Laura. 2017. Nachweis der Übertragbarkeit von Antibiotikaresistenzen durch Melkanlagen-assoziierte Bakterien. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Landwirtschaftliche Fakultät.

11 Kurzfassung

In der vorliegenden Studie sollte der Zusammenhang zwischen einer erhöhten Zelldichte in Melkanlagen-Biofilmen und der vermehrten Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen über horizontalen Gentransfer überprüft werden. Hierfür wurden Tupferabstriche von verschiedenen Stellen innerhalb einer Melkanlage genommen und mit Hilfe einer Kombination aus kultivierungsgestützten und molekularbiologischen Verfahren untersucht. Zusätzlich wurden mit den gewonnenen antibiotikaresistenten Isolaten aus der Melkanlage Mating-Experimente durchgeführt, um die horizontale Übertragbarkeit der nachgewiesenen Resistenzgene *in vitro* zu überprüfen.

Die Auswahl der Stellen zur Tupferprobenahme erfolgte anhand von bisherigen Arbeiten, in denen bereits Stellen mit vermehrt auftretender Biofilmbildung in der untersuchten Melkanlage erfasst wurden. Die getesteten Antibiotika wurden aufgrund der Häufigkeit ihres Einsatzes in dem untersuchten Milchviehhaltungsbetrieb ausgewählt. Während die kultivierungsgestützten Methoden in der Arbeitsgruppe bereits etabliert waren, wurden verschiedene RT-qPCR-Reaktionen für den molekularbiologischen Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen neu etabliert. Insbesondere die PMA-Behandlung des Mastermixes vor dem Einsatz universeller Primer zum Nachweis der 16S rRNA-Gene erwies sich als geeignet zur Erzielung geringer Nachweisgrenzen durch Unterdrückung von Signalen in der Negativkontrolle.

In der vorliegenden Studie wurde ein klarer Zusammenhang zwischen dem therapeutischen und präventiven Einsatz der getesteten Wirkstoffe zur Behandlung der Milchkühe und dem Auftreten entsprechender Resistenzen bestätigt. Gegen alle vier getesteten Antibiotika Cloxacillin, Ampicillin, Penicillin und Tetracyclin wurden Keimzahlen resistenter Mikroorganismen kulturell ermittelt. Der molekularbiologische Nachweis der Antibiotikaresistenzen gestaltete sich aufgrund der hohen Vielfalt entsprechender Resistenzgene und -engruppen deutlich schwieriger. So wurden von den vier getesteten β -Lactamasegenen (*blaZ*, OXA-1, -2, und -10) lediglich OXA-2 Gene in den Tupfer-DNA-Extrakten der Melkbecherablagen als am stärksten besiedelten Ort der Melkanlage detektiert. Im Gegensatz dazu wurden *tetM*-Gene in den DNA-Extrakten aller Tupferprobenahmeorte detektiert. Insgesamt konnte weder molekularbiologisch noch kulturell ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Besiedelungsdichte und der Häufigkeit des Auftretens von Antibiotikaresistenzen festgestellt werden. Folglich spielen vermutlich weitere Faktoren neben der Besiedelungsdichte eine Rolle für die Verbreitung von Resistenzgenen innerhalb von Biofilmen.

Mit den zugewendeten Projektmitteln wurde eine zweijährige Doktorandenstelle finanziert. Zusätzlich wurden die Zuschüsse zur Anschaffung von Verbrauchsmaterial, insbesondere für die molekularbiologischen Verfahren, verwendet. Außerdem wurden die Kosten für die Teilnahme an einer internationalen Tagung in Valencia (Spanien) getragen, auf der die Ergebnisse des Projektes anhand einer Posterpräsentation vorgestellt wurden.

Englisch

The present study was conducted to test the interconnection between microbial cell density and appearance and horizontal transfer of antibiotic resistance genes in milking machine biofilms. Swab samples were taken from different parts of the milking machine and were investigated by a combination of cultivation and molecular methods including RT-qPCR detection of antibiotic resistance genes. Moreover, horizontal transferability of the detected antibiotic resistance genes was tested by *in vitro* mating experiments between resistant milking machine isolates and suitable sensitive recipients.

The sampling sites were chosen according to earlier studies which revealed parts of the milking machine where biofilm formation takes place. The antibiotics tested were chosen according to their frequency of use on the investigated farm. While the cultivation techniques were already well established in the laboratory, the molecular methods, especially RT-qPCR reactions for the detection of 16S rRNA and antibiotic resistance genes, were newly established in the present study. This included PMA-treatment of mastermixes prior to use of universal 16S rRNA gene primers to exclude false positive signals from negative controls, which resulted in improved detection limits.

The study showed a clear interconnection between the frequency of use of antibiotics in the investigated farm and the detection of antibiotic resistant biofilm inhabitants. Especially in the cultivation approach, bacterial counts were detected on agar media containing the four tested antibiotics cloxacillin, ampicillin, penicillin and tetracyclin. Cultivation counts were especially high on cloxacillin containing agar, an antibiotic used prophylactically at dry off. The molecular detection of antibiotic genes was difficult due to the high diversity of different resistance genes. While of the four tested β -lactamase genes (*blaZ*, OXA-1, -2, -10) only OXA-2 genes were detected only at the milking equipment retainers, *tetM* genes were detected in the DNA extracts of all swab samples. However, a clear relationship between biofilm cell density and frequency of appearance of antibiotic resistance genes could not be established. We concluded that additional factors must play a role in horizontal gene transfer frequency.

The financial resources received were used to finance a two-year PhD-position, to purchase consumables, especially for the molecular methods, and for the participation on an international conference in Valencia (Spain) where the results of the study were presented in a poster presentation.