# Charakterisierung von Gram-positiven Isolaten aus der Antarktis Forschungsstation Concordia, der Internationalen Raumstation (ISS) und türkischen Lebensmitteln bezüglich Antibiotikaresistenzen, Gentransfer und Biofilmbildung

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin
Katarzyna Schiwon

von der Fakultät III-Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss

| | |
|---|---|
| Vorsitzender: | Prof. Dr. Wolfgang Rotard |
| Berichter: | Prof. Dr. Ulrich Szewzyk |
| Berichterin: | PD Dr. Elisabeth Grohmann |
| Berichter: | PD Dr. Guido Werner |

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10.03.2011

Berlin 2011
D 83

*Für meinen Mann*

**Veröffentlichungen**

Borgo, F., Ricci, G., Arends, K., **Schiwon, K**., Grohmann, E. and Fortina, M.G. (2009) Evaluation of plasmid content and tetracycline resistance conjugative transfer in *Enterococcus italicus* strains of dairy origin. *Curr. Microbiol*. **59**(3): 261-266.

Fortina, M.G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P.L., Arends, K., **Schiwon, K**., Abajy, M.Y. and Grohmann, E. (2008) A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin*, E. italicus*. *Int. J. Food. Microbiol*. **123**(3): 204-211.

Ansari, M. I., **Schiwon, K.**, Malik, A. and Grohmann, E. (2011) Biofilm formation by environmental bacteria. *In* Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. Abdul Malik and Elisabeth Grohmann (eds.), Springer press, New York (in press).

**Schiwon, K**., Arends, K., Rogowski, K. M., Fürch, S., Prescha, K. and Grohmann, E. Comparison of antibiotic resistance, biofilm formation and conjugative transfer of *Staphylococcus* and *Enterococcus* isolates from two extreme confined habitats. *Microbial Ecology* (in preparation).

**Schiwon, K**., Arends, K. Knittel, I., Mende, L., Püngel, A., , Rosenlöcher, J., Kabak, B., Erginkaya, Z. and Grohmann, E. Molecular characterization of antibiotic resistant lactic acid bacteria from fermented dairy and meat products: the horizontal gene pool in Turkish dairy and meat products (in preparation).

Arends, K., **Schiwon, K**., Sakinc, T. and Hübner, J. Grohmann, E. GFP-labelled monitoring tools to quantify conjugative plasmid transfer between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* (submitted).

Ansari, M. I., Masood, F., Anjum, R., **Schiwon, K**., Grohmann, E. and Malik, A. Molecular detection of antibiotic resistance genes in bacteria isolated from different agricultural soils of India. *Applied Biochem. and Biotech.* (in preparation).

**Tagungsbeiträge:**

**I. Vorträge**

**Schiwon, K.** GFP based monitoring tools for isolation of new mobile genetic elements and assessment of conjugative plasmid transfer in biofilms. Vereinigung der Allgemeinen und Angewandten Mikrobiologie (VAAM), Bochum, 8.03-11.3.2009.

**II. Poster**

**Schiwon, K**., Arends, K., Prescha, K., Fürch, S., Rogowski, K. and Grohmann, E. Horizontal gene pool of Gram-positive pathogenic bacteria from ISS and CONCORDIA Station. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und Vereinigung der Allgemeinen und Angewandten Mikrobiologie (VAAM), Hannover, 28.03-31.3.2010.

Püngel, A., Rosenlöcher, J., Mende, L., Arends, K., **Schiwon, K.** and Grohmann, E. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy and meat products. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und Vereinigung der Allgemeinen und Angewandten Mikrobiologie (VAAM), Hannover, 28.03-31.3.2010.

**Schiwon K**., Arends K. and Grohmann E. GFP based monitoring tools for isolation of new mobile genetic elements and assessment of conjugative plasmid transfer in biofilms. International Symposium on Plasmid Biology at Gdansk, Poland, 30.08-04.09.2008.

Van der Auwera G.A, Arends K., De Boever P., Leplae R., Leys N., Lima Mendez G., Mergeay M., Minet O., **Schiwon K.,** Smeesters P., Timmery S., Toussaint A., Van Houdt R., Grohmann E., Van Melderen L. and Mahillon J. MISSEX: Microbial ISS gene Exchange. 5th ISLSWG International Workshop on Space Microbiology, Tokyo, Japan, 19.09-21.09.2007.

Abajy, M. Y., Salih, R., Saleh, M., **Schiwon, K**., Hanssen, A.-M., Keller, W. and Grohmann, E. The conjugative plasmid pIP501 from *Streptococcus agalactiae* encodes two putative ATPases, ORF5 and ORF10 with similarities to type IV secretion system components. 4th Conference on Functional Genomics of Gram-Positive Microorganisms, in Tirrenia, Pisa, Italy, 24.06-28.6.2007.

Arends, K., Söllü, C., Çelik, E.-K., Kopec, J., **Schiwon, K**., Abajy, M. Y. and Grohmann, E. ORF7-a specialized lytic transglycosylase (SLT) from gram-positive bacteria, encoded by the type IV secretion like system from the broad-host-range plasmid pIP501. International Symposium on Plasmid Biology at Fallen Leaf Lake, South Lake Tahoe, California, USA, 23.09-27.9. 2006.

Arends, K., Kopec, J., Söllü, C., **Schiwon, K**., Çelik, E.-K., Keller, W. and Grohmann, E. The type IV secretion-like system from the broad-host-range plasmid pIP501 encodes an active lytic transglycosylase. Vereinigung der Allgemeinen und Angewandten Mikrobiologie (VAAM), Jena, 19.03-22.3.2006.

Arends, A., Kopec, J., Söllü, C., **Schiwon, K.**, Keller, W. and Grohmann, E. Orf7 encoded by the conjugative plasmid pIP501 shows lytic transglycosylase activity. Vereinigung der Allgemeinen und Angewandten Mikrobiologie (VAAM), Jena, 19.03-22.3.2006.

Abajy, M. Y., **Schiwon, K.**, Szewzyk, U. and Grohmann, E. Protein – Protein interaction map of the type IV secretion-like system encoded by the broad-host-range enterococcal plasmid pIP501. Vereinigung der Allgemeinen und Angewandten Mikrobiologie (VAAM), Jena, 19.03-22.3.2006.

# DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Elisabeth Grohmann für die Überlassung des Themas sowie die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, Ihre fortwährende Unterstützung und Motivation.

Beim Herrn Prof. Dr. Ulrich Szewzyk, dem Leiter der Fachgruppe Umweltmikrobiologie der Technischen Universität Berlin, bedanke ich mich ganz herzlich für seine Hilfestellungen und Unterstützung während dieser Arbeit.

Sehr dankbar bin ich PD Dr. Guido Werner für die Möglichkeit die S1-Nuclease Plasmid Analyse am Robert Koch-Institut in Wernigerode durchführen zu können und die Übernahme des Drittgutachtens. Carola Fleige danke ich ganz herzlich für die Betreuung und Durchführung der Versuche.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Karsten Arends für die sehr gute gemeinsame Zeit im Labor, auf Konferenzen und auch Geburtstagen sowie seine Unterstützung und Motivation bedanken. Bei Dipl.-Ing. Christine Bohn bedanke ich mich ganz herzlich für die praktische Hilfe, Motivation und gute Zusammenarbeit. Ein großer Dank gilt auch Dipl.-Ing. Stefanie Manzei, Dipl.-Ing. Bertram Schmidt und Dipl.-Ing. Rosemarie Röder für Ihre Hilfsbereitschaft und aufmunternden Gespräche. Bei allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern bedanke ich mich ganz herzlich für Ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Danken möchte ich auch Dipl.-Biol. Katrin Prescha, Dipl.-Ing. Svea Fürch, Dipl.-Biol. Sandra Hahn, B. Sc. Anja Will, B. Sc. Katja-Marie Rogowski, B. Sc. Isabel Knittel, M. Sc. Julia Rosenlöcher, Linda Mende und B. Sc. Anita Püngel, da Sie im Rahmen Ihrer Diplom-, Bachelor- und Praxisarbeiten als auch studentische Hilfskraft zu dieser Arbeit im Wesentlichen beigetragen haben.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, meinen Brüdern und meiner Freundin Stefanie Schumann, dass sie für mich da waren und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Meinem Mann Michael danke ich von ganzem Herzen für sein Verständnis für die langen Arbeitstage und Wochenenden, seine Geduld und sein Zuspruch während dieser Zeit.

# ZUSAMMENFASSUNG

Die ISS und Concordia Forschungsstation sind geschlossene und isolierte Habitate inmitten einer extremen und lebensfeindlichen Umgebung. Aufgrund der extremen Umweltbedingungen verändert sich die Mikroflora des Menschen und der Station, so dass es zu mikrobiellen Kontaminationen in diesen „Container" Systemen kommt, die die Gesundheit der Crew gefährden.
Die in dieser Arbeit untersuchten 113 Isolate der ISS und Concordia, gehören den Gattungen *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* und *Paenibacillus* an. In 62% der Stämme konnten Resistenzen gegen ein oder mehrere Antibiotika nachgewiesen werden. In 43% der Stämme wurden die entsprechenden Resistenzgene detektiert. Dabei konnte das Methicillin-Resistenzgen *mec*A in einem Concordia *Staphylococcus* Isolat neben zwei weiteren Resistenzgenen detektiert werden. Plasmide konnten in 74% der Stämme nachgewiesen werden. In acht der *E. faecalis* Stämme wurden Plasmide detektiert, die ca. 130 kb groß sind. Relaxase- und Transfergene aus Plasmiden Gram-positiver Bakterien, wie pIP501, pRE25, pSK41 und pGO1 wurden in 58% der Isolate detektiert. Die meisten pSK41 homologen Transfergene wurden in Isolaten der ISS, die überwiegend zu den Koagulase-negativen *Staphylococcus* Spezies gehören, nachgewiesen. Für drei dieser Stämme wurden in Gentransferversuchen konjugative Elemente bestätigt. Auch aus zwei Concordia Stämmen konnten Resistenzgene erfolgreich übertragen werden, bei einem davon durch Mobilisierung. Sieben der Isolate konnten in Monospezies Biofilmreaktoren Biofilme ausbilden und im Multispezies Biofilmreaktor konnten fünf Stämme zusammen Biofilm ausbilden. Der Gentransfer in Biofilmen konnte mit Hilfe eines klinischen Isolats und GFP-markierten mobilisierbaren Plasmiden bestätigt werden. Die Transfer- und Resistenzgene wurden überwiegend in den *Staphylococcus* und *E. facalis* Isolaten, die nosokomiale Krankheitserreger sind, detektiert. Bei immungeschwächten Personen und Krankenhauspatienten kann durch diese ein Infektionsrisiko entstehen. Die vorhandenen Transfergene können zur Entstehung multiresistenter Keime beitragen.
Milchsäurebakterien (LAB) finden ihre Verwendung in der Herstellung von fermentierten Lebensmitteln und als Probiotika. Sie sind auch Bewohner des menschlichen und tierischen Magen-Darm- und Urogenital-Traktes.
In dieser Arbeit wurden 100 Antibiotika resistente LAB Isolate aus traditionell hergestellten Milch- und Fleischprodukten auf Resistenzgene, Transfergene und Plasmide untersucht. Durch 16S rDNA Sequenzierung konnten 33 Stämme phylogenetisch eingeordnet und als *Pediococcus* (19), *Lactobacillus* (13) und als *Enterococcus durans* (1) identifiziert werden. In 84% der LAB Stämme konnten Relaxasegene detektiert werden. In 29% der Stämme konnten zwei oder mehr (bis zu acht) Transfergene unterschiedlicher Plasmide aus Gram-positiven Bakterien nachgewiesen werden. Drei *Pediococcus pentosaceus* Isolate konnten das mobilisierbare GFP-markierte Plasmid über Gattungsgrenzen übertragen. Damit konnte bewiesen werden, dass diese Stämme mindestens ein konjugatives Element besitzen. In 23% der Stämme konnten bis zu fünf große Plasmide detektiert werden.
Diese Ergebnisse zeigten, dass Milchsäurebakterien aus fermentierten Lebensmitteln konjugative Elemente unterschiedlicher Gram-positiver Bakterien besitzen und Resistenzgene weitergeben können. Die verwendeten Starterkulturen sollten regelmäßig kontrolliert werden, um die Entwicklung multiresistenter Keime in Lebensmitteln zu unterbinden.

# ABSTRACT

The ISS and Concordia Research Station are confined and isolated habitats in extreme and hostile environments. Due to these extreme environmental conditions the human and habitat microflora alter resulting in microbial contamination in these confined stations and health risk for the crew.
In this work 113 isolates from the ISS and Concordia research station belonging to the genus *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* and *Paenibacillus* were investigated. In 62% of the isolates we could detect resistance to one or more antibiotics. In 43% of the strains the corresponding resistance genes were found. The methicillin resistance gene *mec*A and two other antibiotic resistance genes could be detected in one Concordia *Staphylococcus* strain. Plasmids are present in 74% of the isolates. Eight *E. faecalis* strains harbour plasmids of about 130 kb. Relaxase and transfer genes encoded on plasmids from gram positive bacteria like pIP501, pRE25, pSK41 and pGO1 were detected in 58% of the strains. Most of pSK41 homologous transfer genes were detected in ISS isolates predominantly belonging to the coagulase negative *Staphylococcus* species. In gene transfer experiments we proved that three of these strains contain conjugative elements. Two Concordia isolates were able to transfer resistance genes to other species, one of them by mobilization.
In single species biofilm reactors seven isolates were able to form biofilms and five Isolates could form together a biofilm in a multi species biofilm reactor. Gene transfer with a clinical isolate as helper strain and GFP-labeled mobilizable plasmids could be demonstrated.
Transfer and resistance genes were predominantly detected in *Staphylococcus* and *E. faecalis* isolates that are also nosocomial pathogens. In immunocompromised persons and hospital patients risk of infection occurs by these pathogens. The detected transfer genes could contribute to emergence of multi resistant pathogens.
Lactic acid bacteria (LAB) are widely used in the production of fermented food and as probiotics. They are also natural inhabitants of the intestinal tract of humans and of many animals.
In this work 100 antibiotic resistant LAB isolates from traditional Turkish dairy and meat products were screened for resistance and transfer genes and the presence of plasmids. 33 LAB isolates were phylogenetically identified by 16S rDNA sequencing as *Pediococcus* (19), *Lactobacillus* (13) and *Enterococcus durans* (1). In 84% LAB strains we could detect relaxase genes. 29% of the LAB strains contain two or more (up to eight) transfer genes from plasmids of different gram positive bacteria. Three *Pediococcus pentosaceus* isolates could mobilize a GFP-labeled plasmid over genus boundaries. Thereby we proved that these strains contain at least one conjugative element. In 23% LAB strains we detected more than five plasmids.
This results show that LAB from fermented food contain conjugative elements from various gram positive bacteria and are able to transfer antibiotic resistance genes. Starter cultures should be regularly controlled to avoid the development of multi resistant pathogens in food.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|---|
| Acc. No. | Accession Nummer |
| Amp | Ampicillin |
| Aqua bidest. | bidestilliertes Wasser |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bm | Bleomycin |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*) |
| CA-MRSA | *community-associated* MRSA |
| Cat | Chloramphenicol |
| cfu | *colony-forming units* |
| CSPD | Disodium 3-(4-methoxyspiro {l,2-dioxetane-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1$^{3,7}$]Decan}-4-yl) Phenylphosphat |
| ddNTPs | Didesoxyribonukleosidtriphosphat(e) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphat(e) |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH |
| dtr | *DNA transfer and replication* |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| Erm | Erythromycin |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| Fus | Fusidinsäure |
| fw | *forward* |
| g | Erdbeschleunigung |
| Gent | Gentamycin |
| HA-MRSA | *health care-associated* MRSA |
| Inc | Inkompatibilitätsgruppe |
| Kan | Kanamycin |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilo Dalton |
| LB | *Luria Bertani broth* |
| M | Molar |
| MCS | *multiple cloning site* |
| Mec | Methicillin |
| MIC | *minimal inhibitory concentration* |
| MLS$^R$ | Resistenz gegen Antibiotika der Makrolid-Linkosamid-Streptogramin B-Gruppe |
| *mob* | Mobilisierung |
| mpf-Komplex | Kreuzungskanal (*mating pair formation*) |
| MRSA | Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* |
| MRSE | Methicillin resistente *Staphylococcus epidermidis* |
| MSSE | Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* |
| *Nick* | stellenspezifische Hydrolyse innerhalb des *oriT* eines DNA-Stranges durch die Relaxase |
| Nm | Neomycin |
| $OD_{600}$ | optische Dichte bei 600 nm |

| | |
|---|---|
| *orf* | offener Leserahmen (*open reading frame)* |
| *oriT* | Transferursprung (*origin of transfer)* |
| PBS | Phosphat *buffered saline* |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PFGE | *pulsed-field gel electrophoresis* |
| *Rev* | *reverse* |
| Rif | Rifampicin |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*) |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Spec | Spektinomycin |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| Strep | Streptomycin |
| subsp. | Subspezies |
| T4SLS | Typ IV Sekretions- ähnliches System |
| T4SS | Typ IV Sekretionssystem |
| TAE | TRIS/Acetat/EDTA |
| *Taq* | *Thermus aquaticus* |
| TBE | TRIS/Borsäure/EDTA |
| T-DNA | Transfer-DNA |
| TE | TRIS/EDTA |
| TELT | TRIS/EDTA/LiCl/Triton X-100-Puffer |
| Tet | Tetracyclin |
| TMH | Transmembranhelix |
| *tra* | Transfer |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan |
| U | *Unit* |
| UV | ultraviolettes Licht |
| Van | Vancomycin |
| *vir*/Vir | *virulence* |
| VRSA | Vancomycin resistente *Staphylococcus aureus* |
| WGA | *wheat germ agglutinin* |

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Konjugation bei Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien (Clewell, 2005) ..... 6
Abb. 1.2: Modell des T4SS aus *A. tumefaciens* ..... 8
Abb. 1.3: Zellwand Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien ..... 11
Abb. 1.4: Plasmidkarte des pIP501 (Kurenbach, 2004) ..... 12
Abb. 1.5: Arbeitsmodell des T4SLS von pIP501 aus *E. faecalis* nach Arends (2010) ..... 13
Abb. 2.1: Aufbau der Biofilmreaktoren ..... 52
Abb. 2.2: Schematischer Aufbau eines Southern Blots ..... 61
Abb. 3.1: Plasmidisolierung aus den ISS und Concordia Isolaten 61-69 ..... 64
Abb. 3.2: Plasmidisolierung aus *E. faecalis* Stämmen Nr. 69-80 und T9 ..... 65
Abb. 3.3: S1 Nuklease Plasmid-Analyse aus Enterokokken mittels PFGE ..... 65
Abb. 3.4: Plasmidisolierung aus *Staphylococcus* Stämmen 111-130 ..... 66
Abb. 3.5: Plasmidisolierung aus *S. epidermidis* 130 ..... 67
Abb. 3.6: Plasmidisolierung aus *Staphylococcus* Stämmen ..... 68
Abb. 3.7: Biofilmreaktoren nach 10 Tagen Inkubation ..... 98
Abb. 3.8: Zweispezies Biofilmreaktor mit *S. aureus* 45 und *B. cereus s.l.* 1 ..... 100
Abb. 3.9: Mikroskopische Aufnahme von *B. cereus s.l.* 1 und *S. aureus* 45 ..... 100
Abb. 3.10: Multispezies Biofilmreaktor ..... 101
Abb. 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des *S. epidermidis* 55 Biofilms nach Färbung mit WGA (grün) und PI (rot) ..... 102
Abb. 3.12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des *S. aureus* 67 Biofilms nach Färbung mit WGA (grün) und PI (rot) ..... 102
Abb. 3.13: CLSM Aufnahme des *S. aureus* 67 Biofilms nach Färbung mit WGA (grün) und PI (rot) ..... 103
Abb. 3.14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des *S. hominis* subsp. *hominis* 110 Biofilms nach Färbung mit WGA (grün) und PI (rot) ..... 103
Abb. 3.15: REM-Aufnahmen einer Glaskugel aus dem Biofilmreaktor mit *S. aureus* 67. 104
Abb. 3.16: REM-Aufnahmen einer Glaskugel aus dem Biofilmreaktor mit *S. epidermidis* 130 ..... 104
Abb. 3.17: Beispiel der $O_2$-Messung mit einem nicht-invasiven Sensor (PreSens) ..... 105
Abb. 3.18: $O_2$-Sättigung während des 11-tägigen Reaktorlaufs ..... 106
Abb. 3.19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *E. faecalis* JH2-2 (pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP) Transkonjuganten nach Induktion mit Nisin (100 ng·mL$^{-1}$) ..... 109
Abb. 3.20: Nachweis der *van*C1/2 Resistenzgene in den LAB Stämmen mittels Southern Hybridisierung ..... 114
Abb. 3.21: Plasmidisolierung aus ausgewählten LAB Stämmen ..... 115
Abb. 3.22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *L. lactis* UW4127RF (pVA-GFP) nach Induktion mit Nisin (100 ng·mL$^{-1}$) ..... 118
Abb. 4.1: Alignment der *oriT nick* Regionen der RSF1010 *oriT* Familie nach Grohmann *et al.* (2003) ..... 141

# TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Verwendete ISS und Concordia Isolate ..... 37
Tab. 2.1: Fortsetzung ..... 38
Tab. 2.1: Fortsetzung ..... 39
Tab. 2.2: Milchsäurebakterien aus türkischen Lebensmitteln ..... 39
Tab. 2.2: Fortsetzung ..... 40
Tab. 2.3: Referenzen für das Screening auf Resistenz- und Transfergene ..... 40
Tab. 2.3: Fortsetzung ..... 41
Tab. 2.4: Weitere verwendete Bakterienstämme ..... 41
Tab. 2.5: Verwendete Plasmide ..... 41
Tab. 2.6: Für die Detektion von Antibiotika-Resistenzgenen verwendete Primerpaare . 42
Tab. 2.7: Weitere verwendete Primerpaare ..... 43
Tab. 2.8: Für die Amplifizierung von Transfergenen verwendete Primerpaare ..... 43
Tab. 2.9: Proben für die Southern Hybridisierung ..... 62
Tab. 3.1: Ermittelte Plasmidgrößen ..... 66
Tab. 3.2: Antibiotika-Resistenzprofile der ISS und Concordia Isolate ..... 69
Tab. 3.2: Fortsetzung ..... 70
Tab. 3.3: Binderegionen der verwendeten Primer ..... 71
Tab. 3.3: Fortsetzung ..... 72
Tab. 3.3: Fortsetzung ..... 73
Tab. 3.3: Fortsetzung ..... 74
Tab. 3.4: Antibiotika-Resistenzgene in den ISS und Concordia Isolaten ..... 75
Tab. 3.5: Binderegionen der Relaxase-Primer ..... 77
Tab. 3.5: Fortsetzung ..... 78
Tab. 3.6: Binderegionen der Primer für die Transfergene ..... 78
Tab. 3.6: Fortsetzung ..... 79
Tab. 3.7: Transfer- und Antibiotika-Resistenzgene in den ISS und Concordia Stämmen 80
Tab. 3.7: Fortsetzung ..... 81
Tab. 3.8: Ausgewählte Stämme für Kreuzungsexperimente ..... 87
Tab. 3.9: Biofilm-Screening der Stämme 1-40 ..... 92
Tab. 3.10: Biofilm-Screening der Stämme 41-60 mit Glukose-Zusatz (1%) ..... 93
Tab. 3.11: Biofilm-Screening der Stämme 41-60 ohne Glukose-Zusatz ..... 93
Tab. 3.12: Biofilm-Screening der Stämme 61-80 ..... 94
Tab. 3.13: Biofilm-Screening der Stämme 81-110 ..... 94
Tab. 3.14: Biofilm-Screening der Stämme 111-130 ..... 95
Tab. 3.15: Biofilm-Screening der Stämme 131-137 ..... 95
Tab. 3.16: Ausgewählte Stämme für den Biofilmreaktor ..... 96
Tab. 3.17: Verwendete Antibiotika ..... 101
Tab. 3.18: Binderegionen der LAB-spezifischen Primer ..... 111
Tab. 3.18: Fortsetzung ..... 112
Tab. 3.19: Resistenz- und Transfergene in den LAB Stämmen ..... 112
Tab. 3.20: Plasmide in Milchsäurebakterien ..... 116

Tab. 3.20: Fortsetzung ..... 117
Tab. 3.21: Mobilisierungsraten der LAB Stämme ..... 117
Tab. 3.22: Identifizierung der LAB Stämme ..... 119

# INHALTSVERZEICHNIS


**1 EINLEITUNG ..... 1**

**1.1 Antibiotikaresistenzen und ihre Verbreitung ..... 1**
**1.2 Der horizontale Gentransfer ..... 3**
**1.3 Der Mechanismus der Konjugation ..... 4**
**1.4 Typ IV Sekretionssysteme (T4SS) ..... 6**
**1.5 Das T4S-ähnliche System (T4SLS) des konjugativen Plasmids pIP501 ..... 10**

1.5.1 Die bakterielle Zellwand ..... 10
1.5.2 Das Plasmid pIP501 ..... 11
1.5.3 Das T4SLS Modell des Plasmids pIP501 ..... 12

**1.6 Mobile genetische Elemente ..... 14**

1.6.1 Plasmide ..... 15

**1.7 Gram-positive Bakterien und deren Plasmide ..... 16**

1.7.1 *Staphylococcus* Spezies ..... 16
1.7.2 *Enterococcus* Spezies ..... 19
1.7.3 *Bacillus* Spezies ..... 22

**1.8 Biofilme ..... 23**
**1.9 Die ISS und Concordia Station ..... 26**
**1.10 Milchsäurebakterien ..... 28**
**1.11 Zielsetzung ..... 30**

**2 MATERIAL UND METHODEN ..... 34**

**2.1 Material ..... 34**

2.1.1 Chemikalien, *Kits* und Hilfsmittel ..... 34
2.1.2 Enzyme, Antikörper und Standards ..... 35
2.1.3 Antibiotika-Plättchen für Agardiffusionstest ..... 36
2.1.4 Geräte ..... 36
2.1.5 Mikroorganismen ..... 37
2.1.6 Plasmide ..... 41
2.1.7 Synthetische Oligonukleotide ..... 42
2.1.8 Verwendete PCR-Programme ..... 44
2.1.9 Nährmedien und Lösungen ..... 45

2.1.9.1 Nährmedien ..... 45
2.1.9.2 Allgemeine Lösungen ..... 45
2.1.9.3 Puffer für die Plasmidisolierung aus *Bacillus*, *Paenibacillus* und *Staphylococcus* Stämmen ..... 46
2.1.9.4 Puffer für die Plasmidisolierung aus Enterokokken ..... 46
2.1.9.5 Puffer für die Plasmidisolierung aus Milchsäurebakterien ..... 47
2.1.9.6 Puffer und Lösungen für den Southern Blot ..... 47

**2.2 Methoden ..... 49**

2.2.1 Mikrobiologische Methoden ..... 49
2.2.1.1 Anzucht von *E. coli, Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* und LAB Stämmen in Flüssigmedium ..... 49
2.2.1.2 Kultivierung für die Stammsammlung ..... 49
2.2.1.3 Herstellung von Zell-Lysaten als Matrize für die PCR ..... 49
2.2.1.4 Antibiotika-Resistenztest mittels Agardiffusion ..... 49
2.2.1.5 Resistenztest auf Festmedien ..... 50
2.2.1.6 Triparentale Kreuzungen auf halbfesten Oberflächen ..... 50
2.2.1.7 Biparentale Kreuzungen auf halbfesten Oberflächen ..... 51
2.2.1.8 Screening auf Biofilmbildner mittels Mikrotiterplatten-Test ..... 51
2.2.1.9 Biofilmreaktoren ..... 51
2.2.1.10 Lektinfärbung und Nachweis über Fluoreszenzmikroskopie ..... 53
2.2.1.11 Probenaufbereitung für die Raster-Elektronenmikroskopie (REM) ..... 53
2.2.2 Molekularbiologische Methoden ..... 54
2.2.2.1 Plasmidisolierung aus *Bacillus* und *Paenibacillus* Spezies ..... 54
2.2.2.2 Plasmidisolierung aus Staphylokokken ..... 55
2.2.2.3 Plasmidisolierung aus Enterokokken ..... 55
2.2.2.4 S1 Nuklease-Behandlung von Enterokokken DNA ..... 56
2.2.2.5 Plasmidisolierung aus Milchsäurebakterien ..... 57
2.2.2.6 Gesamt-DNA Isolierung ..... 58
2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese ..... 58
2.2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) ..... 59
2.2.2.9 Digoxigenin (DIG)-Markierung von Oligonukleotiden mittels PCR ..... 60
2.2.2.10 Southern Blot ..... 60
**3 ERGEBNISSE ..... 63**
**3.1 Molekulare Charakterisierung der ISS und Concordia Isolate ..... 63**
3.1.1 Plasmidisolierung aus den bakteriellen Isolaten ..... 63
3.1.2 Antibiotika-Resistenztest mittels Agardiffusion ..... 69
3.1.3 Untersuchung der Isolate auf Antibiotika-Resistenzgene mittels PCR ..... 71
3.1.4 Untersuchung der Isolate auf Transfergene mittels PCR ..... 77
3.1.5 Zusammenfassung der erhaltenen Daten ..... 82
3.1.6 Horizontale Gentransfer Studien ..... 87
3.1.6.1 Biparentale Kreuzungsexperimente ..... 88
3.1.6.2 Triparentale Kreuzungsexperimente ..... 90
**3.2 Biofilme ..... 91**
3.2.1 Biofilm-Screening ..... 91
3.2.2 Monospezies Biofilmreaktoren ..... 95
3.2.2.1 Biofilmreaktoren mit *Bacillus* Stämmen ..... 96
3.2.2.2 Biofilmreaktoren mit *Staphylococcus* Stämmen ..... 97
3.2.2.3 Biofilmreaktoren mit *Enterococcus* Stämmen ..... 99
3.2.3 Zweispezies Biofilmreaktor ..... 99
3.2.4 Multispezies Biofilmreaktor ..... 100
3.2.5 Detektion von Biofilmen mittels Lektinfärbung ..... 101

3.2.6 Raster-Elektronenmikroskopie (REM) ..... 103
3.2.7 Sauerstoffmessung im Biofilmreaktor ..... 105
3.2.8 Gentransferstudien im Biofilmreaktor ..... 107

**3.3 Molekulare Charakterisierung von Antibiotika resistenten Milchsäurebakterien aus Milch- und Fleischprodukten ..... 110**

3.3.1 Untersuchung der Milchsäurebakterien auf Resistenz- und Transfergene ..... 111
3.3.2 Plasmidisolierung aus Milchsäurebakterien ..... 114
3.3.3 Plasmidmobilisierung ..... 117
3.3.4 Identifizierung der LAB Stämme mittels 16S rDNA-Sequenzierung ..... 118

**4 DISKUSSION ..... 125**

**4.1 Mobile genetische Elemente in bakteriellen ISS und Concordia Isolaten ..... 125**

4.1.1 Antibiotikaresistenzen und Resistenzdeterminanten ..... 127
4.1.2 Plasmide und Transfergene in den ISS und Concordia Isolaten ..... 134
4.1.3 Konjugation und Mobilisierung von Plasmiden aus ISS und Concordia Isolaten ..... 139

**4.2 Biofilme ..... 144**
**4.3 Milchsäurebakterien ..... 150**

4.3.1 *Pediococcus* und *Enterococcus* Spezies ..... 150
4.3.2 *Lactobacillus* Spezies ..... 155

**5 AUSBLICK ..... 158**

**5.1 ISS und Concordia Isolate ..... 158**

5.1.1 Biofilme ..... 161

**5.2 Milchsäurebakterien ..... 163**

**6 LITERATUR ..... 165**
**7 ANHANG ..... 187**

**7.1 DNA-Größenstandards ..... 187**
**7.2 LAB Stammsammlung ..... 188**
**7.3 Detektierte Plasmide in den ISS und Concordia Isolaten ..... 191**
**7.4 Agardiffusionstest der ISS und Concordia Isolate ..... 192**

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Antibiotikaresistenzen und ihre Verbreitung

Die Entdeckung der Antibiotika und deren klinischen Potentials in der Bekämpfung bakterieller Infektionen beim Menschen repräsentieren einen wichtigen Umbruch in der Medizin. Infektionen, wie rheumatisches Fieber, Syphilis und bakterielle Pneumonien konnten wenige Jahre nach der Entdeckung des Penicillins 1928 erfolgreich behandelt werden. Die Verfügbarkeit der Antibiotika ermöglichte neuartige medizinische Eingriffe, die ein hohes Infektionsrisiko bergen, wie Organtransplantationen, Bypässe und andere invasive chirurgische Eingriffe. Unglücklicherweise entwickelten sich bei jedem neu eingeführten Antibiotikum innerhalb weniger Jahre resistente Stämme. Die erste Aufzeichnung über Resistenzen erfolgte in den frühen 40er Jahren vor dem ersten klinischen Einsatz des Penicillins.

Zu diesen Resistenzen führen der sorglose Umgang mit Antibiotika und der unnötige Einsatz dieser im klinischen wie landwirtschaftlichen Bereich. Der größte Verbrauch an Antibiotika weltweit erfolgt in der Landwirtschaft. Diese werden zur Behandlung von Infektionskrankheiten bei Tieren, als Futterzusatzmittel (in der EU als Mastfördermittel seit 2006 verboten), als Pflanzenschutz in der Getreide- und Obstproduktion sowie in der Aquakultur verwendet. Menschen sind somit den Antibiotika resistenten Mikroorganismen durch Lebensmittel und durch den Eintrag der Mikroorganismen in die Umwelt ausgesetzt. Vor allem durch die Ausscheidungen von Mensch und Tier gelangen Antibiotika und Antibiotika resistente Bakterien in die Umwelt (Wright, 2010; Silbergeld *et al*., 2008; Davies, 2007; Clewell, 2005).

Sensitive Bakterien können Resistenzen durch Mutationen erlangen, die dann an die Nachkommenschaft weitergegeben werden und durch den horizontalen Gentransfer (HGT), der zwischen verschiedenen Bakterien stattfinden kann. Mutationen sind eher seltene Ereignisse und erfolgen mit einer Mutationsrate von $10^{-7}$ bis $10^{-10}$, so dass der Hauptmechanismus der Resistenzweitergabe der HGT ist. Bis zum heutigen Datum entwickeln sich multiresistente Krankheitserreger, die im Extremfall nicht mehr therapierbar sind. Zu den wichtigen multiresistenten nosokomialen Pathogenen zählen Gram-negative (G-) Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* sowie Gram-positive (G+) Bakterien, wie

Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin resistente *Enterococcus* Spezies (VRE). Hauptsächlich in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen stellen multiresistente Keime ein großes Problem dar. Diese können durch direkten Kontakt mit infizierten Personen, dem Pflegepersonal, kontaminierten medizinischen Geräten sowie durch unzureichende Hygiene übertragen werden. Vor allem die Krankenhausumgebung bietet ein besonderes Habitat für die Entstehung weiterer multiresistenter Keime, denn hier kommen viele verschiedene Bakterien miteinander in Kontakt, die hauptsächlich von den Patienten sowie dem Pflegepersonal selbst stammen oder durch die Besucher eingebracht wurden (Ferguson, 2009; Mulvey and Simor, 2009).

Prinzipiell lassen sich vier Mechanismen der bakteriellen Antibiotikaresistenz unterscheiden (Mulvey and Simor, 2009):

- Die Affinität für das Antibiotikum wird durch Modifikation der Zielstruktur reduziert. Beispiel hierfür ist das Penicillin-Bindeprotein 2a (PBP2a), das in MRSA Stämmen vorkommt und eine geringere Affinität zu β-Lactam-Antibiotika aufweist. Somit sind MRSA Stämme gegen alle β-Lactam-Antibiotika resistent.
- Die Konzentration des Antibiotikums wird durch eine Permeabilitätsänderung der Membran oder aktiven Transport aus der Zelle heraus vermindert.
- Eine enzymatische Inaktivierung des Wirkstoffes wird durch hydrolytische Spaltung oder enzymatische Modifikation an funktionellen Gruppen erreicht. Beispiele dafür sind β-Laktamasen oder Transferasen, deren Angriffsorte die Aminoglykosid-Antibiotika sind.
- Übertragung von Resistenzdeterminanten durch den horizontalen Gentransfer (Grohmann *et al*., 2003).

Die meisten der verwendeten antimikrobiellen Substanzen sind aus Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen, wie Pilzen und Actinomyceten abgeleitet. Die Produzenten dieser Stoffe verfügen über effektive Abwehrmechanismen, um sich selbst zu schützen. Diese Abwehrmechanismen können aber auch andere Funktionen einnehmen, wie Zellentgiftung und Signaltransport. Die Resistenzmechanismen der Krankheitserreger existieren auch in den jeweiligen Produzenten, so dass die Krankheitserreger diese Abwehrmechanismen wahrscheinlich durch den horizontalen Gentransfer erworben haben (Martinez *et al*., 2009; Grohmann *et al*., 2003).

## 1.2 Der horizontale Gentransfer

Der HGT bezeichnet die Übertragung genetischen Materials zwischen verschiedenen vegetativen Zellen, die nicht der gleichen Spezies angehören müssen und unterscheidet sich dadurch vom vertikalen Gentransfer, bei dem die Weitergabe von Erbmaterial auf die Nachkommen der gleichen Art beschränkt ist. Der HGT wurde nicht nur zwischen Bakterien nachgewiesen, sondern konnte auch zwischen Archeabakterien und Bakterien (Dodsworth *et al*., 2010) sowie zwischen Bakterien und Eukaryoten beobachtet werden (Hotopp *et al.,* 2007). Zu den Mechanismen des HGT zählen die Transduktion, die Transformation, die Konjugation und die Transposition (konjugative Transposons). Die Konjugation wird im Kapitel 1.3 beschrieben.

**Transduktion**

Als Transduktion wird die Übertragung von DNA-Fragmenten zwischen zwei Bakterien durch Bakteriophagen bezeichnet. Bei diesem Prozess werden bei der Phagenreplikation Abschnitte des Wirtszellgenoms in Viruspartikel verpackt und auf nachfolgend infizierte Bakterien übertragen. Diese aufgenommenen Gene können fester Bestandteil des Phagengenoms werden. Der durch Phagen induzierte Gentransfer ist generell auf einen sehr engen Wirtsbereich (Bakterienart und Gattung) beschränkt. Mobile *S. aureus* Pathogenitätsinseln (SaPI), die das Toxische-Schock-Syndrom-Toxin (TSST) und andere Superantigene kodieren, können durch unterschiedliche temperente Bakteriophagen ausgeschnitten, repliziert, in phagenähnliche Partikel verpackt und transferiert werden. Chen und Novick (2009) konnten zeigen, dass SaPI durch Bakteriophagen sogar auf *Listeria monocytogenes* übertragen werden können. Auch Toxin-Gene des Diphtherie-Erregers *Corynebacterium diphtheriae*, des Botulismus-Erregers *Clostridium botulinum* oder des Cholera-Erregers *Vibrio cholerae* sind im Genom von temperenten Phagen kodiert, die in die entsprechenden bakteriellen Genome integriert sind (Brüssow *et al*., 2004).

**Transformation**

Die Transformation ist ein Vorgang bei dem freie DNA durch Bakterien aufgenommen und in das bakterielle Genom integriert wird. Bakterien, die in der Lage sind, DNA-Moleküle aufzunehmen und transformiert zu werden, werden als kompetent bezeichnet. Nicht alle Bakterien besitzen diese Fähigkeit, es sind aber mehr als 40 Spezies bekannt, die natürlich kompetent sind. Bei den meisten natürlich transformierbaren Bakterien

(Bsp.: *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria* sp., *Haemophilus influenzae*) ist die Kompetenz reguliert. Spezielle Proteine spielen bei der Kompetenzentwicklung sowie Aufnahme und Prozessierung der DNA eine Rolle. Im Gegensatz zu Konjugation und Transduktion wird der DNA Transfer durch natürliche Transformation von der Rezipientenzelle initiiert (Johnsborg *et al*., 2007; Chen and Dubnau, 2004). In der Gentechnologie wird bei Bakterien durch Elektroporation, Hitzeschock oder Protoplastierung Kompetenz erzeugt, um DNA einzuschleusen. Demaneche *et al.* (2001) haben unter Laborbedingungen nachgewiesen, dass in der Natur entstehende Blitzeinschläge die Membran der Bodenbakterien permeabilisieren könnten, so dass diese in der Lage sind, freie DNA aufnehmen zu können. Diese natürliche Elektrotransformation könnte auch bei der bakteriellen Evolution eine Rolle spielen.

**Transposition (konjugative Transposons)**

Transponierbare Elemente, u. a. Transposons und Insertionselemente (IS), verursachen durch Deletionen, Inversionen und Fusionen genetischen Materials eine große Anzahl von Umordnungen in bakteriellen Genomen. Konjugative Transposons (integrative und konjugative Elemente; ICEs) erweitern diese Prozesse, indem sie nicht auf einen Wirt beschränkt sind, sondern durch Konjugation auch auf andere Organismen übertragen werden können. Konjugative Plasmide und ICEs kodieren im Allgemeinen für ihr eigenes Transfer-System, und werden über Zell-Zell-Kontakt in den Rezipienten transferiert. Im Gegensatz zu Plasmiden werden ICEs stabil in das bakterielle Genom integriert. Häufig fungieren tRNA Gene als Insertions-Hotspots. Beispiele für ICEs aus G+ Bakterien sind ICE*Bs1* aus *B. subtilis*, ICE*St1* und ICE*St3* aus *Streptococcus thermophilus* sowie Tn*916* aus *E. faecalis* (Grohmann, 2010; Wozniak and Waldor, 2010; Bellanger *et al*., 2009; Lee and Grossmann, 2007).

## 1.3 Der Mechanismus der Konjugation

Die Voraussetzung für den konjugativen DNA-Transfer ist ein Zell-Zell-Kontakt zwischen der Donorzelle und der Rezipientenzelle. Die für die Konjugation essentiellen Transfergene (*tra* Gene) und der *oriT* (*origin of transfer*) sind auf der DNA konjugativer Plasmide und ICEs kodiert, die zu den mobilen genetischen Elementen (MGE, Kapitel 1.6) zählen. Auf diesen konjugativen Elementen können zusätzlich Antibiotika-

Resistenzgene, Virulenzfaktoren sowie Insertions-Sequenzen (IS), die eine Integration in das Bakterienchromosom erleichtern, kodiert sein.

Am *oriT* befindet sich die *nick-site*, die Erkennungs- und Schnittsequenz der Relaxase sowie eine Bindestelle (*direct and inverted repeats*) für Proteine. An dieser *nick-site* wird durch Relaxasen ein Einzelstrangbruch eingeführt und die DNA in die relaxierte, offene zirkuläre Form überführt. Die Relaxase bleibt kovalent am 5´-Ende an dem zu transportierenden DNA-Strang (T-DNA) gebunden und bildet zusammen mit zusätzlichen Faktoren das Relaxosom. Das Relaxosom ist ein (Multi)-Protein-Komplex, der auch als dtr-System (*DNA transfer and replication*) bezeichnet wird und am *oriT* gebildet wird. Der Transfer des Einzelstranges in die Rezipientenzelle erfolgt durch die vom Donor gebildete stabile Membranpore, das mpf-System (*mating pair formation*), ein Typ IV Sekretionssystem (T4SS) (siehe 1.4). Diese beiden Systeme sind über eine hoch konservierte ATPase, das Typ IV Kopplungsprotein (*coupling protein*, T4CP) miteinander verbunden. Die Relaxase katalysiert in der Rezipientenzelle die Rezirkularisation des DNA Stranges und ist möglicherweise in die Synthese des komplementären DNA Stranges involviert oder in die Rekombination der T-DNA in das Chromosom.

Die Translokation der ICEs erfolgt zuerst durch das Ausschneiden aus dem Chromosom und Ausbildung einer zirkulären Zwischenstufe, die dann wie die Plasmide in die Rezipientenzelle transferiert wird. In der Rezipientenzelle integrieren ICEs in das Chromosom durch auf den ICEs kodierte Integrasen. Bei G- Bakterien erfolgt der erste Kontakt der Konjugationspartner über so genannte Sex-Pili, bei G+ Bakterien über Oberflächen-Adhäsine. Der Zell-Zell-Kontakt wird bei einigen wenigen G+ Bakterien, wie z. B. *E. faecalis* durch Sex-Pheromone (kleine, lineare Peptide) vermittelt (Abb. 1.1) (Wozniak and Waldor, 2010; Alvarez-Martinez and Christie, 2009).

Einige Plasmide kodieren nur die relaxosomalen Komponenten, den *oriT*, das Relaxasegen und ein oder mehrere Mobilisierungsproteine (Mob) und können durch konjugative Plasmide mobilisiert werden. Dabei nutzt das mobilisierbare Plasmid den mpf-Komplex des konjugativen Plasmids (Smillie *et al*., 2010).

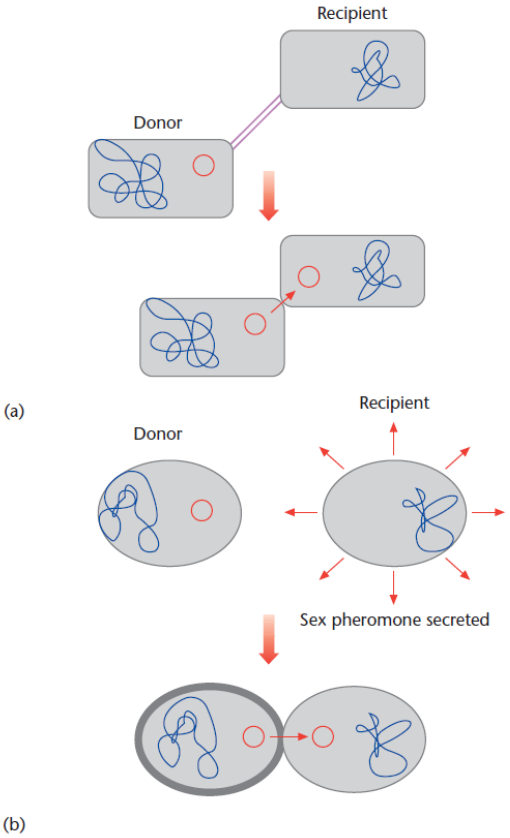



**Abb. 1.1: Konjugation bei Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien (Clewell, 2005)**
**A**: Bei G- Bakterien, wie z. B. *E. coli*, wird der Zell-Zell-Kontakt zur Rezipientenzelle über Sex-Pili hergestellt, deren Gene auf konjugativen Plasmiden kodiert sind. Die Plasmid-DNA wird anschließend über den Konjugations-Apparat in die Rezipientenzelle transferiert.
**B**: Dargestellt ist hier der über Sex-Pheromone vermittelte Zell-Zell-Kontakt, das bei einigen wenigen G+ Bakterien, wie z. B. *E. faecalis* stattfindet. Dabei scheidet der Rezipient (*E. faecalis*) Sex-Pheromone in die Umgebung aus, die dann vom Donor erkannt werden und die Bildung von Oberflächen-Adhäsinen veranlassen. Durch die Adhäsine kommt es zur Anheftung der Donor- und Rezipientenzelle, so dass der Transfer von Pheromonplasmiden stattfinden kann. Zu den konjugativen Pheromonplasmiden gehören u. a. pCF10, pTEF1 und pAD1. Eine Rezipientenzelle kann bis zu sechs unterschiedliche Pheromone bilden und ist somit fähig sich unterschiedliche Plasmide anzueignen.

## 1.4 Typ IV Sekretionssysteme (T4SS)

Zu den Typ IV Sekretionssystemen (T4SS) gehören u. a. das *virB/virD*-System, das auf dem Ti-Plasmid (*tumor inducing*) des G- Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* codiert ist, das konjugative Transfersystem (Tra) des IncN Plasmids pKM101, und das Ptl (*pertussis toxin liberation*)-System von *Bordetella pertussis* zur Freisetzung des Pertussis Toxins. Drei Arten von Makromolekülen zählen zu den Substraten des Typ IV-Transportsystems: DNA-Protein-Komplexe (z. B. T-DNA-Komplex), Proteine (z. B. *Helicobacter pylori* CagA, *Agrobacterium tumefaciens* VirE2, VirE3 und VirF) und komplexe Toxine (Pertussis Toxin PT) (Cascales und Christie, 2004; Vergunst *et al.*, 2000; Covacci und Rappuoli, 1993).

Drei Arten des T4SS sind bis jetzt beschrieben worden: 1. Konjugative Systeme, die DNA über direkten Zell-Zell-Kontakt vom Donor in eine Rezipienten-Zelle übertragen; 2. Effektor-Translokations Systeme, um Proteine oder andere Effektor-Moleküle in Eukaryoten-Zellen zu schleusen (wurde bis jetzt nur bei G- Bakterien beschrieben); und 3. DNA-Freisetzungs- oder Aufnahme Systeme, die die DNA in oder aus dem extrazellulären Milieu translozieren (*Campylobacter jejuni* Cjp/VirB System und das *Helicobacter pylori* ComB System) (Alvarez-Martinez and Christie, 2009; Cascales and Christie, 2003).

Das bis heute am besten untersuchte System ist das auf dem Ti-Plasmid codierte *virB/virD*-System von *Agrobacterium tumefaciens* (Wallden *et al*., 2010; Alvarez-Martinez and Christie, 2009; Juhas *et al*., 2008; Christie *et al*., 2005). *A. tumefaciens* ist ein G-, fakultativ phytopathogenes Bodenbakterium, das in dikotylen Pflanzen, wie Leguminosen, Tabakpflanzen etc. für das Tumorwachstum verantwortlich ist. Die onkogene T-DNA sowie weitere Virulenzfaktoren des Ti-Plasmids werden über das T4S System direkt in das Cytoplasma der Pflanzenzelle sekretiert und die DNA danach ins Chromosom integriert. Der Transfer wird von ca. 20 Virulenzproteinen (Vir) reguliert, von denen 11 am Aufbau des Transporters beteiligt sind (Abb. 1.1) (Wallden *et al*., 2010; Alvarez-Martinez and Christie, 2009).

Das *virB/virD*-System ist im *virB*- und *virD*-Operon codiert, wobei *virB* 11 Gene codiert, *virB1* bis *virB11*, und *virD* fünf Gene, *virD1* bis *virD5*. Die VirB-Proteine werden auch als der Mpf-Komplex (*mating pair formation*) bezeichnet, sie haben die Aufgabe eine stabile Membranpore für den Substrattransfer und den Pilus zu bilden.

Die Proteine VirB3, VirB6, VirB8 und VirB10 bilden den Transportkanal der inneren Membran und an der Pilusbildung sind die Proteine VirB2 und VirB5 beteiligt, wobei VirB2 die Hauptkomponente darstellt und essentiell für den Transportkanal ist. Neueste Untersuchungen ergaben, dass ohne das C-terminale Drittel des VirB1 (lytische Transglykosylase, N-terminal) keine Pilusbildung stattfindet und dass dieser Faktor essentiell für den Pilus-Aufbau ist, indem er möglicherweise als erstes VirB2 und VirB5 bindet und dann als Chaperon für die extrazelluläre T-Pilus Untereinheiten fungiert. Die N-terminale Domäne des VirB1 ist die lytische Transglykosylase, die das Peptidoglykan lokal spaltet, um eine Pore für den Aufbau des Transmembrankanals zu bilden. VirB1 ist nicht für den Substrattransport notwendig (Aguilar *et al*., 2010; Zupan *et al*., 2007). Kerr

und Christie (2010) konnten nachweisen, dass VirB4 das membranintegrierte VirB2 Protein für die Biogenese des T4S Systems aus der Membran verlagern kann.

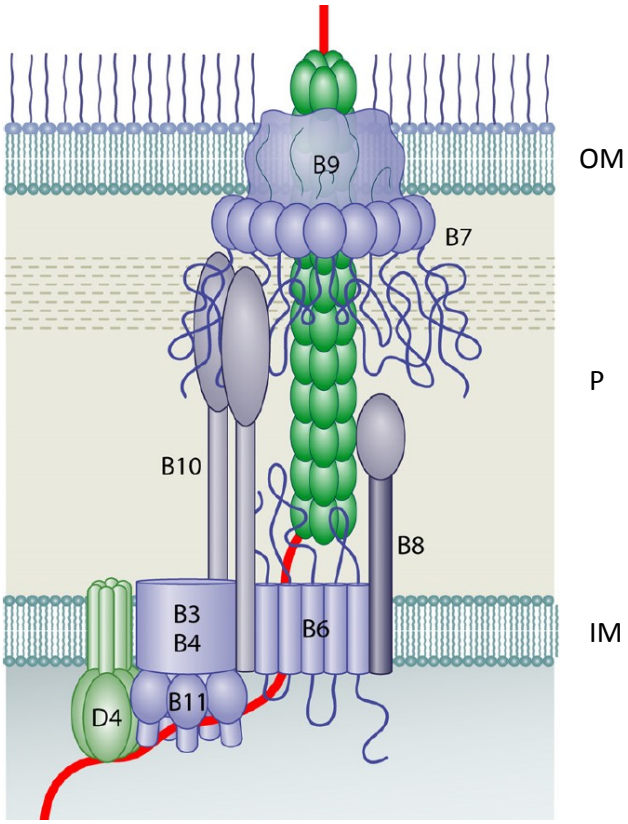



**Abb. 1.2: Modell des T4SS aus *A. tumefaciens***
In dieser Abbildung ist der vorgeschlagene Substrat-Weg (roter Pfeil) und der Aufbau des Kernkomplexes sowie der schematische Aufbau der Zellwand bei G- Bakterien, bestehend aus Cytoplasmamembran (*inner membrane*, IM), Periplasma (P) und Außenmembran (*outer membrane*, OM) dargestellt. In der Zellwand verankert sind die verschiedenen Vir-Proteine des Ti-Plasmids aus *A. tumefaciens*, B11 steht hierbei für das Protein VirB11, D4 für das VirD4 usw. Dabei wird die DNA durch Quervernetzung mit VirD4 (CP), VirB11 (ATPase), VirB6, VirB8, VirB2 Pilin und VirB9 in den extrazellulären Raum transportiert, dabei stellen diese Proteine den Transmembrankomplex dar, andere Vir-Proteine wie VirB3, VirB4 und VirB10 stabilisieren den Aufbau dieses Komplexes (Alvarez-Martinez and Christie, 2009).

An der Bildung der äußeren Membranpore sind das VirB9 und das Lipoprotein VirB7 beteiligt, wobei VirB7 das VirB9 Protein über eine intermolekulare Disulfid-Brücke stabilisiert und dafür sorgt, dass das Substrat den extrazellulären Raum erreicht. Der Kernkomplex des T4SS besteht aus den Proteinen VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 und VirB10. Die Energielieferung für den Aufbau und die Funktion des *vir*-T4SS erfolgt durch drei ATPasen, VirB4, VirB11 und VirD4 (Alvarez-Martinez and Christie, 2009; Chandran *et al.*, 2009; Zupan *et al.*, 2007), wobei für VirB11 eine ATPase Aktivität nachgewiesen wurde (Rashkova *et al.*, 1997). Für die drei ATPasen VirB4 (TrwK), VirB11 (TrwC) und VirD4 (TrwB) des *E. coli* Plasmids R388 wurde eine ATP Bindung und Hydrolyse *in vitro* bestätigt (Arechaga *et al.*, 2008; Tato *et al.*, 2005; Krause *et al.*, 2000). Rangrez *et al.* (2009) konnten kürzlich ATP Hydrolyse und Bindung dreier ATPasen, TraE (VirB4), TraJ

(VirB11) und TraK (VirD4), die auf dem konjugativen Plasmid pAc3249A aus *Aeromonas veronii* kodiert sind, *in vitro* nachweisen.

VirB4 Proteine sind große (>70 kDa) Proteine mit Walker A und Walker B NTP-Bindungs-Motiven, die für alle ATP-bindenden Proteine charakteristisch sind. Gereinigte VirB4 Proteine können in Abhängigkeit der Membranbeschaffenheit und Lösungsbedingungen monomere, dimere und hexamere Formen annehmen. ATPase-Aktivität wurde nur für hexamere Formen nachgewiesen, so dass VirB4 möglicherweise als Hexamer, ähnlich wie VirB11 und VirD4, aktiv ist (Wallden *et al*., 2010; Alvarez-Martinez and Christie, 2009; Arechaga *et al*., 2008). VirB4 interagiert mit VirB8, VirB10 und VirB11 (Ward *et al*., 2002), stabilisiert VirB3 und VirB8 und unterstützt die Pilus Biogenese. Mutationen in der Walker A NTP-Binderegion der VirB4 und VirB11 ATPasen resultieren in Störung des Substrattransfers und der Pilus-Bildung (Kerr and Christie, 2010; Christie *et al*., 2005).

Die Gene *virD1* und *virD2* sind für die DNA-Prozessierung und den Transport zuständig und werden als Dtr-Proteine (*DNA transfer and replication*) bezeichnet. Zusammen mit VirD1 bildet VirD2 das Relaxosom an der T-Region des Plasmids und initiiert die Entwindung des T-Strangs. VirD1 und VirD2 sind für die Erkennung der T-Region erforderlich, aber nur die Relaxase-Domäne des VirD2 Proteins spaltet die DNA an beiden Enden der T-Region (*left and right border sequences*) und ermöglicht so die Freisetzung der T-DNA. VirD2 bleibt kovalent mit dem 5´-Ende des T-Strangs über einen N-terminalen Tyrosinrest verbunden (Van Kregten *et al*., 2009). Die Proteine VirD3 und VirD5 sind nicht essentiell für den Transfer und die Prozessierung. Das VirD4-Protein, ein 73,5 kDa großes Kopplungsprotein (*coupling protein*, CP), verbindet das Relaxosom (Dtr-Komplex) mit dem T-DNA-Transfer-Komplex (Mpf-Komplex). Die Assemblierung des Pilus findet auch ohne VirD4 statt, für den Transfer der Substrate ist VirD4 jedoch essentiell. Das VirD4-Protein ist über Transmembransegmente in der inneren Membran verankert, wobei diese über einen kurzen periplasmatischen Bereich miteinander verbunden sind. Auf der großen cytoplasmatischen Domäne befindet sich ein Walker A- und ein Walker B-Motiv. Die Inaktivierung des Walker A-Motivs durch Substitution einzelner Aminosäuren sowie die Deletion des periplasmatischen Bereiches verhindert den Transfer von T-DNA (Kumar und Das, 2002). VirD4 rekrutiert die T-DNA zu dem Membrankanal und leitet diese unabhängig von der ATPase Aktivität an VirB11, dann zu

den inneren Membranproteinen VirB6 und VirB8, danach zu VirB9 und schließlich zu dem Pilusprotein VirB2 (Wallden *et al*., 2010).

Der konjugative Transfer über T4S Systeme ist innerhalb G+ Bakterien der Hauptmechanismus für die Ausbreitung multipler Antibiotikaresistenzen und anderer Virulenzfaktoren im klinischen Bereich; T4S Systeme wurden in Plasmiden aus z. B. Enterokokken, Streptokokken und Staphylokokken, die die Hauptursache nosokomialer Infektionen sind, nachgewiesen. Das Plasmid pIP501 aus *Streptococcus agalactiae* hat den breitesten Wirtsbereich von Plasmiden aus G+ Bakterien und kann sich selbst in alle bis jetzt getesteten G+ Bakterien und sogar in G- *E. coli* übertragen (Wallden *et al*., 2010; Alvarez-Martinez and Christie, 2009, Abajy *et al*., 2007). Das T4S-ähnliche System (T4SLS) des pIP501 Plasmids wird im nachfolgendem Kapitel erläutert.

## 1.5 Das T4S-ähnliche System (T4SLS) des konjugativen Plasmids pIP501

### 1.5.1 Die bakterielle Zellwand

Das T4S System ist in G- Bakterien sehr gut untersucht, bei G+ Bakterien sind die Forschungen noch nicht so fortgeschritten. Da die Zellwand von G- und G+ Bakterien sich deutlich in ihrem Aufbau unterscheidet, gibt es auch Unterschiede im T4S System. Das Baugerüst der Zellwand besteht bei beiden Bakterienarten (G+ und G-) aus dem Polymer Peptidoglykan (PG, auch Murein genannt), das aus langen Glykanketten besteht, die durch flexible Peptidbrücken quervernetzt sind. Die Zusammensetzung der Peptidbrücken variiert je nach Bakterium. Die Glykanketten bestehen aus zwei Zuckerderivaten, *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmurminsäure (MurNAc), die β-1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. In *E. coli* sind die Glykanketten 25-35 Disaccharid-Einheiten lang und können sogar bis zu 80 Einheiten beinhalten, bei *B. subtilis* sogar 100. In *S. aureus* hat die Mehrheit der Glykanketten eine Länge von 3-10 Einheiten und eine Maximallänge von 23-26 Einheiten. Die Unterschiede des PG liegen in der Dicke und in zusätzlichen Komponenten. Die Zellwand bei G+ Bakterien ist 10-20 Schichten dick und enthält kovalent gebundene Polymere, die Teichonsäuren, Teichuronsäuren und andere Polysaccharide sowie Proteine, die mit der Zellwand verankert sind. Bei G- Bakterien ist die Zellwand nur 1-3 Schichten dünn, sie besitzen aber zusätzlich eine äußere Membran, mit der das PG über Lipoproteine kovalent

verbunden ist. Dadurch befindet sich das PG im Periplasma zwischen der inneren und der äußeren Membran. Die äußere Membran ist hoch asymmetrisch, die innere Schicht besteht aus Phospholipiden und die äußere Schicht hauptsächlich aus Lipopolysacchariden (LipidA und Polysaccharidketten), die über das LipidA (Endotoxin) mit der äußeren Schicht verbunden sind (Abb. 1.3) (Ruiz *et al*., 2006; Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005; Scheffers and Pinho, 2005).

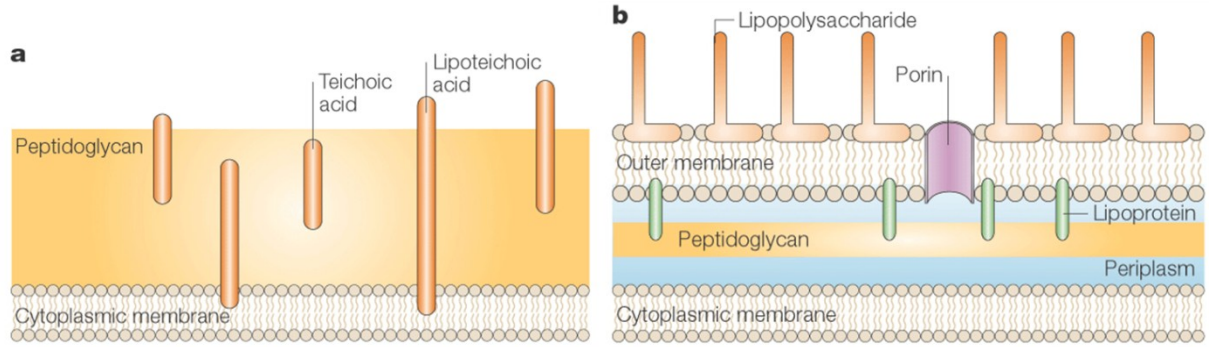



**Abb. 1.3: Zellwand Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien**
Nach Cabeen und Jacobs-Wagner (2005)
**A**: Die G+ Zellwand besteht aus einer dicken, mehrlagigen Peptidoglykanschicht außerhalb der Cytoplasmamembran. Teichonsäuren sind in das PG eingebettet und mit dem PG verbunden, die Lipoteichonsäuren ragen aus dem PG raus.
**B**: Die G- Zellwand besteht aus einer Außenmembran (*outer membrane*), die durch Lipoproteine mit dem haupsächlich einlagigen PG verbunden ist. Das PG befindet sich im Periplasma zwischen Außenmembran und Cytoplasmamembran. Die Außenmembran enthält Porine, die die Passage kleiner hydrophiler Moleküle durch die Membran erlauben und Lipopolysaccharide, die sich in den extrazellulären Raum ausdehnen.

### 1.5.2 Das Plasmid pIP501

Das Plasmid pIP501 (30,6 kb) wurde ursprünglich in *Streptococcus agalactiae* identifiziert und kodiert Resistenzen gegen Antibiotika der Makrolid-Linkosamid-Streptogramin B-Gruppe (MLS, *erm*B) und Chloramphenicol (*cat*). Die *tra*-Region von pIP501 ist in einem Operon organisiert, wobei es sich bei den Transfergenen *orf1-orf15* um eine transkriptionelle Einheit handelt (Abb. 1.4) (Kurenbach *et al*., 2006). Drei der 15 *tra* Gene weisen Homologien zu T4SS Komponenten auf. Orf5 ist VirB4-ortholog und konnte *in vitro* eine ATP-Bindung und -Hydrolyse zeigen, Orf7 ist eine VirB1-Typ lytische Transglykosylase und Orf10 (Celik *et al*., Manuskript in Vorbereitung) weist Ähnlichkeiten mit dem Kopplungsprotein VirD4 auf. Für Orf10 konnte auch *in vitro* eine ATP-Bindung und -Hydrolyse gezeigt werden (Celik *et al*., Manuskript in Vorbereitung). Diese Proteine sind auch in dem pIP501 verwandten Plasmid pRE25 aus *E. faecalis*, pSK41/pGO1 aus *S. aureus* und pMRC01 (das Orf7 orthologe Protein fehlt) aus *Lactococcus lactis* konserviert (Arends, 2010; Abajy *et al*., 2007; Grohmann, 2003).

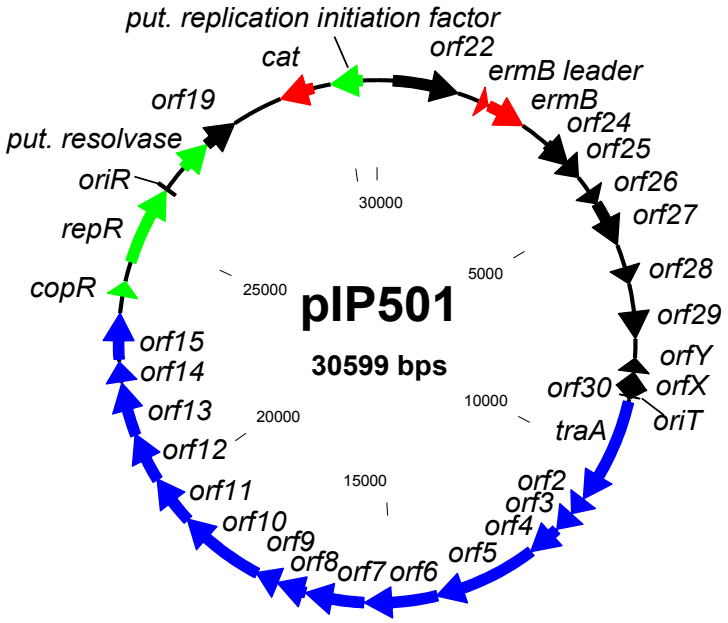



**Abb. 1.4: Plasmidkarte des pIP501 (Kurenbach, 2004)**
Die Antibiotika-Resistenzgene sind rot, Replikationsgene, *copy number*-Kontrollgene und Gene mit Resolvase-Aktivität grün dargestellt. *orf* mit unbekannter Funktion sind schwarz gezeichnet. Die Gene der *tra*-Region sind dunkelblau dargestellt, *orfX* und *orfY*, die möglicherweise für Transferkomponenten codieren, schwarz unterlegt.

### 1.5.3 Das T4SLS Modell des Plasmids pIP501

Abajy *et al*. (2007) konnten im Jahr 2007 das erste vorläufige Modell des T4SL Systems des Plasmids pIP501 vorstellen, das von Dr. K. Arends während seiner Promotionsarbeit im Jahr 2010 weiter vervollständigt wurde (Abb. 1.5).

Die lytische Transglykosylase Orf7 wird vermutlich über ein N-terminales Signalpeptid in den extrazellulären Raum sekretiert und bindet als Dimer an das Peptidoglykan in der Zellwand und spaltet es lokal, so dass der Aufbau des Transmembrankomplexes ermöglicht wird. Dabei rekrutiert Orf7 vermutlich Orf5, Orf10 und Orf14 zur Zellhülle. Der Transport weiterer Tra-Proteine, Orf2, Orf8, Orf9 und Orf15 findet vermutlich auch über Signalpeptide statt. Insgesamt werden acht der Tra-Proteine wahrscheinlich über Signalpeptide und Interaktionen mit Orf7 in die Zellhülle dirigiert. Durch Interaktionen mit restlichen Tra-Proteinen findet schließlich der Aufbau des Transmembrankomplexes statt. Dabei wird der Kernkomplex vermutlich durch die Interaktionen von Orf2 mit Orf3, Orf6 und Orf12 aufgebaut. Für Orf12 wird eine VirB6-ähnliche und für Orf3 eine VirB3-ähnliche Funktion vermutet. VirB3 und VirB6 bilden den Transportkanal der inneren Membran beim T4SS des *A. tumefaciens*. Orf5 (VirB4-

ortholog) liefert vermutlich die nötige Energie für die Assemblierung des T4SLS Komplexes und ist aktiv am DNA Transport beteiligt.

Orf14 ist ein zytoplasmatisches Protein, kann sequenzunspezifisch DNA binden und interagiert mit Orf5, Orf8 und Orf12, so dass es konzentriert am T4SLS Komplex vorliegt. Da die DNA-Bindung sequenzunspezifisch ist, kann Orf14 auch andere Plasmid-DNA als pIP501 binden und zum Transferkomplex rekrutieren. Dadurch können mobilisierbare Plasmide, deren *oriT* nicht von der pIP501 Relaxase (Orf1, TraA) erkannt wird, zum T4SLS Komplex transportiert werden. Da mobilisierbare Plasmide oft ihre eigenen Relaxasen kodieren, führen diese einen Einzelstrangbruch durch und können dann die einzelsträngige DNA (ssDNA) an das Kopplungsprotein Orf10 übergeben. Orf10 bindet wahrscheinlich die Relaxase mit der ssDNA und transportiert diese aktiv in den T4SLS Kernkomplex. Für Orf15 wird vermutet, dass es ein Oberflächenprotein darstellt, das mit anderen Oberflächenproteinen interagieren kann und somit als Adhäsin den Kontakt zu potentiellen Rezipienten herstellt. Das Orf15 Protein besitzt am C-Terminus den LPxTG Zellwandanker. Für zwei der Tra-Proteine, Orf11 und Orf13 konnten keine Interaktionen mit pIP501 Tra-Proteinen nachgewiesen werden (Arends, 2010; Abajy *et al.*, 2007).

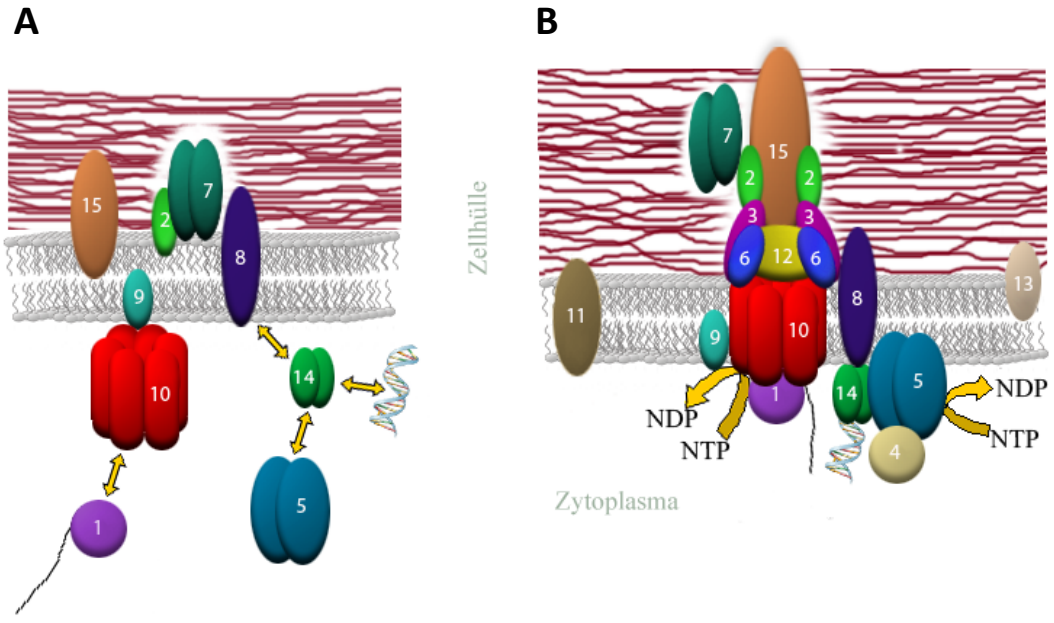



**Abb. 1.5: Arbeitsmodell des T4SLS von pIP501 aus *E. faecalis* nach Arends (2010)**
Die Zahlen in diesem Modell beziehen sich auf das jeweilige Orf der Tra-Region im pIP501. Durch einen Doppelpfeil markiert, sind die Interaktionen zweier Proteine dargestellt.
**A**: Durch Signalpeptide werden die Tra-Proteine in die Zellhülle transportiert. Die lytische Transglykosylase Orf7 spaltet lokal das Peptidoglykan (aufgehellter Bereich).
**B**: Der Aufbau des T4SLS Komplexes bei G+ Bakterien.

## 1.6 Mobile genetische Elemente

Bakterielle Virulenzfaktoren, wie Antibiotikaresistenzen, Biofilmbildung, Transfergene sowie Toxine sind auf sogenannten mobilen genetischen Elementen (MGE) codiert. Alle mobilen genetischen Elemente in einer Zelle werden als das Mobilom bezeichnet. Zu diesen gehören Bakteriophagen, Plasmide, Transposons, ICEs und Insertionselemente (IS), die eine Schlüsselrolle in der Mobilisierung und Reorganisation von Genen, sowohl innerhalb des Genoms (intrazelluläre Mobilität) als auch zwischen Bakterienzellen (interzelluläre Mobilität) spielen (Leplae *et al.,* 2006; Frost *et al.,* 2005). Eine große Anzahl dieser MGEs ist auf Pathogenitäts-Inseln (PAI) lokalisiert und variiert in der Größe von 20-200 kb. Ein Beispiel hierfür ist die 40 kb umfassende *cag* (*cytotoxin associated gene*) PAI von *H. pylori*, auf der ein T4SS codiert ist. Das CagA Effektorprotein wird mit Hilfe des Typ IV Sekretions-Apparates in Epithelzellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen transloziert und ist an der Entstehung von Gastritis (*chronic atrophic gastritis*, CAG), Magengeschwüren und zwei Formen von Magenkrebs beteiligt (Debreuil *et al.,* 2002; Backert *et al.,* 2000). Ein weiteres Beispiel für eine PAI ist das sogenannte *staphylococcal cassette chromosome* (SCC*mec*), auf dem das *mecA* Gen lokalisiert ist. Diese Methicillinresistenz in Staphylokokken wird durch das PBP2a (*penicillin binding protein 2a*) verursacht, das an alle β-Laktam-Antibiotika binden kann und dadurch diese inaktiviert (Hanssen *et al.,* 2004; Schmidt *et al.,* 2004). Infektionen mit Methicillin resistenten *S. aureus* (MRSA) zählen zu den häufigsten nosokomialen Infektionen und sind schwer zu bekämpfen.

Eine Sammlug, Analyse und Klassifizierung sequenzierter MGEs ist mittlerweile in einer Datenbank, der ACLAME *database* (*A CLAssification of Mobile genetic Elements*), zusammengefasst. In dieser sind die MGEs auf der Gen- und Protein-Ebene klassifiziert und in Familien, die gleiche Funktionen besitzen, unterteilt. Weitere Klassifizierung findet auf der Populations- und Genom-Ebene statt. Diese Datenbank enthält Informationen über 457 Bakteriophagen Genome, 1109 Plasmide und 769 Prophagen. Die ACLAME Datenbank wurde entwickelt, um alle bekannten MGEs in einer Datenbank zu sammeln, eine Plattform für die Analyse der Diversität von MGE zu bieten und die Möglichkeit neue, in bakteriellen Genomen integrierte MGEs zu finden (Leplae *et al*., 2010).

### 1.6.1 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale, meistens zirkuläre, doppelsträngige, sich autonom replizierende DNA-Moleküle, deren Größe von 1 bis über 2400 kb reicht. Beispiele für Megaplasmide sind pNGR234b (2430 kb) aus *Rhizobium* sp. NGR234 und das lineare Megaplasmid pSCL4 (1797) kb aus *Streptomyces clavuligerus*. Weitere Lineare doppelsträngige Plasmide wurden u. a. in *Borellia burgdorferi* gefunden (Medema *et al*., 2010; Schmeisser *et al*., 2009; Deneke and Chaconas, 2008).

Essentielle Komponenten eines Plasmides sind Gene, die für die Replikation (Replikon) sowie Stabilität (*maintenance*) und eine gleichmäßige Verteilung bei der Zellteilung (*partitioning*) zuständig sind und werden als das „Rückgrat" des Plasmides bezeichnet. Die Replikation erfolgt unabhängig vom Wirtschromosom, verwendet aber die Replikationsmaschinerie des Wirtsbakteriums. Zu der Replikationsregion, dem Replikon, gehören der Replikationsursprung (*oriR*, *origin of replication*), die *cop/inc* und *rep*-Gene, die für die Replikation und Kontrolle notwendigen Proteine codieren. Die Replikation kann entweder nach dem Theta-, dem *Rolling Circle*-oder *strand displacement*-Mechanismus ablaufen (del Solar *et al*., 1998). Um die eigene Stabilität in einer bakteriellen Population zu gewährleisten, haben Plasmide besondere Mechanismen entwickelt. Dazu gehören die Kontrolle der Kopiezahl, Partitioning-Systeme und Systeme zur Auflösung von Multimeren und das Absterben von plasmidfreien Bakterienzellen (*postsegregational killing*) (Møller-Jensen and Gerdes, 2007; Phillips and Funnell, 2004). Neben diesen essentiellen Genen können Plasmide weitere Gene beinhalten, die dem Wirt besondere Eigenschaften und Selektionsvorteile verschaffen können. Beispiele dafür sind u. a. Resistenzen gegenüber Antibiotika, toxischen Schwermetallen ($Hg^{2+}$), Desinfektionsmitteln (Quaternäre Ammoniumverbindungen), Bakteriophagen oder UV-Strahlung, besondere Stoffwechselwege, Abbauwege von toxischen Substanzen oder die Bereitstellung von Symbiose- oder Pathogenitätsfaktoren.

Die Kopiezahl eines Plasmides variiert in verschiedenen Wirtsbakterien und unter bestimmten Wachstumsbedingungen. Plasmide, deren Kopiezahl größer als 15 ist, werden als *high-copy-number* Plasmide (z. B. 5-10 kb oder kleiner) und andere als *low-copy-number* Plasmide (> 25 kb) bezeichnet (Frost *et al*., 2005; Phillips and Funnell, 2004).

Die bis jetzt übliche Klassifizierung von Plasmiden beruht auf der Verwandtschaft der Replikons und wurde 1971 von Datta und Hedges eingeführt. Plasmide, die Ähnlichkeiten in ihren Replikationsmechanismen sowie der Kopiezahl-Kontrolle aufweisen, können nicht in einer Zelle koexistieren, da sie um für die Replikation notwendige Faktoren konkurrieren. Diese Plasmide werden in dieselbe Inkompatibilitätsgruppe (Inc) zusammengefasst. Inc-Gruppen sind für Plasmide der Enterobacteriaceen, Pseudomonaden, Staphylokokken und Enterokokken bestimmt worden (Jensen *et al*., 2010; Carattoli, 2009; Frost *et al*., 2005). Da die Methode zur Prüfung der Inkompatibilität experimentell sehr aufwendig ist, werden die Plasmide zurzeit anhand ihrer Sequenzähnlichkeiten den entsprechenden Gruppen zugeordnet. Für 19 Inc-Gruppen der *Enterobacteriaceen* wurden spezifische Hybridisierungssonden erstellt (Carattoli, 2009) und Replikon-spezifische PCR-Primer zur Detektion von G- konjugativen Plasmiden entwickelt (Smalla and Sobecky, 2002). Für Plasmide aus G+ Bakterien wurde ein Klassifizierungssystem vorgeschlagen, das die Plasmide bestimmten Rep-Familien zuordnet. Diese Rep-Familien wurden anhand von 111 publizierter Plasmid-Sequenzen ermittelt und für die konservierten Bereiche der *rep*-Gene wurden spezifische Primer entwickelt. Insgesamt wurden 19 Rep-Familien und 19 einmalig vorkommende Sequenzen (u. a. *S. aureus* pUB110; *S. aureus* pSK1; *E. faecalis* V583 pTEF3) definiert (Jensen *et al*., 2010).
Einige Plasmide in G- Bakterien, wie z. B. IncP Plasmide (RP4) oder Plasmide der Inc18-Gruppe (pIP501, pAMβ1, pSM19035 und pRE25) aus G+ Bakterien können auch in Spezies replizieren, die nicht der gleichen Gattung, Familie und sogar Klasse wie das Wirtsbakterium angehören und werden als *broad host range* Plasmide bezeichnet. Plasmide mit einem engen Wirtsbereich (z. B. ColE1) sind *narrow host range* Plasmide.

## 1.7 Gram-positive Bakterien und deren Plasmide

### 1.7.1 *Staphylococcus* Spezies

*Staphylococcus* Spezies sind die natürlichen Bewohner der menschlichen und tierischen Hautflora sowie Schleimhäuten. Obwohl sie ein Teil der Hautflora und folglich kommensale Mikroorganismen sind, sind sie opportunistische Pathogene, die für eine Reihe von Entzündungskrankheiten bei Mensch und Tier verantwortlich sind. Sie sind nicht beweglich, Katalase positiv, fakultativ anaerob und sehen unter dem Mikroskop

wie traubenförmige Anhäufungen aus. Staphylokokken werden in Koagulase-positive (KPS) und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) unterteilt. *S. aureus* zählt zu den KPS. Das Enzym Koagulase wird extrazellulär ausgeschieden und induziert die Verklumpung von Blutplasma.

Unter den Staphylokokken ist *S. aureus* die am meisten invasive Spezies und der Erreger diverser akuter und chronischer Krankheiten, wie Hautinfektionen, Septikämien, Endokarditis, Pneumonien, Osteomyelitis und Arthritis. Nosokomiale und außerhalb der Krankenhäuser erworbene bakterielle Infektionen werden weltweit durch *S. aureus* Stämme verursacht. Zu diesen gehören die Methicillin resistenten *S. aureus* (MRSA) Stämme, die multiple Resistenzen aufweisen. MRSA Stämme, die von Personen in Krankenhäusern oder Pflegeeinrichtungen erworben werden, bezeichnet man als *health care-associated* MRSA (HA-MRSA), die von Personen außerhalb des Gesundheitswesens erworben wurden als *community-associated* MRSA (CA-MRSA). CA-MRSA wird überwiegend mit tiefgehenden Haut-Weichteilinfektionen sowie nekrotisierender Pneumonie bei jungen gesunden Menschen assoziiert, während HA-MRSA bei immunschwachen und älteren Patienten Wundinfektionen, Bakteriämie/Sepsis sowie Pneumonien verursacht. Nahezu alle MRSA Stämme enthalten das mobile genetische SCC*mec* Element, welches einheitlich in die spezifische chromosomale Stelle *orfx* integriert ist. Auf SCC*mec*, das voraussichtlich von einer KNS Spezies erworben wurde, ist das *mec*A Gen lokalisiert. Dieses Gen kodiert das Penicillin-Bindeprotein 2a (PBP2a), eine Zellwand-Transpeptidase, die in Verbindung mit dem nativen PBP2 die kontinuierliche Zellwandsynthese in Anwesenheit von β-Lactam-Antibiotika erlaubt. Bis jetzt sind neun (I-VIII, $V_T$) SCC*mec* Typen charakterisiert worden. HA-MRSA Stämme enthalten meistens große SCC*mec* Genkassetten vom Typ I, II oder III, wobei CA-MRSA zu Typ IV oder V gehört, die kleinere SCC*mec* Elemente beinhalten (David and Daum, 2010; Malachowa and DeLeo, 2010; Jensen and Lyon, 2009).

Aufgrund der Resistenz gegen alle β-Lactam Antibiotika und fehlenden wirksamen Alternativen wurde das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin gegen MRSA eingesetzt. Doch die vermehrte Verwendung dieses Antibiotikums führte bald zu zwei Arten Glykopeptid resistenter MRSA Stämme. Die erste Art wurde Vancomycin *intermediate-resistant S. aureus* (VISA) genannt und ist mit einer dickeren und wenig vernetzten Zellwand assoziiert, die die Vancomycin Moleküle abfängt, bevor sie ihr eigentliches Ziel erreichen. Die zweite Art, Vancomycin resistente *S. aureus* (VRSA) beruht auf dem *van*A

Operon, das auf dem Transposon Tn*1546* kodiert ist und zu einer „*high level*“ Vancomycin-Resistenz führt (Périchon and Courvalin, 2009).

Zu den Koagulase-negativen (KNS) Spezies, die häufig mit Infektionen bei Menschen in Verbindung gebracht werden, aber weniger virulent sind als *S. aureus*, zählen *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. saprophyticus*. Andere gelegentlich aus klinischen Proben isolierte KNS sind u. a. *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. cohnii* und *S. lugdunensis*. Infektionen treten meistens beim Wegfall der natürlichen Barriere der Haut auf. KNS werden vor allem mit Fremdkörper-assoziierten Infektionen in Verbindung gebracht, da diese auf den Implantaten und Kathetern Biofilme ausbilden können, die Schutz und eine erhöhte Resistenz gegenüber antimikrobiellen Mitteln verleihen. SCC*mec* Elemente sind auch in *S. epidermidis* (MRSE), *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. sciuri*, *S. warneri* und *S. saprophyticus* beschrieben worden (Garza-González *et al*., 2009).

Neben SCC*mec* Elementen können *Staphylococcus* Spezies Plasmide und Transposons enthalten, die Resistenzdeterminanten und Transfergene kodieren. Die meisten *Staphylococcus* Plasmide können in drei Klassen, basierend auf der genetischen Organisation und funktionellen Charakteristika, unterteilt werden. Klasse I beinhaltet kleine *high-copy* Plasmide, 3-5 kb groß, die entweder kryptisch sind oder Antibiotika-Resistenzgene tragen. Einige dieser Plasmide kodieren außerdem *mob* Gene und können durch konjugative Plasmide mobilisiert werden. Beispiele dieser mobilisierbaren Plasmide sind pT181, das Tetracyclinresistenz (*tet*K) trägt, pC221, das für Chloramphenicolresistenz (*cat*) kodiert und pE194, auf dem das Erythromycin-Resistenzgen *erm*C kodiert ist. Das Plasmid pT181 kommt auch in SCC*mec* Element Typ III integriert vor (David and Daum, 2010). In der Klasse II kommen größere (15-40 kb) *low-copy* Plasmide, die mehrere Resistenzgene oft in Verbindung mit Transposons tragen, vor. Diese Klasse unterteilt sich in zwei Gruppen, die Antibiotika- und Schwermetallresistenz-vermittelnden Plasmide und die pSK1 Plasmidfamilie. Zu der ersten Gruppe gehört das Plasmid pI524 (32 kb), auf dem die Resistenzen gegen Quecksilber (*mer*), Cadmium (*cad*), β-Lactam-Antibiotika (*blaZ*) und Arsen (*ars*) kodiert sind. Die Resistenzgene *mer* und *blaZ* sind auf Transposons Tn*4004* und Tn*552*-ähnlich lokalisiert. Weitere Plasmide dieser Klasse sind u. a. das pSK23 (39 kb) Plasmid, das neben *mer* und *cad* Resistenzgenen noch *aac6-aph2a* („*high level*“ Gentamicinresistenz, Tn*4001*) und *qacB* (vermittelt Resistenz gegenüber quaternären

Ammoniumverbindungen und Ethidiumbromid) trägt, sowie pI258 (28 kb) das fünf Resistenzen kodiert (*mer*, *cad*, *blaZ*, *ars*, *erm*B). Das *erm*B Resistenzgen ist auf dem Transposon Tn*551* lokalisiert. Mitglieder der pSK1 Plasmidfamilie kodieren alle das *qacA* Resistenzgen und einige zusätzlich noch *aac6-aph2a* (Tn*4001*), *bla*Z (Tn*4002*) und/oder *dfr*A (Tn*4003*), das Resistenz gegen Trimethoprim vermittelt. Die dritte Klasse (Klasse III) stellen die konjugativen Multiresistenz-vermittelnden Plasmide dar (Firth and Skurray, 2006). Zu dieser Klasse zählt die pSK41 Plasmidfamilie, die u. a. die Plasmide pSK41 (46,4 kb), pGO1 (54 kb), pLW1043 (57,9 kb), pV030-8 (39 kb), pPR9 (41,7 kb) und pUSA03 (37,1 kb) beinhaltet. Diese Plasmide besitzen ein gemeinsames genetisches Rückgrat, unterscheiden sich aber erheblich in ihren Resistenzdeterminanten, die im Allgemeinen von mehreren Kopien der Insertionssequenz IS*257* flankiert sind. Die IS*257* Sequenz spielt eine Schlüsselrolle in der Evolution pSK41/pGO1-ähnlicher Plasmide. Allen gemeinsam ist die Transferregion (*tra*), die Homologien zum T4SS aufweist (*traE*/*virB4*, *traG*/*virB1*, *traK*/*virD4*). Die drei Plasmide pV030-8, pPR9 und pUSA03 wurden aus MRSA Stämmen isoliert. Das Plasmid pUSA03 stamm aus einem CA-MRSA USA300 Epidemiestamm, der bei Patienten ohne Vorliegen typischer Risikofaktoren nachgewiesen wurde. Das Plasmid pLW1043 wurde aus einem Vancomycin resistenten *S. aureus* (VRSA) Stamm isoliert. Auf dem Plasmid pLW1043 sind neben den *tra* Genen, die Transposons Tn*4001* (*aac6-aph2a*), Tn*4003* (*dfrA*), Tn*552* (*blaZ*) und Tn*1546* (*van*A) sowie das Resistenzgen *qacC* kodiert. Die Plasmide pSK41 und pGO1 besitzen gemeinsam das integrierte Plasmid pUB110 (*aadD*, *ble*), das Tn*4001*-IS*257* Hybrid (*aac6-aph2a*), *qacC* und die Transferregion *tra*. Das Plasmid pGO1 besitzt zusätzlich das integrierte Transposon Tn*4003* (*dfrA*). Die Plasmide pUSA03, pV030-8 und pPR9 kodieren zusätzlich zu der Transferregion das Resistenzgen *ileS2* („*high-level*“ Mupirocinresistenz). In pUSA03 ist außerdem noch *erm*C und in pPR9 das *blaZ* Gen (Tn*552*) kodiert. Den Mupirocin-Plasmiden fehlen das integrierte Plasmid pUB110, Tn*4003*, Tn*4001* und *qacC*. Die Plasmide der pSK41/pGO1 Familie sind *narrow host range* Plasmide (Pérez-Roth *et al*., 2010; Caryl and O´Neill, 2009; Firth and Skurray, 2006; Diep *et al*., 2006; Grohmann, 2003; Weigel *et al*., 2003; Berg *et al*., 1998).

### 1.7.2 *Enterococcus* Spezies

Enterokokken sind Katalase negative, fakultativ anaerobe Bakterien, die normalerweise den menschlichen und tierischen Verdauungstrakt besiedeln. Sie sind fähig unter

lebensfeindlichen Umweltbedingungen, wie extremen Temperaturen (5-65°C) und pH-Werten (4,5-10,0) sowie hohen Kochsalzkonzentrationen (6,5%) zu überleben. Die medizinisch relevanten *Enterococcus* Spezies sind *E. faecalis* und *E. faecium*. Sie zählen zu den Milchsäurebakterien, die für die Bakteriocin Produktion bekannt sind. Bakteriocine sind antimikrobielle Peptide, die auch als biologische Konservierungsstoffe verwendet werden. Da Enterokokken Bakteriocine produzieren können, werden sie in der Lebensmittelindustrie als Probiotika und Starterkulturen verwendet. *E. faecalis* und *E. faecium* kommen in Käse, Fisch, Wurst- und Fleischwaren vor. Sie können auch als Fäkalkontaminationen in rohem Fleisch und Milch sowie in Milchprodukten vorkommen. Sie sind aber auch zusammen mit *S. aureus* und KNS Spezies wichtige nosokomiale Pathogene, die mit mehr als 60% aller nosokomialen Blutinfektionen assoziiert werden. Sie verursachen außerdem Harnwegs- und Wundinfektionen sowie Endokarditis. Schwer behandelbare Infektionen werden durch multiresistente *E. faecalis* und *E. faecium* Stämme verursacht, die intrinsische und erworbene Resistenzen gegen β-Lactam Antibiotika, Aminoglykoside sowie Glykopeptide aufweisen. Vancomycin-Resistenz ist vor allem bei *E. faecium* Stämmen weit verbreitet, *E. faecalis* Stämme machen nur einen geringen Teil aus. Als Ursache für Vancomycin resistente *E. faecium* (VREF) wird die Verwendung von Avoparcin, einem Vancomycin-Analogon, das in der Massentierhaltung als Wachstumsfördermittel eingesetzt wurde, angesehen. Bis jetzt sind sechs Gencluster (*van*A bis *van*G) bekannt, die Glykopeptidresistenz verleihen. Klinisch relevant sind die ersten beiden, *van*A und *van*B. Diese sind auf Transposons kodiert, *van*A auf Tn*1546*, *van*B auf Tn*1547*, Tn*1549* und Tn*5382*. Die Transposons können auf Plasmiden und dem Chromosom lokalisiert sein (Hegstad *et al*., 2010; Fisher and Phillips, 2009; Hendrickx *et al*., 2009; Werner *et al*., 2008; Witte *et al*., 2008; Biavasco *et al*., 2007).

Die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen erfolgt über mobile genetische Elemente. Dabei spielen konjugative Plasmide eine entscheidende Rolle. Die am besten charakterisierten konjugativen *broad host range* Plasmide aus Enterokokken sind die Plasmide der Inc18 Gruppe (pIP501, pAMβ1, pSM19035 und pRE25). Die Plasmide pAMβ1 (27,8 kb), pIP501 (30,6 kb) und pRE25 (50,2 kb) kodieren das Erythromycin-Resistenzgen *erm*B, pIP501 und pRE25 zusätzlich noch das *cat* Resistenzgen und pRE25 drei weitere, *aph3-III*, *ant(6)-Ia* und *sat4*, die Resistenzen gegen Kanamycin, Streptomycin und Streptothricin vermitteln. Diese drei Resistenzgene sind von IS*1216V*

flankiert und kommen auch im Plasmid pJH1 aus *E. faecalis* und auf dem Transposon Tn*5405* aus *S. aureus* vor. Ein 30,5 kb großer Teil der pRE25 Sequenz ist mit der pIP501 Sequenz identisch (Palmer *et al*., 2010; Schwarz *et al*., 2001). Inc18-ähnliche Plasmide sind von Zhu *et al*. (2010) aus Vancomycin resistenten *E. faecalis* Stämmen isoliert worden, die von Patienten mit VRSA stammen. Die Inc18-ähnlichen (*repR* homolog, *copR* nicht) *van*A Plasmide pWZ909 (42,6 kb), pWZ1668 (48,4 kb) und pWZ7140 (47,3 kb) aus *E. faecalis* enthalten die komplette pIP501 Transferregion sowie das Tn*1546 van*A Transposon (Zhu *et al*., 2010).

Aus klinischen *E. faecium* Stämmen isolierte konjugative Plasmide sind pMG1 (65,1 kb: *aac6-aph2a*), das das „*high level*" Gentamycin-Resistenzgen trägt und die konjugativen pMG1-ähnlichen pHT Plasmide, pHTα (65,9 kb), pHTβ (63,7 kb) sowie pHTγ (66,5 kb), die das Tn*1546*-ähnliche *van*A Transposon kodieren. Der Vergleich der Sequenzen von pMG1 und pHTβ zeigte, dass 61 der 73 pMG1 Orfs (*open reading frame*) fast identisch mit denen aus pHTβ sind (90-100% auf der Aminosäure Ebene). In beiden Plasmiden zeigen 22 Orfs Ähnlichkeiten mit Orfs auf dem Plasmid pXO2 (96,2 kb) aus *B. anthracis*, das Virulenzgene für die Kapselbildung kodiert (Tanimoto and Ike, 2008).

In *E. faecium* häufig vorkommende Plasmide sind pRUM und pRUM-ähnliche Plasmide. Das Plasmid pRUM kodiert Resistenzgene gegen Erythromycin, Chloramphenicol, Streptomycin und Streptothricin. Die letzteren beiden Resistenzen sind von Genen kodiert, die hoch konserviert und auf Tn*5405* lokalisiert sind (Palmer *et al*., 2010).

Weitere nur in *Enterococcus* Spezies vorkommende konjugative Plasmide sind die Pheromon-abhängigen Plasmide, die in ihrer Größe von 37 bis 128 kb variieren. Diese Plasmide besitzen einen besonderen auf Pheromonen basierten Konjugationsmechanismus, der auf diese Gattung beschränkt ist. Ein Vertreter konjugativer Pheromonplasmide ist pAD1 (59,6 kb; *hyl*/*bac*, *uvr*) aus *E. faecalis* DS16, das für Cytolysin (*hyl*/*bac*) Produktion und Resistenz gegen UV Strahlung (*uvr*) kodiert. Cytolysin ist fähig Bakterien und rote Blutkörperchen zu lysieren. Weitere Plasmide sind pCF10 (67,6 kb; *tet*M, *uvr*) aus *E. faecalis* und pTEF1 (66,3 kb; *aac6-aph2a*, *erm*B) sowie pTEF2 (57,6 kb) aus *E. faecalis* V583 (*van*B) (Wardal *et al*., 2010; Hirt *et al*., 2005; Paulsen *et al*., 2003; Francia *et al*., 2001). Zheng *et al*. (2009) konnten aus klinischen *E. faecalis* NKH15 Stamm zwei konjugative Pheromonplasmide isolieren, pMG2200 (106 kb), das das *van*B Gen kodiert und pMG2201 (65,7 kb), das Erythromycinresistenz und

Cytolysin kodiert. Das Plasmid pMG2200 besitzt Sequenzähnlichkeiten mit den Pheromonplasmiden pCF10, pAD1, pTEF2 und anderen Plasmiden.
Pheromonplasmide konnten in geringem Umfang auch in *E. faecium* nachgewiesen werden. Ein Beispiel hierfür ist das konjugative Plasmid pBRG1 (~50 kb), das *van*A kodiert. Weitere Vancomycinresistenz-vermittelnde Plasmide in *E. faecium* sind pHKK100 (55 kb, konjugativ) und pHKK702 (41 kb, mobilisierbar) (Palmer *et al*., 2010; Magi *et al*., 2003).
Lim *et al*. (2006) isolierten aus *E. faecalis* Stämmen konjugative *van*A Pheromonplasmide (pSL1 und pSL2) der Größe von 128,1 kb. Das Plasmid pSL1 wurde von einem Patienten und pSL2 aus Hühnerkot isoliert. Diese Plasmide tragen außer *van*A, noch *ant(6)-Ia*, *aph3-III*, *erm*B und *aac6-aph2a* Resistenzgene, die Resistenzen gegen Vancomycin, Streptomycin, Kanamycin, Erythromycin und Gentamycin kodieren. Beide Plasmide zeigten identische Restriktionsmuster, stammen aber von unterschiedlichen Wirten, was die Möglichkeit des konjugativen Transfers zwischen Bakterien aus Hühnerkot und humanen Bakterien aus dem menschlichen Darm aufzeigt. Die Transferregion dieser Plasmide wurde noch nicht sequenziert (Wardal *et al*., 2010).

### 1.7.3 *Bacillus* Spezies

Die Gattung *Bacillus* umfasst G+, stäbchenförmige, Endosporen bildende aerobe oder fakultativ anaerobe Bakterien. Die *Bacillus cereus* (*sensu lato*) Gruppe beschreibt die genetisch sehr einheitliche Untergruppe der Gattung *Bacillus*, die *B. thuringiensis*, *B. anthracis, B. cereus* (*sensu stricto*), *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* und *B. weihenstephanensis* beinhaltet.
*B. anthracis* verursacht die schwerwiegende Krankheit Antrax (Milzbrand) und wurde in den letzten Jahren als biologische Waffe bekannt. Die Virulenzfaktoren von *B. anthracis* (Milzbranderreger) sind auf zwei Plasmiden kodiert, pXO1 (181 kb), auf dem die Gene für die Produktion und Regulation der Antraxtoxine kodiert sind und pXO2 (96 kb), das die Gene für die Kapselbildung enthält. *B. cereus* kommt überwiegend in Produktionsanlagen für Lebensmittel aufgrund seiner hoch adhäsiven Endosporen vor. Durch Virulenzfaktoren verursacht *B. cereus* zwei Arten von Magen-Darm Erkrankungen. Das Emetim-Syndrom, das durch das hitze- und säurestabile Toxin Cereulid hervorgerufen werden kann und das Diarrhoe-Syndrom, das durch Enterotoxine ausgelöst wird. Das 24 kb große Cereulid-Synthetase-Gencluster (*ces*) ist

auf einem Megaplasmid (~270 kb; pCER270) kodiert, das hohe Sequenzähnlichkeiten mit dem *B. anthracis* pXO1 Plasmid besitzt. Das Toxin ist säure- und hitzestabil, so dass ein erneutes Erhitzen der Speisen dieses nicht zerstört, wenn diese bei Raumtemperatur gelagert wurden. *B. cereus* Stämme enthalten diverse Plasmide, die in der Größe von 5 bis 500 kb variieren, aber nur eine geringe Anzahl wurde mit Pathogenese in Verbindung gebracht. Weiterhin kann *B. cereus* bei immungeschwächten Patienten Katheter-assoziierte Blutinfektionen verursachen. *B. thuringiensis* produziert ein Insektizid (δ-Endotoxin) während der Sporulierung und wird kommerziell als Bioinsektizid verwendet (Bottone, 2010; Stenfors Arnesen *et al*., 2008; Rasko *et al*., 2007, 2005).

## 1.8 Biofilme

Die bevorzugte Lebensform der Bakterien sind die Biofilme. Sie entstehen an Grenzflächen, wenn genügend Wasser, verwertbare Nährstoffe und Mikroorganismen vorhanden sind. Die Mikroorganismen sind in Biofilmen in eine Matrix aus extrazellulären Substanzen (EPS) eingebettet, die hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden besteht. Sie bietet mechanische Stabilität, vermittelt die Adhäsion an Oberflächen und bildet ein zusammenhängendes, dreidimensionales, polymeres Netzwerk, das die Zellen miteinander verbindet und vorübergehend unbeweglich macht. Weiterhin bietet sie Schutz vor Austrocknung, UV Strahlung, Antibiotika und Desinfektionsmitteln. Die Biofilm Matrix dient außerdem als externes Verdauungssystem, da sie extrazelluläre Enzyme nah bei den Zellen hält und ihnen so die Verwertung gelöster, kolloidaler und fester Biopolymere ermöglicht. Die EPS Matrix beinhaltet auch alle Komponenten lysierter Zellen, so dass auch deren DNA zur Verfügung steht und einen großen Gen-Pool für den HGT bietet. Auch durch den engen räumlichen Zell-Zell Kontakt kann es zum HGT kommen, so dass besonders Biofilme als „*hot spots*“ für HGT dienen (Flemming and Wingender, 2010; de Carvalho, 2007; Sørensen *et al*., 2005).

Biofilme findet man in der Natur, in technischen Systemen und medizinischen Bereich. Sie bewohnen lebensfeindliche Habitate wie heiße Quellen, hypersaline und saure Seen, arktische Wüsten, Heißwassersysteme in technischen Anlagen und Kühlkreisläufe in Kraftwerken. Sogar in hoch bestrahlten Bereichen von Kernkraftwerken wurden Biofilme gefunden. Sie sind an wichtigen Stoffumwandlungen in Kläranlagen zur

Abwasserreinigung und bei biologischer Altlastensanierung beteiligt. Biofilme können aber auch in der Industrie zu Kontaminationen, Korrosion und Materialabbau führen. Im medizinischen Bereich verursachen Biofilme schwer zu behandelnde chronische Infektionen, da sie sich an Kathetern, Implantaten und anderen medizinischen Hilfsmitteln anlagern und gegenüber Antibiotika Behandlung sowie der humoralen und zellulären Immunabwehr resistenter sind als in der planktonischen Phase (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; de Carvalho, 2007; Flemming and Wingender, 2001).

*Staphylococcus* Spezies wie *S. aureus* und *S. epidermidis* sind die häufigste Ursache Biofilm assoziierter Infektionen. *S. epidermidis* ist ein opportunistischer Krankheitserreger, da dieser hauptsächlich bei immungeschwächten Menschen Infektionen hervorruft. Biofilmbildung ist dabei der wichtigste Faktor in der Pathogenese von *S. epidermidis*. Im Gegensatz zu *S. aureus* fehlen *S. epidermidis* Virulenzfaktoren wie Enterotoxine, Leukozidine, α-Toxin, Protein A und ein Vielzahl an Adhäsionsfaktoren, die die Virulenz von *S. aureus* erklären. *S. epidermidis* kodiert zumindest einen Virulenzfaktor, der bei *S. aureus* nicht vorkommt, die Poly-γ-Glutaminsäure (PGA) Kapsel, die essentiell für die Virulenz von *B. anthracis* ist (Fey and Olson, 2010).

Die an der Biofilmbildung beteiligten Virulenzfaktoren sind bei *S. aureus* und *S. epidermidis* gut untersucht. Zuerst erfolgt die Anheftung der Zellen an humane Matrixproteine. Da Biomaterialien schnell mit humanen Serumproteinen überzogen werden, wie Fibrinogen, Fibronektin und Kollagen, exprimieren *S. aureus* und *S. epidermidis* die sogenannten MSCRAMMs (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*). Diese haben die Fähigkeit sich an Fibrinogen (Clf), Fibronektin (FnBp), Kollagen (Cna) und andere unterschiedliche Matrixproteine anzuheften. *S. epidermidis* expimiert das Fibrinogen-Bindeprotein SdrG und das Kollagen-Bindeprotein SdrF. Die Adhäsion an polymere Oberflächen wird durch das Autolysin Atl (homolog zu *S. epidermidis* Autolysin/Adhäsin AtlE) vermittelt sowie durch Aap/SasG (*accumulation associated protein*, *S. aureus surface protein G*), das in beiden Spezies vorkommt. Die Autolysine haben außerdem vermutlich noch die Aufgabe extrazelluläre DNA (eDNA) freizusetzen, die ein wichtiger Adhäsions/Aggregations-Faktor bei der Biofilmbildung in beiden Spezies ist. Die Biofilmaggregation wird entweder durch Polysaccharid- oder Protein-Faktoren vermittelt. Die Biosynthese von PIA/PNAG (Poly-*N*-Acetylglukosamin) erfolgt durch die Genprodukte des *ica*

(*intercellular adhesion*) Operons. PIA/PNAG bildet zusammen mit Teichonsäuren und Proteinen den Hauptteil der EPS Biofilm bildender *Staphylococcus* Spezies. Die von PIA unabhängige Biofilmbildung erfolgt vermutlich über spezifische Oberflächenproteine, wie Bap (*S. aureus*)/Bhp (*biofilm associated protein*, Bap *homologue protein*) und durch Aap. Die Biofilme, die ausschließlich aus Proteinen bestehen, sind nicht so robust wie die aus PIA/PNAG (Fey and Olson, 2010; Otto, 2009, 2008; Schroeder *et al*., 2009).

*E. faecalis* und *E. faecium* können u. a. Harnwegsinfektionen, Sepsen, Katheter-assoziierte Infektionen sowie Endokarditis verursachen. An der Pathogenese dieser Stämme sind zahlreiche Virulenzfaktoren beteiligt, die zur Biofilmbildung führen können. Diese Virulenzfaktoren dienen der Adhäsion, der Etablierung und der Ausbreitung der Erreger im Gewebe. Dabei spielen Pili eine wichtige Rolle bei der Adhäsion an humane Zellen und der Biofilmbildung. Die Pili werden durch das *ebp* Operon (*endocarditis- and biofilm associated pili*) kodiert, das sich aus den Genen *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* und einem assoziierten Sortasegen *srtC* zusammensetzt. Die Sortase C ist für die Assemblierung der Pili verantwortlich. Enterokokken besitzen zwei Klassen von Sortasen, Sortase A koppelt Proteine mit einem C-terminalen Sortasemotiv an das PG, während die Sortase C, genannt Bps (*biofilm and pilus associated sortase*) die Pilin-Untereinheiten verbindet und mit dem PG verankert. An der Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine sowie eukaryotische Zellen sind die Aggregationssubstanzen (AS) und das Esp (*enterococcal surface protein*) beteiligt. Die Besiedlung eukaryotischer Zellen erfolgt wahrscheinlich auch durch Interaktionen spezifischer Proteine in der extrazellulären Matrix mit den sogenannten MSCRAMMs. Zu diesen gehören u. a. Ace (*adhesion of collagen of E. faecalis*) und Acm (*adhesin of collagen of E. faecium*). Glykolipide sind vermutlich auch in die bakterielle Adhäsion an Wirtszellen und in die Biofilmbildung involviert. Die Gelatinase GelE ist eine Zink-Metallopeptidase, die eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung von *E. faecalis* einnimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität von GelE für die Biofilmbildung erforderlich ist. Diese kann Gelatine, Kasein, Hämoglobin und andere bioaktive Peptide hydrolysieren, so dass diese wahrscheinlich auch als Nährstoffe dienen. GelE ist vermutlich ein Autolysin, das die Biofilmbildung durch Erhöhung der Konzentration an genomischer und extrazellulärer DNA unterstützt. Die Transkription von *gelE* ist durch das Quorum Sensing (QS) System *fsr* (*faecal streptococci regulator*) reguliert und die Biofilmbildung

durch die Produktion von GelE kontrolliert (Sava *et al*., 2010; Fisher and Phillips, 2009; Theilacker *et al*., 2009; Koch *et al*., 2004).

*B. cereus* ist ein Krankheitserreger der zwei Arten von Magen-Darm-Erkrankungen hervorrufen kann, das Emetin- und Diarrhoe-Syndrom. Er kann auch gelegentlich Augeninfektionen, Meningitis, Osteomyelitis, Wundinfektionen und Septikämien verursachen. Durch die Fähigkeit zu sporulieren und bei Kühlschranktemperaturen zu wachsen, ist dieser schwer zu kontrollieren. *B. cereus* kann Biofilme bilden, was eine Rolle bei Katheter-assoziierten Infektionen spielen kann (Bottone, 2010). Für *B. cereus* wurden sogenannte *surface-layer* (S-layer, äußerste Oberflächenschicht) für die Bindung an eukaryotische Zellen identifiziert. Dieser *S-layer* schützt vor der Immunabwehr des Wirtes. Weitere Adhäsine, die an der Biofilmbildung an abiotischen Oberflächen beteiligt sind, wurden bis jetzt nicht beschrieben. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass die Verankerung der Zellen im Substrat durch hydrophile Polymere an der Zelloberfläche vermittelt wird (Karunakaran and Biggs, 2011).

## 1.9 Die ISS und Concordia Station

Raumstationen wie die International Space Station (ISS) (Novikova *et al*., 2006) oder isolierte Forschungsstationen wie die Concordia in der Antarktis (Van Houdt *et al*., 2009) stellen begrenzte Habitate inmitten einer extremen und lebensfeindlichen Umwelt dar. Sie weisen besondere Bedingungen für mikrobielles Wachstum und mikrobielle Diversität auf, da diese Systeme im Gegensatz zu offenen Ökosystemen, geschlossene und isolierte Habitate (Container) darstellen. Die ISS ist im Weltraum Temperaturen von über 100°C (Sonnenseite) bis -100°C (Erdschatten) ausgesetzt. Im Inneren herrschen Durchschnittstemperaturen von 21-23°C, die konstant gehalten werden müssen. Die Astronauten sind der Mikrogravitation, einer ständigen Beschallung von 60 dBA und einer höheren ionisierenden Strahlung als auf der Erde ausgesetzt (Thirsk *et al*., 2009).

Die Concordia Forschungsstation liegt in der Ostantarktis. Aufgrund der Witterungsverhältnisse (Sommer -20°C, im Winter sinken die Temperaturen auf -60°C, teilweise sogar auf -80°C) erfolgt die Versorgung der Station nur in den Monaten zwischen November und Februar (Antarktischer Sommer). Ab Februar sind die 13 Crewmitglieder für 9 Monate (Antarktischer Winter) komplett von der Außenwelt isoliert. Die Concordia Station wird außerdem als Modellsystem für langfristige

Weltraumflüge genutzt, um die physiologische und psychologische Adaption der Crewmitglieder auf Isolation zu untersuchen und die Dynamik der Luftkeime in einem begrenzten Habitat über ein Jahr zu überwachen (Van Houdt *et al.*, 2009).

Die Ökologie der Mikroflora des Menschen und der Umgebung in diesen „Container" Systemen wird durch die extremen Umweltbedingungen, wie Mikrogravitation, kosmische Strahlung, den begrenzten Raum mit besonderer Form von Abfall/Abwasserlagerung und Wasserrückgewinnungsanlagen (Horneck *et al.*, 2010; Novikova *et al.*, 2006) sowie von persönlicher Hygiene verändert. Eine weitere Besonderheit stellt die Tatsache dar, dass kaum neue Mikroorganismen ins System eingeschleust werden, die mit den vorhandenen in Konkurrenz treten können, wie es in einem offenen Ökosystem der Fall ist, da nur ein bedingter Austausch von Crewmitgliedern stattfindet. Die Hauptquelle der mikrobiellen Kontaminationen in „Container" Systemen ist die Mikroorganismenflora der Crew selbst, aber auch Umweltmikroorganismen sind vertreten. Diese wurden schon bei der Herstellung der Materialien für die Forschungsstationen eingebracht. Ein Teil dieser Mikroorganismen, besonders die Bakterien, sind zum horizontalen Gentransfer befähigt. Der horizontale Gentransfer (HGT) ist die Weitergabe bzw. Aufnahme von genetischem Material zwischen verschiedenen vegetativen Zellen über Speziesgrenzen hinweg (Bsp. Konjugation). Der Genaustausch erfolgt durch mobile genetische Elemente (MGE), auf denen neben den Transfergenen Virulenzfaktoren, zusätzliche Funktionen wie Resistenzen gegenüber Antibiotika oder Schwermetallen oder Fähigkeiten zum Abbau von schwer abbaubaren Substanzen (Xenobiotika) codiert sind. Diese Eigenschaften verschaffen dem Bakterium/Mikroorganismus, das diese mobilen genetischen Elemente aufgenommen hat, einen Selektionsvorteil oder die Möglichkeit besondere Habitate zu kolonisieren und führen zur Entstehung von gefährlichen human pathogenen Mikroorganismen.

Es ist seit langem bekannt, dass Weltraumflüge das Immunsystem der Crew schwächen und der menschliche Körper sich in der Schwerelosigkeit verändert: Verkleinerung der Knochen und Muskeln, die neurovestibularen und kardiovaskulären Systeme ändern sich, um sich an die Bewegung in der Schwerelosigkeit anzupassen (Williams *et al.*, 2009; McPhee und White, 2003). Diese Faktoren steigern das Risiko der Crew an Infektionskrankheiten durch opportunistisch pathogene Bakterien, oder durch

Bakterien, die die pathogenen Eigenschaften in Folge von horizontalem Gentransfer erworben haben, zu erkranken.

## 1.10 Milchsäurebakterien

Die Milchsäurebakterien (LAB) repräsentieren eine Gruppe von Organismen, deren Fähigkeit Milchsäure zu produzieren sie funktionell miteinander verbindet. LAB sind hauptsächlich G+, nicht sporulierende, fakultativ anaerobe Bakterien, die aus verschiedenen Pflanzen, Tieren und dem Menschen isoliert wurden. Sie können in sieben Gattungen unterteilt werden: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* und *Oenococcus*. Die LAB Gruppe ist die am meisten in der Lebensmittelindustrie genutzte Gruppe und spielt eine entscheidende Rolle in der Fermentation von Milchprodukten, Fleisch und Gemüse, so wie in der Produktion von Wein, Kaffee, Kakao und Sauerteig. LAB tragen erheblich zum Aroma, der Textur, dem Nährwert und der mikrobiellen Sicherheit fermentierter Produkte bei, da LAB antimikrobielle Peptide, die Bacteriocine produzieren können. Diese werden als biologische Konservierungsstoffe und als alternativen zu Antibiotika verwendet. Die LAB Bacteriocine Nisin, Pediocin PA-1 und Lacticin 3147 sind gut charakterisiert und zeigen eine starke antimikrobielle Wirkung gegen bestimmte G+ Bakterien. Einige LAB haben den Status von Probiotika, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) folgendermaßen definiert wurden: *Probiotika sind definierte lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und hierbei positive Gesundheit fördernde Wirkungen erzielen*. Probiotika wirken sich positiv auf den Magen-Darm-Trakt bei Mensch und Tier aus, da sie die Fähigkeit besitzen Magen-Darm Pathogene zu verdrängen, sich positiv auf das Immunsystem auswirken sowie antimutagen und antikanzerogen wirken. Auf der anderen Seite sind LAB, wie *Enterococcus* und *Streptococcus* Spezies, wichtige Krankheitserreger. In einigen Fällen waren *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Lactococcus* Spezies an Infektionen bei immungeschwächten Menschen beteiligt (O´Sullivan *et al*., 2009; Yoneyama *et al*., 2009; Klare *et al*., 2007; See *et al*., 2006; Heinz *et al*., 2000).

LAB Stämme, die eine langjährige Tradition in der Anwendung aufweisen, besitzen den sogenannten GRAS Status (*generally recognized as safe*). Das bedeutet, dass sie generell als sicher gelten, Lebensmittelqualität besitzen und keine gesundheitlichen Risiken für den Endverbraucher bergen. Einige Studien dokumentieren aber das Vorhandensein

von Virulenz- und Resistenzgenen in Lebensmittel assoziierten LAB. Falls diese Gene auf MGEs lokalisiert sind, wie Plasmiden, Transposons und IS-Elementen, können diese möglicherweise auf die humane oder tierische kommensale Flora sowie pathogene Bakterien übertragen werden (Klare et *al*., 2007).

Plasmide in LAB sind wichtige Bestandteile, da diese besondere industriell relevante Eigenschaften, wie Laktoseverwertung, Bakteriophagenresistenz, proteolytische Aktivität, Bakteriocinproduktion u. a. kodieren. Die konjugativen Plasmide pLgLA39 (33,3 kb), aus *Lactobacillus gasseri* LA39 und pMRC01 (60,2 kb) aus *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DPC3147 kodieren Gene für Bakteriocin Produktion und Immunität. Das Plasmid pMRC01 kodiert außerdem für Resistenz gegen den Bacteriophagen CP-1. Weitere in LAB gefundene konjugative Plasmide sind pNP40 (64,9 kb) aus *L. lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3, das Gene für Bakteriophagenresistenz, Kälteschock-Adaption, Schwermetall-Toleranz und DNA-Reparatur kodiert sowie pWCFS103 (36 kb) aus *L. plantarum* WCFS1, das Arsenresistenz kodiert. Die Lebensmittelindustrie hat sich die Konjugation zu Nutze gemacht, um optimale Starterkulturen zu schaffen (Ito *et al*., 2009; Zhu *et al*., 2009; Mills *et al*., 2005; Van Kranenburg *et al*., 2005; Hickey *et al*., 2001).

Plasmide in LAB Stämmen, die *mob* oder *tra* Gene kodieren, können den genetischen Austausch innerhalb und außerhalb der Speziesgrenzen vermitteln und so die Aufnahme von Virulenz- und Resistenzgenen begünstigen. Beispiele hierfür sind die konjugativen Plasmide pK214 aus *L. lactis* K214, das aus Rohmilchkäse isoliert wurde und pRE25 aus *E. faecalis* RE25, das aus einer Trockenwurst stammt. Auf dem Plasmid pK214 sind Resistenzen gegen Tetracyclin (*tet*S), Chloramphenicol (*cat*) und Streptomycin (*str*) kodiert, die mit Resistenzgenen aus *Listeria monocytogenes* (*tet*S) und *S. aureus* (*cat*, *str*) fast identisch sind. Auf dem Plasmid pRE25 sind Resistenzen gegen Erythromycin, Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin und Streptothricin kodiert (siehe auch Kapitel 1.7.2) (Schwarz *et al*., 2001; Perreten *et al*., 1997)

Aufgrund der weitreichenden Verwendung von LAB in der Tierfutter-, Lebensmittel- sowie Probiotikaindustrie und der weltweiten Resistenzentwicklung werden auch diese zunehmend auf erworbene Resistenzen hin untersucht. Die Nahrungskette wird als einer der Hauptübertragungswege von Antibiotikaresistenzen zwischen Tier und Mensch angesehen.

Einige Studien konnten Antibiotikaresistenzen in LAB, humanen und tierischen Ursprungs, in Isolaten aus Milchprodukten sowie in Probiotika Stämmen nachweisen.

Einige der untersuchten LAB waren u. a. gegen Gentamycin, Streptomycin, Ciprofloxacin, Tetracyclin, Erythromycin und Vancomycin resistent. *Lactobacillus* und *Pediococcus* Spezies sind natürlich Vancomycin resistent (Rodríguez-Alonso *et al*., 2009; Ammor *et al*., 2008; Hummel *et al*., 2007; Klare *et al*., 2007). Aufgrund der immer häufiger nachgewiesenen Antibiotikaresistenzen in Lebensmittel assoziierten LAB Stämmen, sollten Starterkulturen in regelmäßigen Abständen auf erworbene Resistenzen kontrolliert werden. Vor der Verwendung neuer LAB Stämme als Starterkulturen oder Probiotika, sollten diese gewissenhaft auf Resistenzdeterminanten überprüft werden. Erworbene Resistenzen können durch horizontalen Gentransfer weitergegeben werden und stellen ein erhebliches Risiko für die Gesundheit der Menschen dar.

## 1.11 Zielsetzung

Im ersten Teil dieser Arbeit sollen G+ Isolate aus Luftproben verschiedener Standorte sowie Proben der Crew von zwei Container Systemen, der Concordia Station und der ISS, hinsichtlich ihres Gehalts an mobilen genetischen Elementen, Antibiotikaresistenzen und Biofilmbildung untersucht werden. Der Fokus dieser Arbeit konzentriert sich auf Isolate der Gattungen *Staphylococcus*, *Enterococcus, Bacillus* und *Paenibacillus*. Das Ziel ist ein vollständiges Bild über den horizontalen Genpool der Isolate zu bekommen, um die durch Bakterien entstehenden Risiken für die Gesundheit der Besatzung abschätzen und durch geeignete Maßnahmen reduzieren zu können.

- Die Bestimmung der Antibiotikaresistenzen der bakteriellen ISS und Concordia Isolate soll mit Hilfe von Agardiffusionstests erfolgen. Die Isolate, die Resistenzen aufweisen, sollen danach auf Resistenzgene gegen verschiedene Antibiotikaklassen mit Hilfe von PCR untersucht werden.
- Um Plasmide in den Isolaten nachweisen zu können, sollen Plasmid-DNA Isolierungen durchgeführt werden. Dabei sollen verschiedene Methoden getestet und gegebenenfalls optimiert werden.
- Die Detektion konjugativer und mobilisierbarer Elemente in den bakteriellen Isolaten soll mittels genspezifischer PCR auf das Vorhandensein von Schlüsselgenen der Transfersysteme, wie *virD4* (*orf10*/*traK*), *virB1* (*orf7*/*traG*), *virB4* (*orf5*/*traE*) und Relaxasegene aus Plasmiden G+ Bakterien erfolgen.

- Konjugative Elemente in den ISS und Concordia Isolaten sollen durch triparentale Kreuzungen nachgewiesen werden. Bei dieser Methode soll mit Hilfe eines vermutlich konjugativen Elements ein mobilisierbares Plasmid, das einen bekannten Selektionsmarker enthält, auf einen Rezipienten übertragen werden. Diese Versuche sollen auf festen Oberflächen durchgeführt und die Bedingungen optimiert werden. Für das triparentale Mating sollen außerdem GFP-markierte mobilisierbare Plasmide eingesetzt werden. Diese Plasmide werden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dipl.-Chem. K. Arends auf der Basis des konjugativen Plasmids pIP501 entwickelt. Der Nachweis des Gentransfers soll mit Hilfe der GFP Fluoreszenz und Antibiotikaresistenztest sowie *gfp*-spezifischer PCR geführt werden. Als Rezipienten sollen verschiedene *E. faecalis* Stämme, *Staphylococcus* oder *Bacillus* Spezies verwendet werden, die nach vorherigen Versuchen sich als geeignet herausstellen. Anschließend soll die Transferfrequenz ermittelt werden.
- Mit Hilfe der triparentalen Kreuzungen sollen auch mobilisierbare Plasmide in den ISS und Concordia Isolaten nachgewiesen werden. Für diese Versuche sollen bekannte konjugative Plasmide aus G+ Bakterien, wie pIP501 in *E. faecalis* und pSK41 in *S. aureus*, die die erforderlichen Transfergene kodieren, verwendet werden. Die geeigneten ISS und Concordia Isolate mit möglichen mobilisierbaren Elementen sollen anhand der vorangehenden Versuche ausgewählt werden. Als Rezipienten sollen *E. faecalis* Stämme, *Staphylococcus* oder *Bacillus* Spezies verwendet werden, die geeignete Selektionsmarker enthalten.
- Anhand der biparentalen Kreuzungsexperimente soll überprüft werden, ob die in den Isolaten detektierten Resistenzgene mittels Konjugation auf einen Rezipienten übertragen werden können. In diesem Experiment müssen die für den Gentransfer erforderlichen Gene in den ISS und Concordia Isolaten enthalten sein. Als Rezipienten sollen wieder geeignete *E. faecalis* Stämme, *Staphylococcus* oder *Bacillus* Spezies verwendet werden.
- Weiterhin sollen die Isolate auf ihre Fähigkeit hin Biofilme ausbilden zu können, untersucht werden. Dabei soll zuerst ein Standard-Biofilm-Screening in Mikrotiterplatten mit verschiedenen Medien durchgeführt werden, um

mögliche Biofilmbildner zu erhalten, die dann in Biofilmreaktoren auf Biofilmbildung getestet werden.

- Die Biofilmreaktoren sollen zuerst etabliert und an die Bedürfnisse der *Staphylococcus*, *Enterococcus* und *Bacillus* Isolate angepasst werden. Es sollen die optimalen Bedingungen für Wachstum und Biofilmbildung bezüglich Medium, Dauer und Aufwuchsmaterial herausgefunden werden. Zuerst sollen einzelne Spezies auf Biofilmbildung untersucht werden. Dabei sollen möglichst Isolate ausgewählt werden, die potentielle konjugative oder mobilisierbare Elemente, Plasmide und Antibiotikaresistenzen besitzen.
- Die Biofilmbildung soll durch Lektin-Bindungs Assay verifiziert werden.
- Erfolgreiche Monospezies Biofilmreaktoren sollen dann in Zweispezies und Multispezies Kombinationen auf Biofilmbildung untersucht werden. Es soll herausgefunden werden, ob die Isolate gemeinsam gemischte Biofilme ausbilden können. Der Nachweis aller Spezies in den Biofilmreaktoren soll durch Antibiotikaresistenzen oder unterschiedliche Zellmorphologie im Mikroskop erfolgen.
- Isolate, die Biofilm im Reaktor ausbilden können und Gentransfereigenschaften besitzen, sollen auf die Fähigkeit zum Gentransfer in Biofilmen hin untersucht werden. Es sollen triparentale Matings im Biofilmreaktor mit dem mobilisierbaren GFP-markierten Plasmid etabliert werden. Es sollen regelmäßig Proben gezogen werden und die Plasmidtransferereignisse mit GFP Fluoreszenz, *gfp*-spezifischer PCR und Antibiotikaselektion nachgewiesen werden.

Die in diesem Projekt gewonnenen Erkenntnisse sollen die erste Abschätzung der Infektionsgefahr und der Entstehung von multiresistenten Krankheitserregern durch Gentransfer in Container Systemen wie der ISS und Concordia Forschungsstation darstellen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen 100 Antibiotika resistente Milchsäurebakterien, die aus traditionell hergestellten türkischen Milch- und Fleischprodukten isoliert wurden auf mobile genetische Elemente und Antibiotika-Resistenzgene untersucht werden. Das Gesamtziel des Projektes ist die Analyse der Lebensmittelsicherheit dieser Antibiotika resistenten LAB Stämme.

- 100 Antibiotika resistente Milchsäurebakterien sollen auf Resistenzgene aus sechs Antibiotikaklassen mittels PCR untersucht werden.
- Der Nachweis von Transfergenen in den LAB Isolaten soll mit Hilfe genspezifischer PCR auf Relaxasegene sowie *virD4* (*orf10/traK/trsK*), *virB1* (*orf7/traG*) und *virB4* (*orf5/traE/trsE*) homologe Gene von unterschiedlichen Plasmiden aus G+ Bakterien untersucht werden.
- Der Nachweis konjugativer oder mobilisierbarer Plasmide in den LAB Stämmen soll durch biparentale und triparentale Matingexperimente mit Hilfe eines mobilisierbaren GFP-markierten Plasmides erfolgen.
- Um Plasmide in den LABs nachzuweisen, sollen Plasmid-DNA Isolierungen durchgeführt und falls erforderlich optimiert werden.
- LAB Stämme in denen Resistenz- und/oder Transfergene detektiert werden, sollen durch 16S rDNA Sequenzierung phylogenetisch bestimmt werden.

Diese Ergebnisse sollen eine Einschätzung bezüglich des Risikos des Gentransfers von Resistenzgenen nach Verzehr der entsprechenden Lebensmittel ermöglichen und bei der Beurteilung der Lebensmittelsicherheit dieser Bakterien helfen.

# 2 MATERIAL UND METHODEN

## 2.1 Material

### 2.1.1 Chemikalien, *Kits* und Hilfsmittel

| | |
|---|---|
| Agar Agar | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Agarose | peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Ampicillin | MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich |
| Bacto™ Agar | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| BHI (*Brain Heart Infusion*) | CondaLab, Madrid, Spanien |
| Borsäure | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Merck KGaA, Darmstadt |
| Chloramphenicol | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| *DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acid* | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| dNTPs (100 mM) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| EDTA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Erythromycin | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Essigsäure | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| FITC-WGA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Formamid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Fuji Medical X-Ray Film-Super RX | FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf |
| Fusidinsäure | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Glycerin | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Hefeextrakt | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| *High Pure PCR Template Preparation Kit* | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| $KH_2PO_4$ | Merck KGaA, Darmstadt |
| M17 Medium | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Maleinsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| MRS (*de Man, Rogosa and Sharpe broth*) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| $Na_2HPO_4$ | Merck KGaA, Darmstadt |
| $NaH_2PO_4$ | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumcitrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumhydroxid | Merck KGaA, Darmstadt |
| Nylonmembran (positiv geladen) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| *PCR DIG Probe Synthesis Kit* | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Propidiumiodid (PI) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |

| | |
|---|---|
| Rifampicin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Röntgen-Fixierlösung | TETENAL AG & Co. KG, Norderstedt |
| Röntgen-Rapid-Entwickler | TETENAL AG & Co. KG, Norderstedt |
| Saccharose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Salzsäure | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Spectinomycin | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Streptomycin | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Tetracyclin | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| THB (*Todd Hewitt broth*) | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| Tris | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Trypton | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Vancomycin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |

### 2.1.2 Enzyme, Antikörper und Standards

| | |
|---|---|
| *Gentherm*™ DNA Polymerase [5 U·µL$^{-1}$] | Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNA Diagnostika mbH, Berlin |
| Opti*Taq* Polymerase [5 U·µL$^{-1}$] | Roboklon GmbH, Berlin |
| Paq5000™ DNA Polymerase [5 U·µL$^{-1}$] | Agilent Technologies GmbH, Böblingen |
| Lysozym [100 mg·mL$^{-1}$] | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Lysostaphin [1,5 U·µL$^{-1}$] | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Mutanolysin [1 U·µL$^{-1}$] | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Anti-DIG-AP | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| 1 kb DNA Marker | New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.; MolekularBiologisches & Biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld |
| 100 bp DNA Marker | New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.; MolekularBiologisches & Biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld |
| λ DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII Marker | MolekularBiologisches & Biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld |
| BAC Supercoiled Marker | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |

Größenangaben und Abbildungen der DNA-Standards sind im Anhang unter 7.1 beigefügt.

### 2.1.3 Antibiotika-Plättchen für Agardiffusionstest

Die Antibiotika-Plättchen wurden von der Firma Oxoid Deutschland GmbH (Wesel) bezogen.

| | |
|---|---|
| Ampicillin | Amp 25 µg |
| Chloramphenicol | Cat 10 und 30 µg |
| Erythromycin | Erm 10 und 30 µg |
| Gentamycin | Genta 10 µg |
| Kanamycin | Kan 30 µg |
| Oxacillin | Oxa 5 µg |
| Streptomycin | Strep 25 µg |
| Tetracyclin | Tet 10 µg |
| Vancomycin | Van 5 und 30 µg |

### 2.1.4 Geräte

| | |
|---|---|
| Hybridisierungsofen OV 3 | Biometra GmbH, Göttingen |
| Inkubator 30°C | Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Inkubator 37°C | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| PCR-Cycler | peqSTAR (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)<br>Primus (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)<br>Primus 96 plus (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) |
| pH-Meter HI 931400 | HANNA Instruments GmbH, Kehl am Rhein |
| Photometer | HACH LANGE GmbH, Berlin |
| Rotoren | GSA für RC-5B<br>SS34 für RC-5B |
| Rührer | IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Sterilbank | Herasafe (12) (Heraeus Holding GmbH, Hanau) |
| TB1 Thermoblock | Biometra GmbH, Göttingen |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf AG, Hamburg |
| Vortexer | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kelheim |
| Waage | Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern |
| Wasserbad | JULABO Labortechnik GmbH, Sellbach |
| Zentrifugen | *Centrifuge* 5714C (Eppendorf AG, Hamburg)<br>RC-5B *Refrigerated* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)<br>MIKRO 200R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen) |

## 2.1.5 Mikroorganismen

In der Tabelle 2.1 sind die bakteriellen Isolate der ISS und CONCORDIA Station aufgelistet, die aus der Stammsammlung von Herrn Prof. Max Mergeay und Dr. Rob Van Houdt (Belgian Nuclear Research Centre SCK·CEN in Mol, Belgien) zur Verfügung gestellt wurden. T0 (13. Dezember 2004) bezeichnet den ersten Monat der Inbetriebnahme der Station, T1 (9. Januar 2005) den Besuchszeitraum der Station, T2 (7. März 2005) den ersten Monat des Antarktischen Winters und somit des geschlossenen Systems, T3-T10 (Ende März-Oktober 2005) Antarktischer Winter und somit geschlossenes System, T11 (November 2005) und T12 (Dezember 2005) offenes System und Beginn des antarktischen Sommers. Die Abkürzung T0B bezeichnet die Probenahme von den Crewmitgliedern im September 2004, vor der Inbetriebnahme der Station. Es wurden Luftproben (Air/R/Plate) sowie Proben von der Crew (HA/IJ/IL) entnommen (Van Houdt *et al*., 2009). Falls nicht anders angegeben, erfolgte die Identifizierung der Stämme über VITEK 2 Compact (bioMérieux, Brüssel, Belgien). Fehlende Nummern kommen dadurch zustande, dass die 16S rDNA Sequenzierung diese Stämme nachträglich als nicht *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* oder *Paenibacillus* Spezies identifiziert hat, so dass diese Stämme nicht verwendet wurden.

**Tab. 2.1: Verwendete ISS und Concordia Isolate**

| TU Nr.: | Spezies[a] | SCK·CEN Nummerierung[b] | Quelle |
|---|---|---|---|
| 1 | *B. cereus s.l.* (16S) | T0-Air6-1 | Concordia |
| 4 | *B. licheniformis* | T0-Air7-3 | Concordia |
| 5 | *B. cereus s.l.* (16S) | T0-Air8-1 | Concordia |
| 6 | *B. megaterium* (16S) | T0-Air8-9 | Concordia |
| 10 | *B. subtilis* (16S) | T0B-C5-HA37-7 | Concordia |
| 12 | *B. cereus s.l.* (16S) | T0B-C6-HA37-1 | Concordia |
| 13 | *B. firmus* (16S) | T11-Air1-1 | Concordia |
| 14 | *B. cereus s.l.* (16S) | T11-Air2-1 | Concordia |
| 15 | *Paenibacillus* sp (16S) | T2-Air5-8 | Concordia |
| 17 | *B. megaterium* (16S) | T2-Air7-2 | Concordia |
| 20 | *B. lentus* | T3-Air3-7 | Concordia |
| 23 | *B. flexus* (16S) | T3-Air7-3 | Concordia |
| 24 | *B. psychrodurans* (16S) | T4-Air1-6 | Concordia |
| 25 | *B. simplex* (16S) | T5-Air1-1 | Concordia |
| 27 | *B. firmus* (16S) | T5-Air6-2 | Concordia |
| 29 | *B. circulans* (16S) | T5-Air8-1 | Concordia |
| 30 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T5-Air8-3 | Concordia |
| 31 | *B. circulans* (16S) | T5-Air8-4 | Concordia |
| 32 | *B. circulans* (16S) | T6-Air2-4 | Concordia |
| 33 | *B. cereus s.l.* (16S) | T6-Air5-1 | Concordia |
| 34 | *B. cereus s.l.* (16S) | T8-Air6-4 | Concordia |
| 36 | *B. circulans* (16S) | T8-Air8-3 | Concordia |
| 37 | *B. cereus s.l.* (16S) | T9-Air1-1 | Concordia |
| 38 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T9-Air1-4 | Concordia |

[a](16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK
[b]Air: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew

**Tab. 2.1: Fortsetzung**

| TU Nr.: | Spezies[a] | SCK·CEN Nummerierung[b] | Quelle |
|---|---|---|---|
| 39 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T9-Air5-1 | Concordia |
| 40 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T8-Air6-5 | Concordia |
| 41 | *S. aureus* | R87 | ISS |
| 42 | *B. cereus s.l.* | T0-C1-HA28-1 | Concordia |
| 45 | *S. aureus* | T5-Air3-1 | Concordia |
| 46 | *S. aureus* | T5-Air7-8 | Concordia |
| 47 | *S. aureus* (16S) | R42 | ISS |
| 48 | *S. epidermidis* | R56 | ISS |
| 49 | *S. epidermidis* | R61 | ISS |
| 50 | *S. hominis* sp. | T0-C1-HA37-2 | Concordia |
| 52 | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA28-3 | Concordia |
| 53 | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA37-2 | Concordia |
| 54 | *S. epidermidis* | T10-Air8-2 | Concordia |
| 55 | *S. epidermidis* | T11-Air2-8 | Concordia |
| 56 | *S. epidermidis* | T4-Air8-1 | Concordia |
| 57 | *S. epidermidis* | T6-Air1-4 | Concordia |
| 58 | *S. epidermidis* (16S) | R12 | ISS |
| 60 | *S. epidermidis* | Plate5 iso2 | ISS |
| 61 | *S. capitis* subsp. *capitis* (16S) | T11-Air4-7 | Concordia |
| 62 | *S. epidermidis* (16S) | T0-C3-HA28-3 | Concordia |
| 64 | *S. epidermidis* | R75 | ISS |
| 65 | *S. epidermidis* | Plate8 iso1 | ISS |
| 66 | *S. epidermidis* | Plate10 iso12 | ISS |
| 67 | *S. aureus* | T0-C2-HA28-5 | Concordia |
| 68 | *S. aureus* | T0-C2-HA37-4 | Concordia |
| 69 | *E. faecalis* | Plate10 iso10 | ISS |
| 70 | *E. faecalis* | Plate10 iso11 | ISS |
| 71 | *E. faecalis* | Plate10 iso14 | ISS |
| 72 | *E. faecalis* | Plate10 iso16 | ISS |
| 73 | *E. faecalis* | Plate10 iso18 | ISS |
| 74 | *E. faecalis* | Plate10 iso2 | ISS |
| 75 | *E. faecalis* | Plate10 iso3 | ISS |
| 76 | *E. faecalis* | Plate10 iso4 | ISS |
| 77 | *E. faecalis* | Plate10 iso5 | ISS |
| 78 | *E. faecalis* | Plate10 iso7 | ISS |
| 79 | *E. faecalis* | Plate10 iso8 | ISS |
| 80 | *E. faecalis* | Plate10 iso9 | ISS |
| 81 | *S. aureus* | T0B-C4-HA37-3 | Concordia |
| 83 | *Microbacterium* sp. (16S) | T4-Air3-1 | Concordia |
| 85 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T3-Air3-4 | Concordia |
| 86 | *S. warneri* | T3-Air4-1 | Concordia |
| 87 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T3-Air7-2 | Concordia |
| 88 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T4-Air2-1 | Concordia |
| 89 | *S. capitis* | T4-Air4-2 | Concordia |
| 90 | *S. warneri* | T4-Air6-2 | Concordia |
| 91 | *S. cohnii* subsp *urealyticum* | T4-Air6-3 | Concordia |
| 92 | *S. warneri* | T4-Air7-1 | Concordia |
| 93 | *S. capitis* | T6-Air5-3 | Concordia |
| 94 | *S. haemolyticus* | T8-Air7-1 | Concordia |
| 95 | *S. saprophyticus* | T11-Air3-3 | Concordia |
| 96 | *S. pasteuri* | T0-C3-HA28-2 | Concordia |
| 97 | *S. pasteuri* (16S) | T0-C4-HA28-1 | Concordia |
| 98 | *Staphylococcus* sp (16S) | T0-C4-HA28-3 | Concordia |
| 99 | *S. saprophyticus* (16S) | R13 | ISS |
| 100 | *S. lugdunensis* | R76 | ISS |
| 101 | *S. lugdunensis* (16S) | 4IJ-4 | ISS |
| 103 | *S. haemolyticus* (16S) | 5IL-2 | ISS |
| 104 | *S. aureus* (16S) | 6OD-2 | ISS |
| 105 | *S. pasteuri* | T0-C6-HA28-5 | Concordia |
| 106 | *S. haemolyticus* (16S) | T0B-C2-HA37-3 | Concordia |
| 108 | *S. hominis* (16S) | R44 | ISS |

[a](16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK
[b]Air/R/Plate: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Plate: Isolate einer bestimmten Agarplatte

**Tab. 2.1: Fortsetzung**

| TU Nr.: | Spezies[a] | SCK·CEN Nummerierung[b] | Quelle |
|---|---|---|---|
| 109 | *S. haemolyticus* | R69 | ISS |
| 110 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | 7IL-2 | ISS |
| 111 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T0-Air1-1 | Concordia |
| 112 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T2-Air 5-1 | Concordia |
| 113 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T2-Air 5-3 | Concordia |
| 114 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T2-Air 7-1 | Concordia |
| 115 | *S. capitis* | T3-Air 2-3 | Concordia |
| 116 | *S. epidermidis* | T5-Air 4-3 | Concordia |
| 117 | *S. epidermidis* (16S) | T6-Air 1-5 | Concordia |
| 118 | *S. epidermidis* (16S) | T6-Air 2-1 | Concordia |
| 119 | *S. epidermidis* (16S) | T6-Air 2-2 | Concordia |
| 120 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T6-Air 2-3 | Concordia |
| 121 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T9-Air2-4 | Concordia |
| 122 | *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (16S) | T9-Air5-2 | Concordia |
| 123 | *S. capitis subsp. capitis* (16S) | T11-Air2-3 | Concordia |
| 124 | *S. epidermidis* (16S) | T11-Air4-3 | Concordia |
| 125 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T12-Air2-1 | Concordia |
| 126 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T12-Air2-2 | Concordia |
| 127 | *S. epidermidis* | T0-C1-HA28-3 | Concordia |
| 128 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T0-C2-HA28-4 | Concordia |
| 130 | *S. epidermidis* (16S) | T0-C6-HA28-3 | Concordia |
| 131 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T0-C1-HA37-1 | Concordia |
| 132 | *S. pasteuri* (16S) | T0-C3-HA37-1 | Concordia |
| 133 | *S. capitis* subsp. *capitis* (16S) | T0B-C1-HA37-4 | Concordia |
| 134 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* (16S) | T0B-C2-HA37-2 | Concordia |
| 135 | *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (16S) | T0B-C2-HA37-4 | Concordia |
| 136 | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA37-3 | Concordia |
| 137 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T0B-C4-HA28-4 | Concordia |

[a](16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK
[b]Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew

In der Tabelle 2.2 sind ausgewählte Milchsäurebakterien (LAB) aus türkischen Lebensmitteln aufgelistet. Diese Bakterienstämme wurden aus traditionell hergestellten Milchprodukten sowie auf den Märkten verkauften Lebensmitteln von der türkischen Kooperationspartnerin (Prof. Dr. Zerrin Ergýnkaya, Cukurova University, Adana, Türkei) isoliert und auf Antibiotikaresistenzen getestet. Vollständige Listen der LAB sind im Anhang unter 7.2 zu finden. Pastirma ist stark gewürztes Rinder-Dörrfleisch, Tulum ein Schafskäse und Çökelek ein Quark.

**Tab. 2.2: Milchsäurebakterien aus türkischen Lebensmitteln**

| Stamm | Produkt | Quelle | Mikroskopie | Resistenzen |
|---|---|---|---|---|
| LAB5 | Tulum Käse, 8 Monate alt | Markt | Stäbchen | C, V, T |
| LAB10 | Türkische Wurst,15 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Kokken | C, V |
| LAB11 | Pastirma, 30 Tag alt | Metzger | Kokken | N, C, V |
| LAB12 | Pastirma, 45 Tage alt | Metzger | Kokken | N, C, V |
| LAB13 | Türkische Wurst, 11 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Stäbchen | C, V |
| LAB14 | Türkische Wurst, 20 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Stäbchen | C, V |
| LAB15 | Türkische Wurst, 15 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Stäbchen | C, V |
| LAB16 | Türkische Wurst, 13 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Kokken | N, C, V |
| LAB17 | Türkische Wurst, 16 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Stäbchen | C, V |
| LAB18 | Türkische Wurst, 30 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Kokken | C, V |
| LAB19 | Türkische Wurst, 22 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Stäbchen | C, V |

N-Nitrofurantoin 300 µg; C-Ciprofloxacin 5 µg; V-Vancomycin 30 µg; T-Tetracyclin 30µg; G-Gentamycin 10µg; A-Ampicillin 10µg; E-Erythromycin 15µg; R-Rifampicin 5µg

**Tab. 2.2: Fortsetzung**

| Stamm | Produkt | Quelle | Mikroskopie | Resistenzen |
|---|---|---|---|---|
| LAB20 | Türkische Wurst, 22 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Kokken | N, C,V |
| LAB21 | Pastirma, 45 Tage alt | Metzger | Stäbchen | N, C, V |
| LAB22 | Türkische Wurst, 18 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Kokken | N, C, V |
| LAB23 | Türkische Wurst, 22 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Stäbchen | C, V |
| LAB24 | Pastirma, 45 Tage alt | Metzger | Stäbchen | C, V, |
| LAB25 | Türkische Wurst, 30 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Kokken | N, C, V |
| LAB26 | Türkische Wurst, 16 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Kokken | N, C, V |
| LAB27 | Türkische Wurst, 17 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Kokken | C, V |
| LAB28 | Pastirma , 32 Tage alt | Metzger | Kokken | N, C, V |
| LAB29 | Türkische Wurst, 22 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Kokken | N, C, V |
| LAB43 | Türkische Wurst, 15 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Stäbchen | C, V |
| LAB45 | Türkische Wurst, 15 Tage alt | kleinbetriebliche Herstellung | Kokken | C, V, G |
| LAB54 | Yoghurt, 10 Tage alt | Markt | Stäbchen | V, E, T, A, C, G |
| LAB57 | Çökelek, 7 Tage alt | Markt | Stäbchen | C, V, G |
| LAB58 | Weißkäse, 30 Tage alt | Markt | Stäbchen | C, V |
| LAB66 | Weißkäse, 9 Monate alt | Markt | Stäbchen | V, E |
| LAB72 | Tulum Käse, 20 Tage alt | Markt | Stäbchen | V, E |
| LAB76 | Weißkäse, 8 Monate alt | Markt | Stäbchen | C, V |
| LAB77 | Çökelek, 6 Tage alt | Markt | Stäbchen | E, G |
| LAB79 | Weißkäse, 7 Monate alt | Markt | Kokken | C, V, E, R |
| LAB82 | Çökelek, 30 Tage alt | Markt | Stäbchen | C, V, G |
| LAB84 | Çökelek, 30 Tage alt | Markt | Kokken | C, V, G |
| LAB87 | Çökelek, 90 Tage alt | Markt | Stäbchen | C, V, G |
| LAB89 | Çökelek, 90 Tage alt | Markt | Kokken | C, V, G |
| LAB95 | Weißkäse, 1 Monat alt | Markt | Stäbchen | C, V, G, N |

N-Nitrofurantoin 300 µg; C-Ciprofloxacin 5 µg; V-Vancomycin 30 µg; T-Tetracyclin 30µg; G-Gentamycin 10µg; A-Ampicillin 10µg; E-Erythromycin 15µg; R-Rifampicin 5µg

**Tab. 2.3: Referenzen für das Screening auf Resistenz- und Transfergene**

| Stammbezeichnung | Genotyp | Quelle/Referenz |
|---|---|---|
| *Bacillus subtilis* | | |
| BP662 | pBD90 [*erm*D], *trpC2, thr-5* | Gryczan *et al*. (1984) |
| BD1156 | pBD370 [*erm*G], *leu, mer, hisH* | Monod *et al*. (1987) |
| *Campylobacter jejuni* | *tet*O | Böckelmann *et al*. (2009) |
| *Enterobacter cloacae* | | |
| DSM46348 | *amp*C | DSMZ |
| *Enterococcus casseliflavus* | | |
| UC73 | *aph(2)-Id, van*C | Perreten *et al*. (2005) |
| *Enterococcus faecalis* | | |
| DS16 | *tet*M; Plasmide: pAD1, pAD2 | Tomich *et al*. (1979) |
| RE25 | pRE25 [*erm*B, $cat_{pIP501}$, *aph3-III*, *sat4*, *ant(6)-Ia*, $tra^{+}$]; *tet*M | Schwarz *et al*. (2001) |
| V583 | *van*B, $Kan^{R}$, $Strep^{R}$, ß-Lactam-$AB^{R}$ Plasmide: pTEF1, pTEF2, pTEF3 | Paulsen *et al*. (2003) |
| JH2-2 | pIP501 [$cat_{pIP501}$, *erm*B, $tra^{+}$] | Evans and Macrina (1983) |
| *Enterococcus faecium* | | |
| pJS42 | *mobA* | Garcia-Migura *et al*. (2009) |
| SF11770 | *aac(6)-Im, aph(2)-Ib, aac(6)-Ii, ant(4)-Ia, ant(6)-Ia, aph3-III, erm*B, *sat4, tet*L, *tet*M, *van*A, *van*Z | Perreten *et al*. (2005) |
| DSM17050 | *van*A | DSMZ |
| *Lactococcus lactis* | | |
| K214 | pK214 [*tet*S, $cat_{LM}$, *mdt*(A), *str*] | Perreten *et al*. (2005) |
| pCOM9 | *ltrB* | Klein *et al*. (2004) |
| *Lactobacillus casei* | | |
| plca36 | *trsE*, *trsK*, pLTK13 Relaxase | Zhang *et al*. (2008) |

$Kan^{R}$: Kanamycin, $Strep^{R}$: Streptomycin; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

**Tab. 2.3: Fortsetzung**

| Stammbezeichnung | Genotyp | Quelle/Referenz |
|---|---|---|
| *Staphylococcus aureus* | | |
| pT181 | *tet*K, Pre-Relaxase | Iordanescu (1976) |
| SK5428 | SK982/pSK41 [*aadD*, *aac(6)-Ie-aph(2´)-Ia*, *ble*, *qacC*, *tra*$^{+}$] | Firth *et al*. (1993) |
| DSM13661 | *mec*A | DSMZ |
| RN7242 | pGO1 [*aadD*, *aac(6)-Ie-aph(2´)-Ia*, *ble*, *dfr*(A), *qacC*, *tra*$^{+}$] | Caryl and O´Neill (2009) |
| *Staphylococcus haemolyticus* | | |
| VPS617 | *tet*K, *mph*(C), *erm*C, *msr, blaZ, mec*A, *dfr*(A), *aph3-III, aph(2)-Ia, aac(6)-Ie, ant(6)-IaInorA, sat4* | Perreten *et al*. (2005) |
| *Streptococcus pneumoniae* | | |
| T4500 | pC194 [$cat_{pC194}$, *copR*], *tet*1 *hex*4 T4 *mal*594 | Horinouchi and Weisblum (1982) |

Kan$^{R}$: Kanamycin, Strep$^{R}$: Streptomycin; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

**Tab. 2.4: Weitere verwendete Bakterienstämme**

| Stammbezeichnung | Genotyp | Quelle/Referenz |
|---|---|---|
| *Escherichia coli* | | |
| XL10 | pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP [$orf1_{pIP501}$, $P_{nisA}$-*gfp-oriT*$_{pIP501}$, Erm$^{R}$] | Arends (2010) |
| XL10 | Tet$^{R}$ Δ(*mcrA*)*183* Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*) *173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F´ *proAB lacI*$^{q}$*ZΔM15* Tn*10*(Tet$^{R}$) Amy Cat$^{R}$] | Agilent Technologies |
| *Enterococcus faecalis* | | |
| JH2-2 | Rif$^{R}$, Fus$^{R}$ | Jacob und Hobbs (1974) |
| OG1X | Strep$^{R}$, Protease-negativ | Ike *et al*. (1983) |
| OG1X | pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP [$P_{nisA}$-$orf1_{pIP501}$, $P_{nisA}$-*gfp-oriT*$_{pIP501}$, Erm$^{R}$] | Arends (2010) |
| OG1X | pVA-GFP [$P_{nisA}$-*gfp-oriT*$_{pIP501}$, Kan$^{R}$] | Arends (2010) |
| OG1X | pMSP-*orf1*-GFP [$P_{nis}$-$orf1_{pIP501}$, *gfp-oriT*, Erm$^{R}$] | Arends (2010) |
| CK111 | pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP [$P_{nis}$-$orf1_{pIP501}$, $P_{nisA}$-*gfp-oriT*$_{pIP501}$, Erm$^{R}$] | Arends (2010) |
| T9 | Klinisches Isolat, Tet$^{R}$ | Creti *et al.* (2006) |
| *Staphylococcus aureus* | | |
| RN4220RF | Rif$^{R}$, Fus$^{R}$ | RKI, Wernigerode |
| *Lactococcus lactis* | | |
| UW4127RF | Rif$^{R}$, Fus$^{R}$ | Werner *et al*. (2011) |

Tet$^{R}$: Tetracyclin; Cat$^{R}$: Chloramphenicol; Erm$^{R}$: Erythromycin; Kan$^{R}$: Kanamycin: Rif$^{R}$: Rifampicin; Fus$^{R}$: Fusidinsäure

## 2.1.6 Plasmide

**Tab. 2.5: Verwendete Plasmide**

| Plasmid | Replikon | Größe [kb] | Genotyp | Quelle/Referenz |
|---|---|---|---|---|
| pIP501 | pIP501 | 30,6 | *tra*$^{+}$, $cat_{pIP501}$, *erm*B | Evans and Macrina (1983) |
| pSK41 | pSK41 | 46,4 | *aadD*, *aac(6)-Ie-aph(2´)-Ia*, *ble*, *qacC*, *tra*$^{+}$ | Firth *et al*. (1993) |
| pGO1 | pSK41 | 54 | *aadD*, *aac(6)-Ie-aph(2´)-Ia*, *ble*, *dfr*(A), *qacC*, *tra*$^{+}$ | Caryl and O´Neill (2009) |
| pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP | pAMβ1, ColE1 | 12,0 | $P_{nis}$-$orf1_{pIP501}$, $P_{nis}$-*gfp-oriT*$_{pIP501}$, Erm$^{R}$ | Arends (2010) |
| pMSP-*orf1*-GFP | pAMβ1, ColE1 | 12,4 | $P_{nis}$-$orf1_{pIP501}$, *gfp-oriT*$_{pIP501}$, Erm$^{R}$ | Arends (2010) |
| pVA-GFP | pVA380-1 | 10,1 | $P_{nis}$-*gfp-oriT*$_{pIP501}$, Kan$^{R}$ | Arends (2010) |

Erm$^{R}$: Erythromycin; Kan$^{R}$: Kanamycin

## 2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich und Eurofins MWG Operon bezogen. Die Primer wurden mit dem online verfügbaren Primer3 Programm (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) entwickelt und aus anderen Publikationen bezogen (markiert mit *).

**Tab. 2.6: Für die Detektion von Antibiotika-Resistenzgenen verwendete Primerpaare**

| Name | Sequenz (5´→3´) | Acc. No. | Position [bp] |
|---|---|---|---|
| *aac6-aph2a fw* | GCCAGAACATGAATTACACGAG | NC_005024 | 42981-43002 |
| *aac6-aph2a rev* | CTGTTGTTGCATTTAGTCTTTCC | | 43591-43509 |
| *aadD*_pSK41 *fw* | TGTCGTTCTGTCCACTCCTG | AF051917 | 21901-21920 |
| *aadD*_pSK41 *rev* | ATGAATGGACAACCGGTGAG | | 22407-22426 |
| **aph(2)-Ib fw* | AGGATGCCCTTGCATATGATGAAGCGACGT | AF207840 | 438-467 |
| **aph(2)-Ib rev* | ATCAGCATAAGGCGCCGGAAGTAGCAGAAA | | 858-887 |
| **aph(2)-Ic fw* | AGCATACAATCCGTCGAGTCGCTTGGTGAG | U51479 | 253-282 |
| **aph(2)-Ic rev* | CTGGCGCTGCAACTTGCTGAGTTCATGAAT | | 541-570 |
| **aph(2)-Id fw* | GCCATCAGAAACGTACCAAATGTCTTTCGCAGG | AF016483 | 379-411 |
| **aph(2)-Id rev* | GGCAGCTAAGGACCTGGCCCGATTTCTAAG | | 484-513 |
| **ampC fw* | GTGACCAGATACTGGCCACA | AJ005633 | 368-387 |
| **ampC rev* | TTACTGTAGCGCCTCGAGGA | | 1189-1170 |
| *aph3-III fw* | CCGCTGCGTAAAAGATAC | X92945 | 39555-39572 |
| *aph3-III rev* | GTCATACCACTTGTCCGC | | 40164-40147 |
| $cat_{pC194}$ *fw* | CGACGGAGAGTTAGGTTATTGG | NC_002013 | 1478-1499 |
| $cat_{pC194}$ *rev* | GGCCTATCTGACAATTCCTG | | 1891-1872 |
| $cat_{pIP501}$ *fw* | TGGGATAGAAAAGAATATTTTGAACAC | X65462 | 238-264 |
| $cat_{pIP501}$ *rev* | TCCAAGGAATCATTGAAATCG | | 646-626 |
| $cat_{LM}$ *fw* | CTAAAATCAATCCAAGGAATCATCG | X92946 | 22115-22139 |
| $cat_{LM}$ *rev* | GGATATGAACTGTATCCTGCTTTG | | 22405-22428 |
| **erm*B *fw* | GCATTTAACGACGAAACTGGCT | U00453 | 6796-6817 |
| **erm*B *rev* | GACAATACTTGCTCATAAGTAATGGT | | 7368-7343 |
| *erm*C *fw* | CGTAACTGCCATTGAAATAGACC | V01278 | 2555-2577 |
| *erm*C *rev* | TCCTGCATGTTTTAAGGAATTG | | 2079-2100 |
| *erm*D *fw* | CGGGCAAATATTAGCATAGACG | M29832 | 544-565 |
| *erm*D *rev* | ATTCTGACCATTGCCGAGTC | | 1007-988 |
| *erm*G *fw* | TGCAGGGAAAGGTCATTTTAC | M15332 | 785-805 |
| *erm*G *rev* | AACCCATTTCATTACAAAAGTTTC | | 1268-1245 |
| **mec*A *fw* | TAATAGTTGTAGTTGTCGGGTTTG | X52593 | 174-195 |
| **mec*A *rev* | TAACCTAATAGATGTGAAGTCGCT | | 904-881 |
| *tet*K_pT181 *fw* | TTTGAGCTGTCTTGGTTCATTG | CP000045 | 1398-1419 |
| *tet*K_pT181 *rev* | AGCCCACCAGAAAACAAACC | | 1918-1937 |
| **tet*M *fw* | GAACTCGAACAAGAGGAAAGC | M85225 | 1114-1134 |
| **tet*M *rev* | ATGGAAGCCCAGAAAGGAT | | 1853-1835 |
| **tet*O *fw* | GGATGGCATACAGGCACAGA | M18896 | 512-531 |
| **tet*O *rev* | GTTTGGATCATAGGGAGAGGAT | | 1249-1228 |
| *tet*S_pK214 *fw* | TGGTCAACGGCTTGTCTATG | X92946 | 27177-27158 |
| *tet*S_pK214 *rev* | AGCCCAGAAAGGATTTGGAG | | 26631-26650 |
| **van*A *fw* | GAAATCAACCATGTTGATGTAGCA | AF516335 | 4006-4029 |
| **van*A *rev* | TTTGCCGTTTCCTGTATCCGT | | 4577-4557 |
| **van*B *fw* | CCCGAATTTCAAATGATTGAAAA | L06138 | 113-135 |
| **van*B *rev* | CGCCATCCTCCTGCAAAA | | 552-569 |
| **van*C1/2 *fw* | ATGGATTGGTA**Y**T**K**GTAT | AF162694/ | 133-150/142-159 |
| **van*C1/2 *rev* | TAGCGGGAGTG**M**C**Y**MGTAA | L29638 | 947-929/968-950 |

K: G/T; M: A/C; Y: C/T

**Tab. 2.7: Weitere verwendete Primerpaare**

| Name | Sequenz (5´→3´) | Acc. No. | Position [bp] |
|---|---|---|---|
| *traL*_pSK41 *fw* | ATGGGGACTATGGCAGGTAG | AF051917 | 36279-36298 |
| *traL*_pSK41*rev* | AAGTTTTGCACCACTTCCAG | | 36686-36667 |
| *traM*_pSK41*fw* | TGTTGTATGGGGAAAACAAGC | AF051917 | 36870-36890 |
| *traM*_pSK41*rev* | GCTGGGCTTATAGCRTCATC | | 37070-37051 |
| *trsE*_plca36 *fw* | AGCGATTAAA**R**GGGTTCTTTG | CP000935 | 8894-8914 |
| *trsE*_plca36 *rev* | CAATAATGGCTTCCCCAATG | | 9496-9477 |
| *trsK*_plca36 *fw* | GAGACGCGCTTATGAGTTAGG | CP000935 | 14641-14661 |
| *trsK*_plcaA36 *rev* | GCTCTGATCTTCAGGCATACG | | 15310-15290 |
| $P_{rel}$_GFP_*XmaI fw*[1] | ATACCCGGGAGAGATGGATCAATTCTG | | 8306-8329[2]<br>9607-9624[3] |
| *oriT*_kompl_*Xba rev*[1] | CGGTCTAGAGTCAGGTTAAACATATT | | 9438-9460[2]<br>8482-8498[3] |

[1] Primer wurden von Dr. Karsten Arends entwickelt
[2] markiert den Bindebereich des Primers am Plasmid pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP
[3] markiert den Bindebereich des Primers am Plasmid pVA-GFP
R: A/G

Die Primer für die Detektion der Transfergene in den bakteriellen Isolaten wurden von Dr. Karsten Arends während seiner Promotion entwickelt und sind in der Tabelle 2.8 zusammengefasst.

**Tab. 2.8: Für die Amplifizierung von Transfergenen verwendete Primerpaare**

| Name | Sequenz (5´→3´) | Acc. No. | Position [bp] |
|---|---|---|---|
| *orf5*_pIP501 *fw* | GTTTTATTTGATCCCGAAGATGAAC | L39769 | 5641-5664 |
| *orf5*_pIP501 *rev* | GCGGATTGTTGGTTATTTCTTCAA | | 6295-6274 |
| *orf7*_pIP_pRE_pSM *fw* | CAATGGGCTACAATTACCGC | AJ505823 | 605-624 |
| *orf7*_pIP_pRE_pSM *rev* | ACAAGAAGCGTACCGTCTGC | | 1058-1039 |
| *orf10*_pIP501 *fw* | TGATTCGATCGGTTGTTCAGGTAG | AJ505823 | 3683-3660 |
| *orf10*_pIP501 *rev* | CCATTAGATCGAACTTGGGACGGCT | | 2907-2931 |
| *traE*_pSK41 *fw* | TATCATTGATCC**Y**GAA**R**ATGAAT | AF051917 | 27456-27478 |
| *traE*_pSK41 *rev* | TCTTTTGT**K**ATTTCGTCCCATAA | | 28082-28060 |
| *traG*_pSK41 *fw* | GTGTTGACGGTTCGGGTATC | AF051917 | 30132-30151 |
| *traG*_pSK41 *rev* | TTTTCCGTCTGAACCTCCAC | | 30589-30570 |
| *traK*_pSK41 *fw* | TATCTAAAGACCACCCAGCTAGAG | AF051917 | 34636-34660 |
| *traK*_pSK41 *rev* | TACTTGTTTCAAACTCTACAGTAGC | | 35209-35185 |
| pIP501 *orf1 fw* | TCGAAGTGGTGAAAAATTGTATAG | L39769 | 1471-1494 |
| pIP501 *orf1 rev* | AGCATAATGTGAGCATGAGG | | 1790-1809 |
| pSK41 *pre fw* | CTGGACTAAAAGGCATGCAA | AF051917 | 20693-20674 |
| pSK41 *pre rev* | GCAGTTTTCCATCACGCATA | | 20298-20317 |
| pSK41 *nes fw* | AGCGCTAGTAGGATTAAAG | AF051917 | 10034-10016 |
| pSK41 *nes rev* | CATAATAAATGTGCGTGAGG | | 9706-9725 |
| pT181 *fw* | TCGAACAGAATTATACAGGCAA | CP000045 | 2708-2729 |
| pT181 *rev* | CTGACTTATTTGCTCATGTTTAGC | | 3105-3082 |
| pJS42 *fw* | TAATCGCTCTAAACGCTGGC | EU370688 | 3131-3112 |
| pJS42 *rev* | ATGAGCGAGAAAAGGCTCTG | | 2728-2747 |
| pLTK13 *fw* | AAGA**R**TTTAACGTGGCTTTACC | AB450918 | 12540-12519 |
| pLTK13 *rev* | TTTGTTCGCTATCGGTTTCC | | 11650-11669 |
| pRS01 *ltrB fw* | ACGCCAGGCAAAAGACTATGT | U50902 | 6786-6806 |
| pRS01 *ltrB rev* | AATTCATATTCGCCACCTGT | | 7181-7162 |
| pK214 *nel fw* | GAATTTAACGTTGCTTTGCC | X92946 | 7138-7157 |
| pK214 *nel rev* | AATTCAGCACGTTCATCACG | | 7607-7588 |
| pSMA23 *mob fw* | GGTGGGCTTGGGTAATCAT | DQ116709 | 670-688 |
| pSMA23 *mob rev* | TG**K**GGAGTACTCTCATCAAGA | | 1020-1000 |

K: G/T; Y: C/T; R: A/G

Für die Amplifizierung und Sequenzierung der 16S rDNA wurden die Universal-Primer 63 *fw* (5´-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3´) und 1387 *rev* (5´-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3´) nach Marchesi *et al.* (1998) verwendet. Der Bindebereich auf *E. coli* ATCC 11775 (Acc. No. X80725) befindet sich für 63 *fw* an der Position 34-54 bp und für 1387 *rev* an der Position 1377-1394 bp.

## 2.1.8 Verwendete PCR-Programme

| Nr. | Name | AB-Resistenz1 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 | | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] |
| | Denaturierung | 95 | 2:00 | 95 | 0:30 | | |
| | Annealing | | | 55 | 0:30 | | |
| | Elongation | | | 72 | 0:30 | 72 | 5:00 |
| | Zyklen | 1 | | 30 | | 1 | |

| Nr. | Name | AB-Resistenz2 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] |
| | Denaturierung | 95 | 2:00 | 95 | 0:30 | | |
| | Annealing | | | 52 | 0:30 | | |
| | Elongation | | | 72 | 0:30 | 72 | 5:00 |
| | Zyklen | 1 | | 30 | | 1 | |

| Nr. | Name | AB-Resistenz3 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] |
| | Denaturierung | 95 | 2:00 | 95 | 0:30 | | |
| | Annealing | | | 58 | 0:30 | | |
| | Elongation | | | 72 | 0:30 | 72 | 5:00 |
| | Zyklen | 1 | | 30 | | 1 | |

| Nr. | Name | DIG-Labeling *(van*A/B/C1/2, pJS42, *orf1, orf5, orf7, orf10, aac2-aph2a, pre*_pSK41, pT181, *nes*_pSK41) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] |
| | Denaturierung | 95 | 2:00 | 95 | 0:30 | | |
| | Annealing | | | 55 | 0:45 | | |
| | Elongation | | | 72 | 1:00 | 72 | 7:00 |
| | Zyklen | 1 | | 30 | | 1 | |

| Nr. | Name | *catLM* | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7 | | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] |
| | Denaturierung | 95 | 2:00 | 95 | 0:30 | 95 | 0:30 | | |
| | Annealing | | | | | 58 | 0:30 | | |
| | Elongation | | | 72 | 0:30 | 72 | 0:30 | 72 | 5:00 |
| | Zyklen | 1 | | 10 | | 25 | | 1 | |

| Nr. | Name | 16S rDNA | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 | | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] | T [°C] | t [m:s] |
| | Denaturierung | 95 | 2:00 | 95 | 0:30 | | |
| | Annealing | | | 56 | 0:30 | | |
| | Elongation | | | 72 | 2:00 | 72 | 10:00 |
| | Zyklen | 1 | | 30 | | 1 | |

## 2.1.9 Nährmedien und Lösungen

Alle Nährmedien, Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, in destilliertem Wasser angesetzt und sterilisiert.

### 2.1.9.1 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Agar-Platten wurden dem Medium 1,5 % Agar zugesetzt. Zur Selektion bestimmter Bakterienstämme wurden dem maximal 60°C warmen Agar die entsprechenden Antibiotika und für die GFP Induktion zusätzlich das Nisin (100 $ng \cdot mL^{-1}$) unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

| | | |
|---|---|---|
| **Luria-Bertani (LB) Medium** | Trypton | 10 g |
| (1 L) | Hefeextrakt | 5 g |
| | Natriumchlorid | 5 g |
| **NZY Medium** | Kasein | 10 g |
| (1 L) | Hefeextrakt | 5 g |
| | Natriumchlorid | 5 g |

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert. Vor der Verwendung wurden jeweils 12,5 mL steril-filtriertes 1 M $MgCl_2$ und 1 M $MgSO_4$ sowie 10 mL steril-filtrierte 2 M Glucose je Liter NZY Medium hinzugegeben.
Die Medien BHI (*Brain Heart Infusion broth*), THB (*Todd Hewitt broth*), MRS (*de Man, Rogosa and Sharp broth*) und M17 wurden nach Angaben des Herstellers hergestellt und autoklaviert.

### 2.1.9.2 Allgemeine Lösungen

**50x TAE (Tris-Acetat-EDTA), 1 Liter**

| | |
|---|---|
| 242 g | TRIS |
| 57,1 mL | Eisessig |
| 100 mL | 0,5 M EDTA, pH 8,0 |

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde als Gelpuffer 1x TAE und als Laufpuffer ½x TAE eingesetzt.

**5x TBE (Tris-Borat-EDTA), 1 Liter**

| | |
|---|---|
| 54 g | Tris |
| 27,5 g | Borsäure |
| 20 mL | 0,5 M EDTA, pH 8,0 |

**6x *Loading dye***

| | |
|---|---|
| 0,25% (w/v) | Bromphenolblau |
| 30% (w/v) | Glycerin |

**Lysozym**

10 mg·mL$^{-1}$ in TE 10/0,1

**Lysepuffer**

| | |
|---|---|
| 50 mM | NaOH |
| 0,25% (v/v) | SDS |

**PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7,4)**

| | |
|---|---|
| 3.2 mM | $Na_2HPO_4$ |
| 0,5 mM | $KH_2PO_4$ |
| 1,3 mM | KCl |
| 135 mM | NaCl |

### 2.1.9.3 Puffer für die Plasmidisolierung aus *Bacillus*, *Paenibacillus* und *Staphylococcus* Stämmen

**Lösung 1**

| | |
|---|---|
| 50 mM | Glukose |
| 25 mM | Tris |
| 10 mM | EDTA; pH 8,0 |

**Lösung 2**

| | |
|---|---|
| 0,2 M | NaOH |
| 2% (w/v) | SDS |

**Lösung 3**

| | |
|---|---|
| 3 M | Kaliumacetat pH 4,8 |

### 2.1.9.4 Puffer für die Plasmidisolierung aus Enterokokken

**TES-Puffer**

| | |
|---|---|
| 10 mM | Tris; pH 8,0 |
| 1 mM | EDTA; pH 8,0 |
| 25% | Saccharose |

### 2.1.9.5 Puffer für die Plasmidisolierung aus Milchsäurebakterien

**Lösung A**

| | |
|---|---|
| 6,7% (w/v) | Saccharose |
| 50 mM | Tris; pH 8,0 |
| 1 mM | EDTA; pH 8,0 |

**Lösung B**

| | |
|---|---|
| 200 mM | EDTA; pH 8,0 |
| 50 mM | Tris; pH 8,0 |

**Lösung C**

| | |
|---|---|
| 20% (w/v) | SDS |
| 50 mM | Tris; pH 8,0 |

**Lösung D**

| | |
|---|---|
| 2 M | Tris-HCl; pH 7,0 |

**Lösung E**

| | |
|---|---|
| 5 M | NaCl |

### 2.1.9.6 Puffer und Lösungen für den Southern Blot

**Denaturierungslösung**

| | |
|---|---|
| 0,5 N | NaOH |
| 1,5 M | NaCl |

**Neutralisationslösung**

| | |
|---|---|
| 0,5 M | TRIS-HCl, pH 7,5 |
| 3 M | NaCl |

**20x SSC Puffer (pH 7.0)**

| | |
|---|---|
| 3 M | NaCl |
| 300 mM | Natriumcitrat |

**Prähybridisierungslösung (250 ml)**

| | |
|---|---|
| 17,5 g | SDS |
| 125 mL | Formamid |
| 19,5 g | $NaH_2PO_4$ |
| 12,5 mL | 5 M NaCl |

**Hybridisierungslösung**

DIG-markierte PCR-Probe in Prähybridisierungslösung gelöst.

**Waschpuffer**

| | |
|---|---|
| 100 mM | Maleinsäure; pH 7,5 |
| 150 mM | NaCl |
| 0,3% | Tween 20 |

**Maleinsäure-Puffer (pH 7,5)**

| | |
|---|---|
| 100 mM | Maleinsäure |
| 150 mM | NaCl |

***Blocking stock solution***

| | |
|---|---|
| 10% (w/v) | Blockreagenz (Roche) in Maleinsäure-Puffer |

***Blocking* Lösung**

| | |
|---|---|
| 1% (w/v) | Blockreagenz in Maleinsäure-Puffer |

**Antikörper-Lösung**

Blocking Lösung versetzt mit Anti-DIG-Antikörper (1:10000)

**Detektionspuffer (pH 9,5)**

| | |
|---|---|
| 100 mM | TRIS-HCl |
| 100 mM | NaCl |

**2x SSC (pH 7,0)**

| | |
|---|---|
| 0,3 M | NaCl |
| 30 mM | Natriumcitrat |

***Low Stringency* Puffer**

| | |
|---|---|
| 2x | SSC |
| 0,1% | SDS |

***High Stringency* Puffer 1**

| | |
|---|---|
| 0,5x | SSC |
| 0,1% | SDS |

***High Stringency* Puffer 2**

| | |
|---|---|
| 0,1x | SSC |
| 0,1% | SDS |

**CSPD-Lösung**

CSPD 1:100 in Detektionspuffer verdünnt

# 2.2 Methoden

## 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1.1 Anzucht von *E. coli, Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* und LAB Stämmen in Flüssigmedium

Die Anzucht erfolgte mit Hilfe einzelner Kolonien, die mit einer sterilen Impföse in 5 mL Medium mit oder ohne Antibiotikum überführt wurden oder durch 50 µL einer Stammsammlungskultur. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank über Nacht bei 30°C oder 37°C unter Rotation (225 rpm). Die *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterococcus* und *Staphylococcus* Stämme wurden in BHI-Medium angezüchtet. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB oder BHI, die der LAB Stämme in MRS oder M17.

### 2.2.1.2 Kultivierung für die Stammsammlung

Frisches Medium (LB, BHI, MRS oder M17) wurde mit 4% einer Übernacht-Kultur angeimpft und bei 30°C oder 37°C, 225 rpm bis zu einer optischen Dichte ($OD_{600}$) von 0,3-0,7 kultiviert. Dieser Bakterienkultur wurde dann 40% steriles Glycerin beigemischt und für weitere 10 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.1.3 Herstellung von Zell-Lysaten als Matrize für die PCR

Aus einer Übernacht-Kultur wurden 100 µL entnommen, bei 10000 rpm 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 20 µL Lysepuffer resuspendiert und für 20 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysat 1:10 mit bidestilliertem, sterilem Wasser verdünnt. Als Matrize für die PCR dienten dann 1 µL dieser 1:10 Verdünnung.

### 2.2.1.4 Antibiotika-Resistenztest mittels Agardiffusion

Mittels eines Agardiffusionstests wurde das Resistenzverhalten der bakteriellen Isolate aus der Concordia-Station und ISS gegenüber verschiedenen Antibiotika unterschiedlicher Konzentration untersucht. Aus einer Übernacht-Kultur wurden 100 µL auf eine BHI Platte ausplattiert und mit Hilfe eines Stempels (Oxoid, Wesel,

Deutschland) Antibiotika-Plättchen (2.1.3) aufgebracht. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30°C oder 37°C für 24 Stunden. Nach der Inkubation wurden die Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt. Falls Kolonien innerhalb des Hemmhofs gewachsen waren, wurde es vermerkt, und falls nötig der Stamm auf einer Antibiotika-haltigen Agarplatte noch einmal ausgestrichen und auf die Resistenz überprüft.

#### 2.2.1.5 Resistenztest auf Festmedien

Zuerst wurden BHI-Platten mit den zu testenden Antibiotika in einer bestimmten Konzentration hergestellt. Auf diese Platten wurden 100 µL einer Übernacht-Kultur mittels Drigalski-Spatel aufgebracht und bei 30°C oder 37°C für sieben Tage inkubiert. Die Stämme wurden als sensitiv eingestuft, wenn nach einer Woche kein Wachstum auf den Platten zu verzeichnen war.

#### 2.2.1.6 Triparentale Kreuzungen auf halbfesten Oberflächen

Beim triparentalen Kreuzungs-Experiment wird ein mobilisierbares Plasmid von einem Donor II in einen Rezipienten mit Hilfe eines konjugativen Plasmids im Donor I übertragen. Von den Kreuzungs-Partnern wurden Übernacht-Kulturen angelegt. Von den Übernacht-Kulturen der Donoren I (DI) und II (DII) sowie des Rezipienten (R) wurde jeweils 1 mL abgenommen und bei 7000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen 2-mal mit 1 mL BHI-Medium gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen in 1 mL BHI resuspendiert und in ein neues BHI-Medium überführt. Die Kulturen wurden bei 37°C bis zu einer $OD_{600}$ von 0,5 bei 200 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden in einem Verhältnis (DI:DII:R) von 1:1:2 oder 1:1:10 zusammengemischt, wobei das Gesamtvolumen 1,5 mL betrug. Die Zellen wurden bei 7000 rpm für 2 min zentrifugiert. Von den Überstand wurden 1,4 mL verworfen, die Zellen in dem verbleibenden Medium resuspendiert und auf ein Filter (0,2 µm oder 0,45 µm), das auf einer BHI-Platte platziert war, aufgetragen. Die BHI-Platte wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Filter in ein Falcontube, das 1 mL 0,9% NaCl-Lösung enthielt, überführt und die Zellen mittels Vortexen von dem Filter gelöst. Von der Zellsuspension wurden Verdünnungen mit 0,9% NaCl-Lösung bis $10^{-7}$ hergestellt. Jeweils 100 µL von den Verdünnungen $10^{-6}$ bis $10^{-7}$ wurden im Doppelansatz auf den Rezipienten-Platten ausplattiert, um die genaue Zellkonzentration berechnen zu können. Die übriggebliebene unverdünnte

Zellsuspension wurde auf vier Transkonjuganten-Platten verteilt und ausgestrichen. Die Transferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro Rezipient berechnet.

#### 2.2.1.7 Biparentale Kreuzungen auf halbfesten Oberflächen

Beim biparentalen Kreuzungs-Experiment handelt es sich um die Übertragung eines konjugativen Plasmids eines Donors auf einen Rezipienten. Dieses Experiment wurde wie unter Punkt 2.2.1.6 beschrieben durchgeführt. Der einzige Unterschied ist, dass nur ein Donor und der Rezipient verwendet werden.

#### 2.2.1.8 Screening auf Biofilmbildner mittels Mikrotiterplatten-Test

Der Mikrotiterplatten-Test ist eine Standardmethode um die Biofilmbildung nachweisen zu können (Klingenberg *et al*., 2005; Christensen *et al*., 1985).
Für diesen Versuch wurden zuerst Übernacht-Kulturen von den *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus* und *Enterococcus* Stämmen angesetzt. Entsprechend eines Auftragsschemas wurden jeweils 200 µL eines Mediums (TSB, BHI, THB) in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Mit jeweils 10 µL der Übernacht-Kulturen wurden die unterschiedlichen Medien beimpft und bei Raumtemperatur (RT) ohne Schütteln für 24h inkubiert. Die Negativkontrolle enthielt nur das entsprechende Medium. Als Positivkontrollen wurden Stämme verwendet, die im Biofilmreaktor (siehe 2.2.1.9) Biofilm gebildet haben. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension abgegossen und die MT-Platte 2-mal mit je 200 µL PBS gewaschen. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte für eine Stunde bei 55°C inkubiert damit die biofilmbildenden Bakterien in den Wells fixiert werden. Nach dem Trocknen wurden in die Wells 200 µL 0,4% Kristallviolett pipettiert, 5 min bei RT inkubiert und mit Wasser ausgespült. Das gebundene Kristallviolett wurde mit 200 µL einer Ethanol/Aceton-Mischung (70/30) gelöst und im ELISA-Reader dreimal einer Absorptions-Messung bei 570 nm unterzogen. Die erhaltenen Messdaten wurden aus dem Programm Easy Win Basic 32bit in eine Windows Excel-Tabelle exportiert und die Mittelwerte aus den drei Messungen sowie Standardabweichungen bestimmt.

#### 2.2.1.9 Biofilmreaktoren

Die Biofilmreaktoren haben eine Länge von 14 cm und einen Innendurchmesser von 5 cm. Als Aufwuchsträger für die Biofilme wurden zwei verschiedene Größen von

Glaskugeln verwendet. Die 5 mm (Durchmesser) Glaskugeln dienten als Schutz vor Verstopfung der Zu-und Abläufe des Reaktors und bildeten jeweils die untere und obere Schicht. In der Mitte des Reaktors befanden sich somit die kleineren Glaskugeln, die einen Durchmesser von 3 mm haben. Die Glaskugeln besitzen eine durch Anätzen mit Fluorwasserstoffsäure teilweise aufgeraute Oberfläche. Dies bietet den Mikroorganismen eine bessere Grundlage für die Anlagerung und Biofilmbildung.

Der Biofilmreaktor wurde mit ca. 80 mL einer Übernachtkultur des jeweiligen Stammes angeimpft (Monospezies Biofilmreaktor). Für Zwei- und Multispezies Biofilmreaktoren wurden die Übernacht-Kulturen in 50 mL Medium angesetzt, ihre $OD_{600}$ gemessen und die Bakterien in gleichen Teilen vereinigt. Um mögliche Fehlanalysen zu vermeiden, wurden jeweils zwei Reaktoren parallel mit demselben Stamm angeimpft. Die Reaktoren wurden mit der Bakterienkultur 4 Stunden inkubiert, damit die Mikroorganismen Zeit hatten, sich an die Glaskugeln anzuheften. Nach Ablauf der 4 Stunden wurde der Biofilmreaktor mit dem jeweiligen Medium, aus einer 5 L-Mediumflasche über eine peristaltische Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 11-12 mL/h versorgt. Das Medium wurde durch konstantes Rühren belüftet. Über eine zweite Pumpe (Kreislaufpumpe) erfolgte eine Umwälzung des sich im Reaktor befindlichen Mediums und der Biomasse mit einer Geschwindigkeit von 2,2-2,7 L/h. Dies steigerte den Durchfluss des Mediums im Reaktor und übte außerdem Druck auf die Bakterien aus, sich an die Glaskugeln anzuheften. Das verbrauchte Medium wurde in einen Abfallbehälter geleitet (siehe Abb. 2.1). Der Reaktorlauf erfolgte für 10 Tage (*short term*) oder 26 Tage (*long term*).

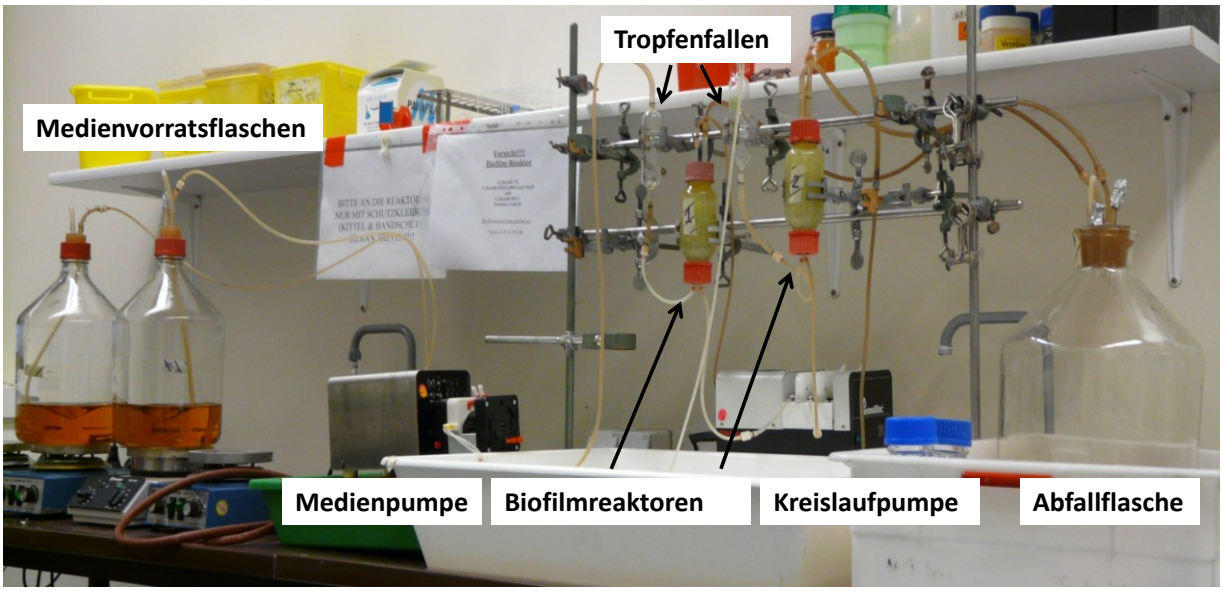



**Abb. 2.1: Aufbau der Biofilmreaktoren**

Alle verwendeten Materialien wurden vor dem Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert. Vor dem Animpfen und nach dem Reaktorlauf wurde ein Verdünnungsausstrich von den Bakterienkulturen auf Platten mit dem entsprechenden Medium angelegt um mögliche Kontaminationen ausschließen zu können.

#### 2.2.1.10 Lektinfärbung und Nachweis über Fluoreszenzmikroskopie

Um die Biofilmbildung von den Biofilmbildern verifizieren zu können, wurde ein Lektin-Bindungs Assay (Böckelmann *et al*., 2003; Böckelmann *et al*., 2002) durchgeführt.
Lektine sind zuckerbindende Proteine mit der Eigenschaft Zellen zu agglutinieren und/oder Glykokonjugate zu präzipitieren. Markierte Lektine werden u. a. zur Lokalisierung spezifischer Kohlenhydrate an der Zelloberfläche und zur Detektion von Biofilmen verwendet (Neu *et al*., und Referenzen ebenda, 2001). Für das Lektin-Bindungs Assay wurde das Fluoroscein Isothiocyanat (FITC)-markierte WGA (*wheat germ agglutinin*) aus *Triticum vulgaris* verwendet.
Für die Lektinfärbung wurde Biofilmmaterial mit einer Impföse auf einen Objektträger aufgebracht und mit 10 µL FITC-WGA (100 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$) versetzt. Es folgte eine Inkubation von 20 min im Dunkeln. Die Zellen wurden vorsichtig 3-mal mit 20 µL PBS gewaschen und anschließend mit 10 µL Propidiumjodid (PI; 2,5 $ng \cdot \mu L^{-1}$) für 20 min im Dunkeln gefärbt. Die Proben wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit farblosem Nagellack versiegelt. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am Zeiss Axioplan II Mikroskop (Oberkochen, Deutschland) mit dem Filter Set Nr. 9 für Oregon Green 488 oder mit dem Beleuchtungssystem Colibri am Zeiss Axioskop Mikroskop.

#### 2.2.1.11 Probenaufbereitung für die Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Die Glaskugeln aus dem Monospezies Biofilmreaktor mit *S. aureus* 67 und mit *S. epidermidis* 130 wurden entnommen, für vier Stunden in 4% Formaldehyd in 200 mM Hepes fixiert und danach in einer sechsstufigen Acetonreihe (30-100%) bei RT entwässert. Die Proben wurden bis zur Kritisch-Punkt-Trocknung in Aceton bei 4°C aufbewahrt. Die Kritisch-Punkt-Trocknung erfolgte am ZELMI (Zentraleinrichtung Elektronenmikroskopie, TU Berlin). Die Proben wurden möglichst zügig in einen Probenhalter zusammen mit Aceton in die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (BAL-TEC CPD030; Leica Microsystems, Deutschland) eingesetzt und sorgfältig verschlossen. Das Aceton wird dabei in mehreren Schritten bei 9°C restlos durch

flüssiges $CO_2$ ausgetauscht. Anschließend wurde die Proben-Druckkammer über die kritische Temperatur von 41°C erwärmt. Der kritische Punkt für $CO_2$ wurde erreicht und das flüssige $CO_2$ geht ohne Phasengrenze in die Gasform über, die Probe ist trocken. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte die Aufbewahrung der Proben im Exsikkator. Da die Proben für REM elektrisch leitfähig sein müssen, wurden diese am Institut für Werkstoffwissenschaften (TU Berlin, Prof. Dr. H. Schubert) an einem *Sputter Coater* (BALZERS SCD050; Balzers AG, Liechtenstein) mit Gold beschichtet, so dass eine Schichtdicke von 25 nm erreicht wurde. Die Kontakte zwischen der Glaskugel und dem Stiftprobenteller wurden zusätzlich noch mit Silberpaste überzogen. Die Aufnahmen erfolgten an einem Philips Rasterelektronenmikroskop XL20.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Plasmidisolierung aus *Bacillus* und *Paenibacillus* Spezies

Die Plasmidisolierungen aus *Bacillus* und *Paenibacillus* Stämmen wurden nach der Methode von Duan *et al*. (1999) und Voskuil *et al*. (1993) mit einigen Modifikationen durchgeführt.

5 mL einer Übernachtkultur wurden bei 10000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Das Pellet wurde in 200 µL Lösung 1 durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden 20 µL Lysozym-Lösung (100 $mg \cdot mL^{-1}$) hinzugegeben, vermischt und bei 37°C (Wasserbad) 30 min inkubiert. Die vollständige Lyse erfolgte durch Zugabe von 350 µL Lösung 2. Die Proben wurden anschließend mit 350 µL kalter Lösung 3 versetzt und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um die Zellbruchstücke und chromosomale DNA zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µL einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) Lösung vermischt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und mit 620 µL Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 5 min. Die obere Phase wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen kaltem Isopropanol (-20°C) versetzt. Die Plasmid-DNA Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag wurde die DNA für 30 min bei 13000 rpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 600 µL 70% Ethanol

gewaschen und für weitere 15 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde entfernt, das Pellet getrocknet und in 25 µL sterilem bidest. Wasser, dem 1 µL RNAse (10 mg·mL$^{-1}$) zugegeben wurde, gelöst. Die DNA wurde für eine Stunde bei RT inkubiert, um die Plasmid-DNA vollständig zu lösen und um die vorhandene RNA durch die RNAse zu zerstören. Die Plasmid-DNA wurde bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei -20°C gelagert.

#### 2.2.2.2 Plasmidisolierung aus Staphylokokken

Die Plasmidisolierung aus Staphylokokken erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) sowie Sambrook und Russel (2001) mit einigen Änderungen. Dazu wurden 5 mL einer Übernacht-Kultur bei 8000 rpm für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µL Lösung 1 resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 20 µL Lysozym (100 mg·mL$^{-1}$), 10 µL Lysostaphin (1,5 U·µL$^{-1}$) und 10 µL Mutanolysin (1 U·µL$^{-1}$) sowie anschließende Inkubation bei 37°C (Wasserbad) für eine Stunde. Nach der Zugabe von 200 µL Lösung 2 und mehrmaligem Invertieren wurde die Suspension mit 20 µL Proteinase K (20 mg·mL$^{-1}$) versetzt und für 10 min bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Es folgte eine 5 minütige Lagerung auf Eis. Von der Lösung 3 wurden 150 µL zugegeben, invertiert, für 5 min auf Eis gehalten und anschließend für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit jeweils 200 µL Phenol und Chloroform versetzt, kurz gevortext und einer Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm unterzogen. Die obere Phase wurde entnommen, in ein neues Gefäß überführt, mit 800 µL Ethanol absolut versetzt und einer DNA-Fällung über Nacht bei -20°C unterzogen. Die gefällte DNA wurde für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 25 µL bidest. Wasser, das mit 1 µL RNAse (10 mg·mL$^{-1}$) versetzt war, gelöst. Es folgte eine einstündige Inkubation bei RT und anschließende Lagerung bei -20°C.

#### 2.2.2.3 Plasmidisolierung aus Enterokokken

Die Plasmidisolierung aus Enterokokken erfolgte nach Woodford *et al*. (1993) modifiziert nach Werner *et al*. (1999) am Robert Koch-Institut in Wernigerode.
Enterokokken Stämme wurden auf Blutagar Platten (Oxoid, Wesel, Deutschland) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterienzellen wurden mit einem

Wattestäbchen von der Platte abgenommen, in 1 mL TES-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µL TES-Puffer, das 10 mg·mL$^{-1}$ Lysozym und 50 µg·mL$^{-1}$ RNAse A enthielt, aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, wobei der Ansatz öfters vorsichtig gemischt wurde. Anschließend wurden 400 µL 0,2 N NaOH/1% SDS zugegeben, mehrmals vorsichtig invertiert und bei 56°C für eine Stunde inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 300 µL 3M Kaliumacetat (pH 4,8), invertieren der Proben und eine 20minütige Kühlung auf Eis. Der gefällte Niederschlag wurde bei 4°C für 15 min bei 15000 rpm abzentrifugiert und der Überstand 2-mal mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit 1 Vol Chloroform versetzt. Die Proben wurden bei jeder Behandlung 40-50-mal geschüttelt und für 5 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA bei -20°C mit 2 Vol Ethanol absolut über Nacht.
Am nächsten Tag wurde die DNA bei 4°C, 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert und das Pellet mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 20 µL Aqua bidest. aufgenommen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.2.4 S1 Nuklease-Behandlung von Enterokokken DNA

Die S1 Nuklease-Behandlung mit anschließender PFGE erfolgte nach Barton *et al*. (1995) mit Modifikationen. Dieses Experiment wurde bei PD Dr. G. Werner am Robert Koch-Institut in Wernigerode durchgeführt.
Die Modifikationen waren wie folgt. Von den *E. faecalis* Stämmen (69 bis 80) und dem Größenstandard *S. aureus* NTC8325 wurden ÜN-Kulturen in 5 mL BHI Medium angesetzt und bei 37°C inkubiert. Jeweils 1 mL wurde bei 12000 rpm für 5 min (4°C) zentrifugiert und das Pellet in 1 mL eiskalter PIV-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 M NaCl) gewaschen. Das Pellet wurde dann in 0,7 mL PIV-Lösung aufgenommen. Von der Suspension wurden 50 µL mit 50 µL 1,2% LMP-Agarose (Biometra) gemischt und in einen Gießblock eingefüllt. Die Agaroseblöckchen wurden im Lysispuffer (6 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 M NaCl; 100 mM EDTA; 0,5% Brij 58; 0,2% Na-Desoxycholat; 0,5% Sarkosyl), dem RNAse (60 µg·mL$^{-1}$) und Lysozym (1 mg·mL$^{-1}$) sowie Lysostaphin (für *S. aureus* NTC8325) zugegeben wurde, bei 37°C über Nacht unter leichtem Schwenken inkubiert.
Für die *Sma*I-Restriktion des Größenstandards wurde das Agaroseblöckchen 3-mal mit 15 mL TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5) für 30 bis 60 min gespült, in

*Sma*I-Puffer 30 min äquilibriert und anschließend die DNA über Nacht bei 25°C mit *Sma*I geschnitten. Die Agaroseblöckchen mit der Enterokokken DNA wurden für 15 min mit S1-Nuklease (Takara, Japan) behandelt.
Die Agaroseblöckchen wurden in ein 1% PFGE Agarosegel überführt und die PFGE bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 Zyklus, Pulszeiten 5-35 sec für 22 h, Kühlung bei 14°C.

#### 2.2.2.5 Plasmidisolierung aus Milchsäurebakterien

Die Plasmidisolierung für die LAB Stämme erfolgte nach Anderson und McKay (1983) mit einigen Modifikationen nach Vriesema *et al*. (1986) und Klaenhammer (1984).
Die Übernacht-Kultur wurde in 5 mL MRS-Medium mit 0,7% Glycin angesetzt (Vriesema *et al*., 1986) und bei 37°C (200 rpm) inkubiert. 3 mL dieser Übernacht-Kultur wurden bei 10000 rpm für 3 min pelletiert und in 400 µL Lösung A resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µL Lysozym (100 $mg \cdot mL^{-1}$), 10 µL Lysostaphin (1,5 $U \cdot \mu L^{-1}$) und 10 µL Mutanolysin (1 $U \cdot \mu L^{-1}$) erfolgte die Lyse-Behandlung im Wasserbad (37°) für eine Stunde. Nach dieser Inkubation wurden 48 µL Lösung B, 28 µL Lösung C und 20 µL Proteinase K (20 $mg \cdot mL^{-1}$) hinzugegeben, vorsichtig gemischt und bei 37°C im Wasserbad für eine halbe Stunde inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 30 µl NaOH (3 N) und ein 3minütiges vorsichtiges Hin- und Herschwenken. Dieser Schritt wurde nach Zugabe von 50 µL Lösung D wiederholt. Anschließend wurden 72 µL Lösung E hinzugegeben und es folgte die Phenol-Extraktion. Die Suspension wurde mit 700 µL Phenol versetzt, vorsichtig geschwenkt und 2-5 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µL Chloroform versetzt (Klaenhammer, 1984). Es folgte wieder ein Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 5 min). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt, vorsichtig geschwenkt und zentrifugiert. Es folgte die DNA-Fällung, dazu wurde die obere Phase mit 1 Vol Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und mit 500 µL Ethanol (70%) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, die DNA bei RT getrocknet und in 25 µL bidest. Wasser, das mit 1 µL RNAse (10 $mg \cdot mL^{-1}$) versetzt war, gelöst. Es folgte eine einstündige Inkubation bei RT und anschließende Lagerung bei -20°C.

### 2.2.2.6 Gesamt-DNA Isolierung

Die Gesamt-DNA Isolierung aus Milchsäurebakterien sowie Referenzstämmen wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche) durchgeführt. Aus einer Übernacht-Kultur wurden 2 mL Kultur bei 10000 rpm für 2 min zentrifugiert und das Pellet in 200 µL PBS resuspendiert.
Die verwendeten Bakterienkulturen erforderten eine Prä-Lyse Behandlung durch Lysozym (20 µL), Mutanolysin (10 µL) und Lysostaphin (10 µL) für eine Stunde im Wasserbad bei 37°C. Es folgte die Zugabe von 200 µL Binding Buffer sowie 40 µL Proteinase K und eine Inkubation für 10 min bei 70°C. Nach der Zugabe von 100 µL Isopropanol wurde alles gut vermischt und auf die Säule (*High Pure Filter Tube*) pipettiert und bei 8000 g für 1 min zentrifugiert. Es folgten drei Wasch-Schritte und eine Elution der Gesamt-DNA mit 200 µL auf 70°C vorgewärmten Elutions Puffer. Die so gewonnene DNA wurde in einer Verdünnung von 1:10 oder 1:100 als Matrize in der PCR eingesetzt.

### 2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Identifikation, Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Das Trägermaterial, die Agarose, ist ein Polymer, das aus verschieden verknüpften Galaktoseeinheiten besteht. In einem elektrischen Feld wandert die DNA aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgt nicht nur in Abhängigkeit von der absoluten Masse sondern auch von ihrer Form (superhelikal, relaxiert, doppelsträngig-linear oder einzelsträngig). Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser DNA-Fragmente hängt zusätzlich von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung und der Art des Laufpuffers ab. In der Regel wandert die superhelikale Form der DNA schneller im Gel als die doppelsträngig-lineare. Relaxierte DNA-Moleküle wandern im Agarosegel wesentlich langsamer als superhelikale oder doppelsträngig-lineare DNA.
Für die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 1,0 kb-20 kb wurden 0,7-1,0% Agaroseflachbettgele in 1x TAE-Puffer verwendet. Als Laufpuffer diente ½x TAE. Für 0,7% Agarosegele wurde die Elektrophorese standardmäßig bei einer Stromspannung von 110 V für 60 Min durchgeführt, bei höherprozentigen Gelen wurden die DNA-Fragmente bei 130 V für 60 Min elektrophoretisch aufgetrennt.

Für die analytische Auftrennung von isolierter Plasmid-DNA aus Staphylokokken wurden große (B:15 cm, L: 25 cm) 1% Agaroseflachbettgele in 1x TBE verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die Elektrophorese erfolgte in einer Kühlkammer (8°C) bei 100V über Nacht.

Für den Southern Blot wurden 1,5% Agarosegele in 1x TBE hergestellt. Der Lauf erfolgte in 1x TBE bei 130V für 60 min.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit *6x Loading dye* versetzt. Ein Längenstandard (Marker) als Hilfsmittel zur Quantifizierung der DNA wurde mit der zu untersuchenden Probe auf dem Agarosegel aufgetragen. Dieser Marker enthält Fragmente mit genau definierten Größen (1kb *Ladder*; λ DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII *Ladder*). Nach der Elektrophorese wurden die Agarosegele in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ bidest. Wasser) 20 min gefärbt. Ethidiumbromid ist ein organischer Farbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur in die DNA interkalieren kann. Dieser interkalierte Farbstoff kann durch UV-Licht angeregt werden und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm). Durch die Bindung an die DNA erfolgt eine Verstärkung der Fluoreszenz, so dass auch in Gegenwart freien Ethidiumbromids die Färbung der Nukleinsäuren im Gel gut zu sehen ist. Die Geldokumentation erfolgte mit dem AlphaImager® EC von Biozym oder dem Geldokumentationssystem von Herolab.

#### 2.2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine *in vitro* Technik, mit der spezifische DNA-Fragmente vervielfältigt werden können (Saiki *et al*., 1985; Mullis *et al*., 1986). Um mit dieser Methode DNA amplifizieren zu können, benötigt man Oligonukleotide von ca. 20 Nukleotiden Länge, die so genannten Primer. Diese Primer sind einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden Bereichs sind.

Ein typischer PCR-Verlauf besteht in der Regel aus drei unterschiedlichen Temperaturstufen. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA (die Matrix) bei 94°C-98°C in ihre Einzelstränge denaturiert. Im zweiten Schritt hybridisieren die Primer bei einer für jedes Primer-Paar festgelegten Annealing-Temperatur an die Matrix. Diese Annealing-Temperatur ist meistens um 5°C niedriger als die Schmelztemperatur der Primer. Schließlich verlängert die hitzestabile *Taq*- Polymerase (aus *Thermus aquaticus*)

in Anwesenheit von dNTPs die Primer und synthetisiert neue DNA-Stränge, die komplementär zur Matrize sind.

Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermo-Cycler mit heizbarem Deckel in 50 µL Ansätzen. Ein Standard-Reaktionsansatz enthielt 1 x PCR-Puffer, 0,4-0,8 µM je Primer, 0,2 mM dNTPs, 1,5-5,5 mM $MgCl_2$, 1,5 U *Taq*-Polymerase, 1 µL des entsprechenden Lysats oder DNA (1:10; 1:100) und Wasser zu 50 µL. Alle verwendeten Oligonukleotidprimer sind in den Tabellen 2.6 bis 2.8 aufgelistet. Die verwendeten PCR Programme sind unter Punkt 2.1.8 aufgeführt.

### 2.2.2.9 Digoxigenin (DIG)-Markierung von Oligonukleotiden mittels PCR

Die DIG-Markierung erfolgte mittels *PCR DIG Probe Synthesis Kit* der Firma Roche nach Angaben des Herstellers. Das verwendete *DIG-Labeling* PCR Programm ist unter Punkt 2.1.8 zu finden. Die Primer-Konzentration betrug pro Reaktionsansatz 40 pmol je Primer. Die $MgCl_2$-Konzentration variierte von 3 mM bis 4,5 mM. Als DNA-Matrize wurde Gesamt-DNA verwendet, die mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* aus Übernacht-Kultur von Milchsäurebakterien und Referenzstämmen gewonnen wurde (siehe 2.2.2.6). Die DIG-markierten Proben wurden für das Southern Blotting verwendet (2.2.2.10).

### 2.2.2.10 Southern Blot

Unter Southern Blotting versteht man im engeren Sinne die Übertragung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran durch Vakuum oder Kapillarkraft. Dieses Verfahren wurde 1975 von Southern entwickelt. Für diesen Versuch wurde das *DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acid* der Firma Roche verwendet. Dieses Kit beinhaltete das Blockreagenz, den Anti-DIG Antikörper und das CSPD (Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase).

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5 %iges Agarosegel in 1x TBE hergestellt. Als Laufpuffer diente auch 1x TBE. Von den PCR-Proben wurden jeweils 10-20 µL aufgetragen, vom DNA-Marker 10 µL (50 $ng \cdot \mu L^{-1}$) und von den Referenzkontrollen, je nach Konzentration, 10 µL von den Verdünnungsstufen $10^{-1}$-$10^{-3}$. Der Gellauf erfolge für 1 h bei 130 Volt. Anschließend wurde das Agarosegel im Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Für den Transfer musste die DNA im Agarosegel für 2 x 10 min in der Denaturierungslösung denaturiert werden. Es folgte ein Waschen in sterilen bidest.

Wasser und 2-mal waschen für je 10 min in der Neutralisierungslösung. Der Aufbau der Southern Blot-Apparatur erfolgte nach dem Schema in Abb. 2.2. Die positiv geladene Nylonmembran wurde für 5 min bei RT in 20x SSC inkubiert. Der Transfer erfolgte über Nacht in 20x SSC.

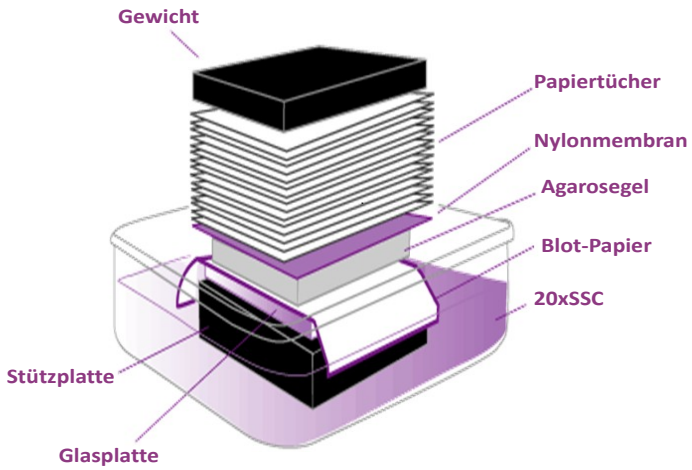



**Abb. 2.2: Schematischer Aufbau eines Southern Blots**

Am nächsten Versuchstag wurden folgende Waschschritte mit absteigender Salzkonzentration und somit steigender Stringenz durchgeführt. Zuerst erfolgte dreimaliges Waschen für je 3 min in 2x SSC mit 0,1% SDS bei RT, gefolgt von dreimaligen Waschen für je 6 min in 0,5x SSC und 0,1% SDS bei 42°C/50°C (siehe Tabelle 2.9) und anschließenden drei Waschschritten für je 10 min in 0,1x SSC mit 0,1% SDS bei 42°C/50°C. Die Membran wurde dann für 1 min im Waschpuffer äquilibriert und für 60 min bei RT in Blocklösung inkubiert. Die Blocklösung wurde verworfen und die Membran für weitere 60 min in Antikörper-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal für jeweils 10 min im Waschpuffer gewaschen und für 2 min in Detektionspuffer äquilibriert. Die Membran wurde mit 2-3 mL CSPD-Lösung beschichtet und für 5 min mit dieser inkubiert. Die überschüssige CSPD-Lösung wurde entfernt, die Membran in Folie eingeschweißt und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert, um die Chemilumineszenz-Reaktion zu verstärken. In einer Exponierkassette wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und für 20 bis 60 min inkubiert. Anschließend wurde der Röntgenfilm (FUJIFILM) entwickelt und fixiert.

**Tab. 2.9: Proben für die Southern Hybridisierung**

| Resistenz/Transfergen | getestete Stämme | Temperatur [°C] |
|---|---|---|
| *van*A | 113, 115, 116, 117, 118, 119, 130, 131, 132, 134, 135, 137 | 50 |
| *van*B | 114, 119, 121, 123, 125, 128, 130, 131, 132, 137, *E. faecalis* T9 | 50 |
| *van*C1/2 | LAB: 5, 21, 24, 26, 28, 29, 38, 39, 43, 45, 46, 52, 59, 60, 63, 65, 69, 70, 76, 79, 82-101 | 50 |
| *nes*_pSK41 | *E. faecalis* T9, LAB: 10-29 | 50 |
| *pre*_pSK41 | 27, 29, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, LAB: 11-29 | 42/50 |
| *traE* | *E. faecalis* T9; LAB: 11, 24, 25 ,28, 29 | 42 |
| *traK* | 44-46, 55, 61-80, 101, 103, 110, *E. faecalis* T9 | 42 |

# 3 ERGEBNISSE

## 3.1 Molekulare Charakterisierung der ISS und Concordia Isolate

Das Ziel der Forschungsvorhaben MISSEX (***M****icrobial* ***ISS*** *Gene* ***Ex****change*) und COMICS (***Co****ncordia* ***Mi****crobial Dynami****cs***) ist die Bestimmung der mikrobiellen Diversität in den Bakterienpopulationen der ISS und der Concordia Forschungsstation, die anhand von Proben von der Besatzung der Forschungsstationen und der Luft analysiert werden soll. Der Fokus dieser Arbeit lag hierbei auf G+ pathogenen Organismen, insbesondere Staphylokokken, Enterokokken, *Bacillus* und *Paenibacillus* Spezies.
Die Charakterisierung der bakteriellen Isolate wurde zum Teil von Studentinnen im Rahmen ihrer Diplom-, Praxis- oder Bachelorarbeiten am FG Umweltmikrobiologie der TU Berlin durchgeführt, u. a. von Katja Marie Rogowski, Svea Fürch, Katrin Prescha, Sandra Hahn und Anja Will.

### 3.1.1 Plasmidisolierung aus den bakteriellen Isolaten

Zu den mobilen genetischen Elementen zählen unter anderen die Plasmide (extrachromosomale DNA), die eine Schlüsselrolle in der Evolution und Diversifizierung von Bakterien durch horizontalen Transfer und in der bakteriellen Adaption an die Umwelt spielen (Merlin *et al*., 2000). Auf Plasmiden sind sehr häufig Antibiotika-Resistenzgene, Toxingene, Schlüsselgene für den Gentransfer, Virulenzfaktoren sowie Gene für besondere Stoffwechselwege und Abbaureaktionen kodiert, die den Bakterien Selektionsvorteile oder die Möglichkeit besondere Habitate zu besiedeln, verschaffen.
Die Isolierung von Plasmiden aus 113 Isolaten erfolgte für die *Bacillus* und *Paenibacillus* Spezies nach Duan *et al*. (1999) und Voskuil *et al*. (1993), für die Staphylokokken nach Birnboim und Doly (1979) sowie Sambrook und Russel (2001) und für die Enterokokken nach Woodford *et al*. (1993) und Werner *et al*. (1999) (siehe 2.2.2.1-2.2.2.3). Es konnten in 84 (74,3%) Isolaten Plasmide detektiert werden. Davon enthielten 46 Isolate (40,7%) Plasmide, die größer als 20 kb waren. Plasmid-DNA kann in unterschiedlichen Konformationen vorliegen (superhelikal, relaxiert oder doppelsträngig-linear) und im Agarosegel unterschiedlich wandern, so dass keine klare

Aussage über die Anzahl der Plasmide getroffen werden kann. Es werden nur einige ausgewählte Plasmidisolierungen gezeigt. Eine Zusammenfassung der detektierten Plasmide in den Isolaten ist im Anhang 7.3 zu finden. Die Isolierung großer Plasmide aus den *Bacillus* und *Paenibacillus* Stämmen wurde vom Partnerlabor (Université catholique de Louvain la Neuve, Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale, unter der Leitung von Prof. Jacques Mahillon) von Sophie Timmery nach Andrup *et al.* (1996) durchgeführt (Timmery *et al*., 2011).

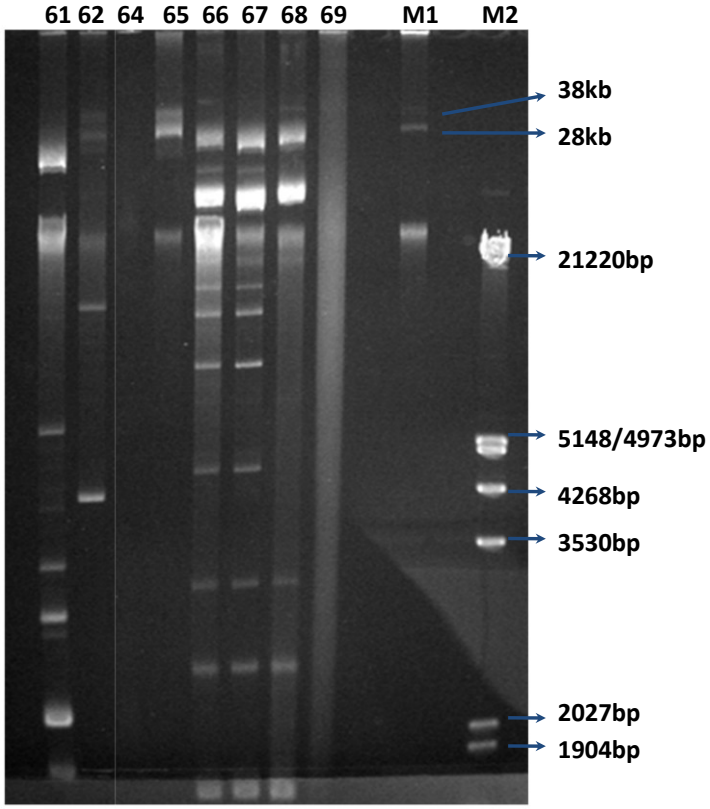



**Abb. 3.1: Plasmidisolierung aus den ISS und Concordia Isolaten 61-69**
M1: BAC supercoiled Marker
M2: Lambda DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII DNA Marker

In den *Staphylococcus* Stämmen 61-68 (außer 64) konnten große Plasmide im Bereich von 28 kb nachgewiesen werden. Die *S. epidermidis* Stämme 62 (Concordia), 65, 66 (ISS) und der *S. aureus* Stamm 68 (Concordia) besitzen zusätzliche Plasmidbanden in Höhe der 38 kb Marker-Bande. Die Stämme 61, 62, 66 (*S. epidermidis*) und 67 (*S. aureus*) beinhalten zusätzlich noch kleinere Plasmide. Dabei ist auffällig, dass *S. epidermidis* 66 und *S. aureus* 67 ähnliche Plasmidprofile besitzen. *S. aureus* 68 ähnelt den beiden Stämmen in den letzten drei Plasmidbanden, sowie den Plasmidbanden um 28 kb. *S. epidermidis* 66 wurde im Oktober 2003 aus der ISS (Luftisolat) isoliert, die beiden *S.*

*aureus* Stämme 67 und 68 wurden im Januar 2005 aus Handabstrichen der Concordia Crew isoliert. Aus dem Stamm 64 (*S. epidermidis*, ISS) konnten keine Plasmide isoliert werden.

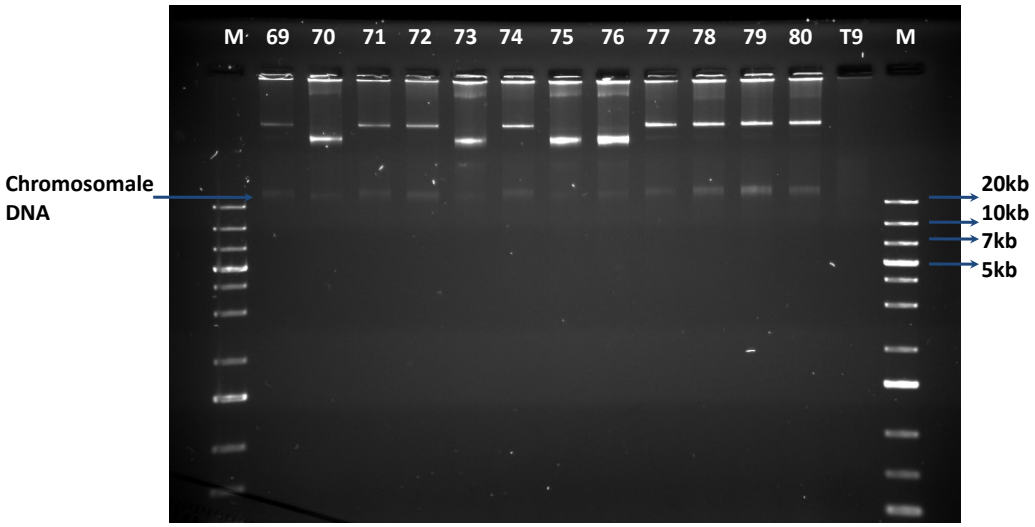



**Abb. 3.2: Plasmidisolierung aus *E. faecalis* Stämmen Nr. 69-80 und T9**
M: Gene ruler 1kb Plus DNA Marker

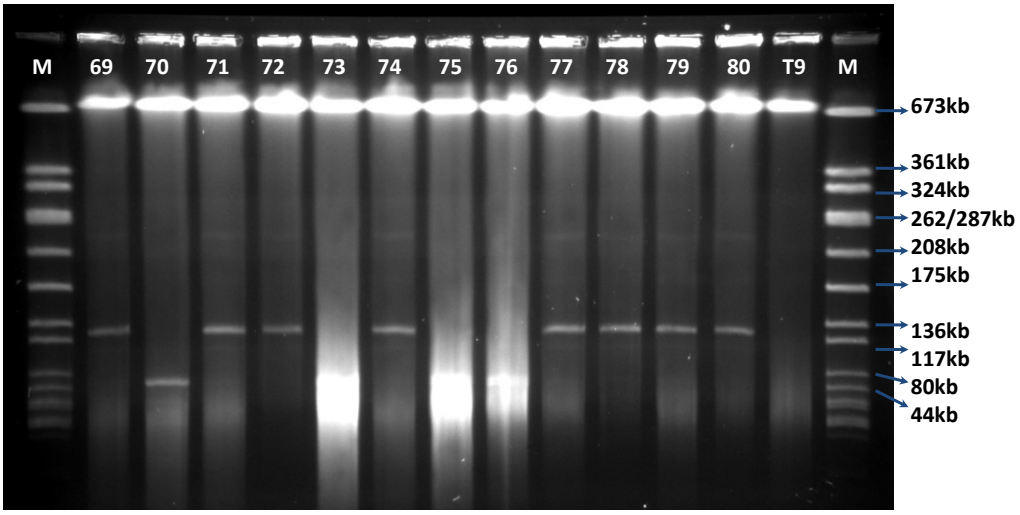



**Abb. 3.3: S1 Nuklease Plasmid-Analyse aus Enterokokken mittels PFGE**
M: *Sma*I-Fragmente genomischer DNA aus *S. aureus* NCTC8325

In allen 12 *Enterococcus* Stämmen (ISS) konnte jeweils ein großes Plasmid detektiert werden, wobei acht Stämme größere Plasmide als die restlichen vier beinhalten. Um die Größen der Plasmide zu bestimmen, wurde eine Gesamt-DNA S1-Nuklease Behandlung durchgeführt (2.2.2.4) mit anschließender PFGE (Abb. 3.3). Die Auswertung der Größen der Plasmidbanden erfolgte mittels Bionumerics Software (Applied Maths, Belgien). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Plasmide der Stämme 69, 71, 72, 74, 77, 78, 79 und 80 scheinen gleich groß zu sein. Eine genaue Aussage darüber

kann nur nach einer Restriktionsanalyse getroffen werden, da gleiche Bandenmuster genauer sind als eine einzige Bande. Aus acht Enterokokken Stämmen (69, 71, 72, 74, 77-80) wurden Plasmide, die ca. 130 kb groß sind, isoliert. Die Plasmide in den Stämmen 70, 73, 75 und 76 sind 43-66 kb groß. Diese *E. faecalis* Stämme wurden aus einer Probenplatte isoliert, so dass es sich bei den Stämmen mit dem ca. 130kb Plasmid möglicherweise um das gleiche Isolat handeln könnte.

**Tab. 3.1: Ermittelte Plasmidgrößen**

| TU-Nr.: | Spezies | Größe [kb] |
|---|---|---|
| 69 | *E. faecalis* Plate10 iso10 | 127 |
| 70 | *E. faecalis* Plate10 iso11 | 66 |
| 71 | *E. faecalis* Plate10 iso14 | 128 |
| 72 | *E. faecalis* Plate10 iso16 | 128 |
| 73 | *E. faecalis* Plate10 iso18 | 43 |
| 74 | *E. faecalis* Plate10 iso2 | 128 |
| 75 | *E. faecalis* Plate10 iso3 | 48 |
| 76 | *E. faecalis* Plate10 iso4 | 54 |
| 77 | *E. faecalis* Plate10 iso5 | 130 |
| 78 | *E. faecalis* Plate10 iso7 | 130 |
| 79 | *E. faecalis* Plate10 iso8 | 129 |
| 80 | *E. faecalis* Plate10 iso9 | 128 |

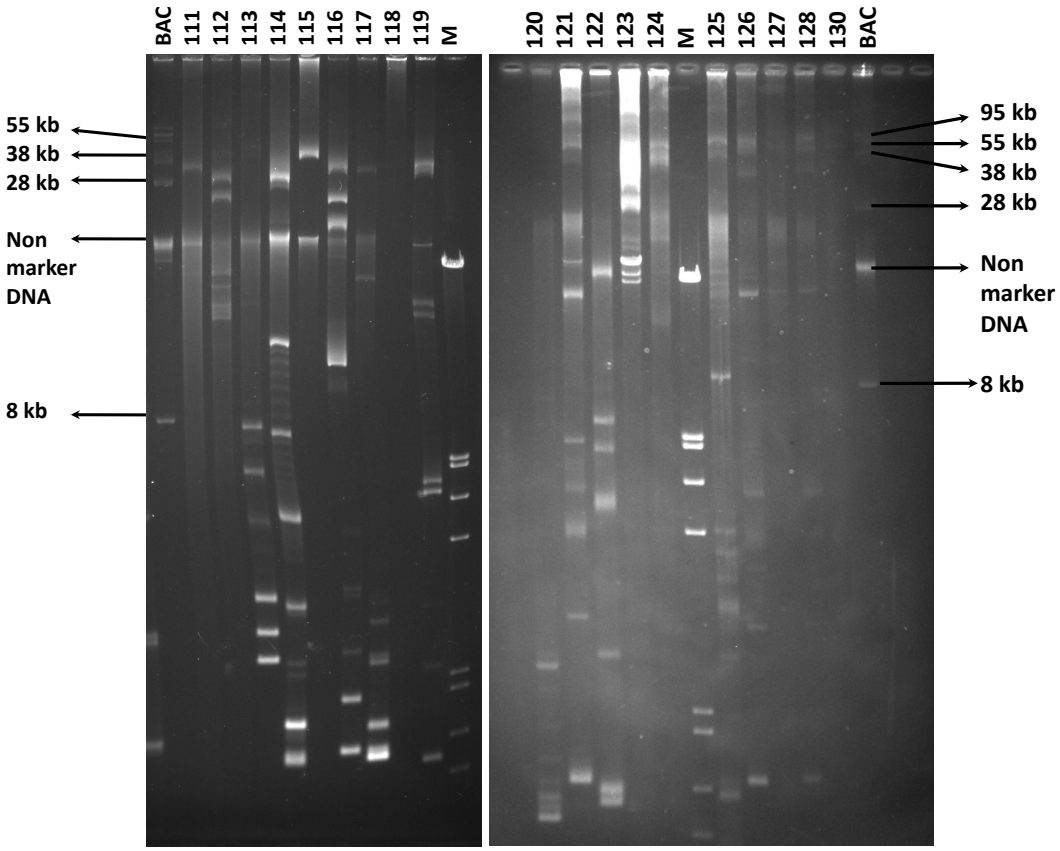



**Abb. 3.4: Plasmidisolierung aus *Staphylococcus* Stämmen 111-130**
BAC: BAC supercoiled Marker
M: Lambda DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII DNA Marker

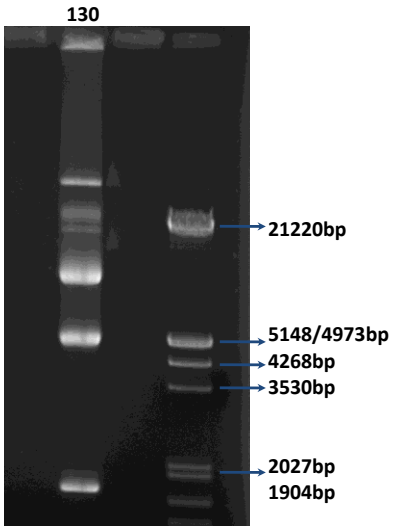



**Abb. 3.5: Plasmidisolierung aus *S. epidermidis* 130**
M: Lambda DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII DNA Marker

Die Stämme 111 bis 130 sind alle Concordia Isolate. Aus den Stämmen 112, 113 (*S. hominis hominis/novobiosepticus*), 115 (*S. capitis*), 119 und 130 (*S. epidermidis*) konnten Plasmide isoliert werden, die ca. 38 kb groß sind. Stämme 112, 114 (*S. hominis hominis/novobiosepticus*) und 116 (*S. epidermidis*) tragen Plasmide, die ca. 28 kb oder kleiner sind. Kleinere Plasmide, die unterhalb der 28 kb sowie 8 kb Marker-Bande liegen, konnten in den Stämmen 112, 113, 114 und *S. epidermidis* 116, 117 sowie 119 detektiert werden. Stämme 121 (*S. hominis* subsp. *hominis*), 123 (*S. capitis* subsp. *capitis*), 124 (*S. epidermidis*), 125, und 126 (*S. hominis* subsp. *hominis*) beinhalten Plasmide, die ca. 55 kb groß sind. *S. epidermidis* 124, *S. hominis* subsp. *hominis* 121 und 125 könnten auch ein Plasmid beinhalten, das größer als 95 kb ist. Diese Plasmidbanden erscheinen aber sehr schwach. In den Stämmen 126 und 128 (*S. hominis* subsp. *hominis*) befindet sich jeweils eine Plasmid-Bande zwischen 28 und 38 kb. In den Stämmen 120 bis 130 (Abb. 3.4-3.5) konnten außerdem Plasmide isoliert werden, die unterhalb der „*non marker*“ Bande liegen, also kleiner als 20 kb sind. Aus *S. epidermidis* 118 konnten keine Plasmide isoliert werden.

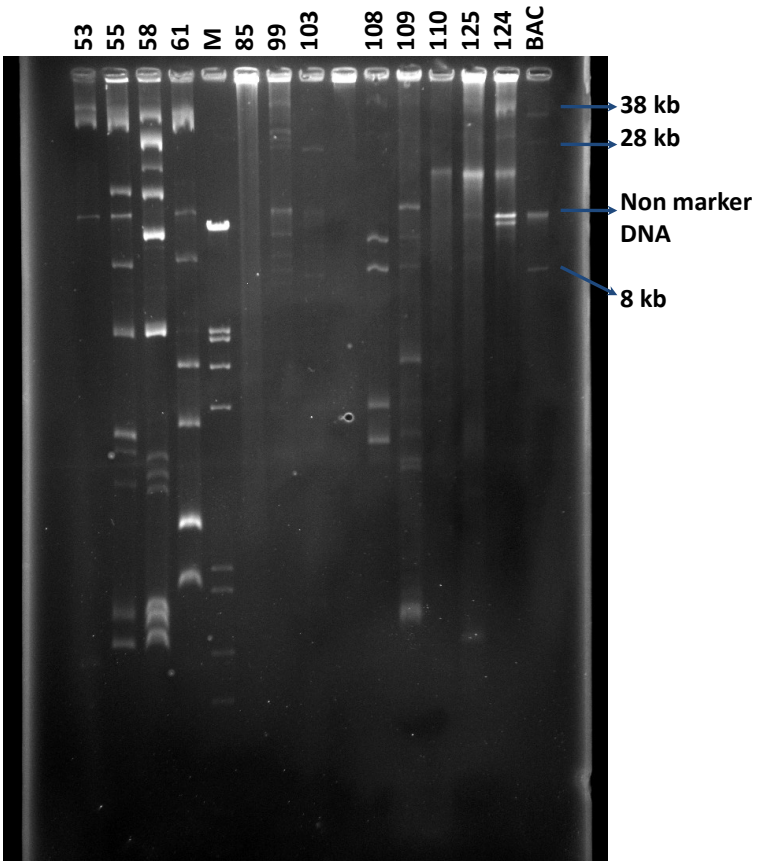



**Abb. 3.6: Plasmidisolierung aus *Staphylococcus* Stämmen**
M: Lambda DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII DNA Marker
BAC: BAC supercoiled Marker

In den *S. epidermidis* Stämmen 53, 55, 58 und 61 sowie *S. saprophyticus* 99 konnten Plasmide um 38 kb detektiert werden. Die Staphylokokken Isolate 53, 55 und 61 stammen aus der Concordia, die Stämme 58 und 99 aus der ISS. Es konnten zusätzlich noch kleinere Plasmide aus den Stämmen 55, 58, 61 und 99 isoliert werden. In *S. saprophyticus* 103 (ISS) konnten Plasmide nachgewiesen werden, die um 28 kb und 8 kb groß sind. Die Stämme *S. hominis* subsp. *hominis* 110 (ISS), 125 und *S. epidermidis* 124 (Concordia) besitzen eine Plasmid-Bande, die zwischen 28 kb und der „*non marker*" Bande liegt. Diese Plasmid-Bande ist in der Abb. 3.6 bei den Stämmen 124 und 125 nicht zu erkennen. Bei den ISS Stämmen *S. hominis* 108 und *S. haemolyticus* 109 sind mehrere Plasmid-Banden unterhalb der 28 kb Marker-Bande zu erkennen. Bei *S. hominis* 108 ist außerdem noch eine sehr schwache Bande um 38 kb vorhanden, so dass es sich hier vermutlich um ein großes Plasmid handeln könnte.

### 3.1.2 Antibiotika-Resistenztest mittels Agardiffusion

Die bakteriellen Isolate aus der ISS und der CONCORDIA-Station wurden mittels eines Agardiffusionstests auf ihr Resistenzverhalten gegenüber neun verschiedenen Antibiotika untersucht (Amp, Cat, Erm, Genta, Kan, Oxa, Strep, Tet und Van) (siehe 2.1.3). Die Ergebnisse dieses Agardiffusionstests sind in der Tabelle 3.2 zusammengefasst. Es sind nur die Stämme aufgeführt, die ein eindeutiges positives Ergebnis gezeigt haben. Die vollständigen Ergebnisse des Agardiffusionstests sind im Anhang 7.4 zu finden.

**Tab. 3.2: Antibiotika-Resistenzprofile der ISS und Concordia Isolate**

| TU Nr.: | Spezies[a] | SCK·CEN Nummerierung[b] | Resistenzen [µg][c] |
|---|---|---|---|
| 1 | *B. cereus s.l.* (16S) | T0-Air6-1 | Oxa5, Amp25 |
| 6 | *B. megaterium* (16S) | T0-Air8-9 | Tet10 |
| 10 | *B. subtilis* (16S) | T0B-C5-HA37-7 | Erm10 |
| 12 | *B. cereus s.l.* (16S) | T0B-C6-HA37-1 | Amp25 |
| 13 | *Bacillus* sp. (16S) | T11-Air1-1 | Tet10 |
| 14 | *B. cereus s.l.* (16S) | T11-Air2-1 | Oxa5, Amp25 |
| 17 | *B. megaterium* (16S) | T2-Air7-2 | Tet10 |
| 27 | *B. firmus* (16S) | T5-Air6-2 | Van30, Oxa5, Cat10, Amp25, Kan30, Tet10 |
| 31 | *B. circulans* (16S) | T5-Air8-4 | Amp25, Genta10 |
| 33 | *B. cereus s.l.* (16S) | T6-Air5-1 | Oxa5, Amp25 |
| 34 | *B. cereus s.l.* (16S) | T8-Air6-4 | Oxa5, Amp25, Genta10 |
| 36 | *B. circulans* (16S) | T8-Air8-3 | Oxa5 |
| 37 | *B. cereus s.l.* (16S) | T9-Air1-1 | Van5, Oxa5, Amp25, Kan30, Erm10 |
| 38 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T9-Air1-4 | Van30, Erm30 |
| 39 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T9-Air5-1 | Strep25 |
| 40 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T8-Air6-5 | Strep25 |
| 41 | *S. aureus* | R87 | Van5 |
| 42 | *B. cereus s.l.* | T0-C1-HA28-1 | Genta10, Tet10 |
| 45 | *S. aureus* | T5-Air3-1 | Amp25 |
| 47 | *S. aureus* (16S) | R42 | Erm10, Kan30 |
| 52 | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA28-3 | Van5 |
| 53 | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA37-2 | Van5, Oxa5 |
| 54 | *S. epidermidis* | T10-Air8-2 | Tet10 |
| 55 | *S. epidermidis* | T11-Air2-8 | Erm30, Tet10 |
| 57 | *S. epidermidis* | T6-Air1-4 | Cat10 |
| 61 | *S. capitis* subsp. *capitis* (16S) | T11-Air4-7 | Cat30, Amp25, Erm30 |
| 65 | *S. epidermidis* | Plate8 iso1 | Oxa5, Cat30, Tet10 |
| 66 | *S. epidermidis* | Plate10 iso12 | Cat30, Kan30 |
| 67 | *S. aureus* | T0-C2-HA28-5 | Van5 |
| 69 | *E. faecalis* | Plate10 iso10 | Van5, Oxa5, Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 70 | *E. faecalis* | Plate10 iso11 | Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 71 | *E. faecalis* | Plate10 iso14 | Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 72 | *E. faecalis* | Plate10 iso16 | Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 73 | *E. faecalis* | Plate10 iso18 | Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 74 | *E. faecalis* | Plate10 iso2 | Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 75 | *E. faecalis* | Plate10 iso3 | Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 76 | *E. faecalis* | Plate10 iso4 | Oxa5, Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |

**Tab. 3.2: Fortsetzung**

| TU Nr.: | Spezies[a] | SCK·CEN Nummerierung[b] | Resistenzen [µg][c] |
|---|---|---|---|
| 77 | *E. faecalis* | Plate10 iso5 | Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 78 | *E. faecalis* | Plate10 iso7 | Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 79 | *E. faecalis* | Plate10 iso8 | Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 80 | *E. faecalis* | Plate10 iso9 | Cat10, Erm30, Strep25, Kan30, Tet10 |
| 81 | *S. aureus* | T0B-C4-HA37-3 | Amp25 |
| 83 | *Microbacterium* sp. (16S) | T4-Air3-1 | Erm10, Tet10 |
| 85 | *S. hominis hominis/ novobiosepticus* | T3-Air3-4 | Erm30, Tet10 |
| 86 | *S. warneri* | T3-Air4-1 | Oxa5, Erm10 |
| 91 | *S. cohnii subsp. urealyticum* | T4-Air6-3 | Erm30, Tet10 |
| 94 | *S. haemolyticus* | T8-Air7-1 | Van30, Genta10 |
| 95 | *S. saprophyticus* | T11-Air3-3 | Amp25, Erm30 |
| 100 | *S. lugdunensis* (16S) | R76 | Cat30 |
| 101 | *S. lugdunensis* (16S) | 4IJ-4 | Cat30 |
| 103 | *S. haemolyticus* (16S) | 5IL-2 | Van5, Erm30, Tet10 |
| 104 | *S. aureus* (16S) | 6OD-2 | Van30, Oxa5, Amp25, Erm30 |
| 105 | *S. pasteuri* | T0-C6-HA28-5 | Van30, Oxa5, Amp25, Erm30 |
| 106 | *S. haemolyticus* (16S) | T0B-C2-HA37-3 | Van30, Oxa5, Amp25, Erm30 |
| 108 | *S. hominis* (16S) | R44 | Erm10, Tet10 |
| 109 | *S. haemolyticus* (16S) | R69 | Erm30, Tet10 |
| 110 | *S. hominis subsp. hominis* (16S) | 7IL-2 | Erm30, Tet10 |
| 111 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T0-Air1-1 | Cat30 |
| 113 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T2-Air5-3 | Erm10, Tet10 |
| 114 | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T2-Air7-1 | Erm30 |
| 116 | *S. epidermidis* | T5-Air4-3 | Kan30, Tet10 |
| 119 | *S. epidermidis* (16S) | T6-Air2-2 | Oxa5 |
| 121 | *S. hominis subsp. hominis* (16S) | T9-Air2-4 | Cat30, Erm10 |
| 124 | *S. epidermidis* (16S) | T11-Air4-3 | Cat30, Erm10 |
| 125 | *S. hominis subsp. hominis* (16S) | T12-Air2-1 | Erm10, Tet10 |
| 126 | *S. hominis subsp. hominis* (16S) | T12-Air2-2 | Cat30 |
| 127 | *S. epidermidis* | T0-C1-HA28-3 | Oxa5 |
| 130 | *S. epidermidis* (16S) | T0-C6-HA28-3 | Erm30 |
| 131 | *S. hominis subsp. hominis* (16S) | T0-C1-HA37-1 | Strep25 |
| 137 | *S. hominis subsp. hominis* (16S) | T0B-C4-HA28-4 | Erm30, Tet10 |

[a](16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK
[b]Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Plate: Isolate einer bestimmten Agarplatte
[c]Amp: Ampicillin; Cat: Chloramphenicol; Erm: Erythromycin; Genta: Gentamycin; Kan: Kanamycin; Oxa, Oxacillin; Strep: Streptomycin, Tet: Tetracyclin; Van: Vancomycin

Von 113 getesteten bakteriellen Isolaten wurden in 70 (61,9%) Resistenzen nachgewiesen. Davon waren 37 (32,7%) Erythromycin resistent, 31 (27,4%) Tetracyclin, 22 (19,5%) Chloramphenicol, 17 (15%) Kanamycin, 16 (14,2%) Oxacillin, jeweils 15 (13,3%) Ampicillin und Streptomycin resistent sowie 14 (12,4%) Vancomycin resistent. Nur 4 (3,5%) Stämme wiesen eine Gentamycinresistenz auf. In 24 (21,2%) Stämmen konnte nur eine Resistenz festgestellt werden, wobei 46 Stämme (40,7%) zwei oder mehr Resistenzen aufwiesen. Resistente Stämme sowie Stämme mit einem Hemmhofdurchmesser von ≤ 15mm wurden mittels PCR auf die Anwesenheit entsprechender Antibiotika-Resistenzgene hin untersucht.

### 3.1.3 Untersuchung der Isolate auf Antibiotika-Resistenzgene mittels PCR

Die ISS und Concordia Stämme wurden auf 22 unterschiedliche Resistenzgene hin untersucht. Darunter vertreten sind Resistenzgene gegen Glykopeptide (Vancomycin: *van*A, *van*B, *van*C1/2), β-Lactam Antibiotika (*mec*A, *amp*C), Aminoglykoside (Gentamycin: *aac6-aph2a*, *aph(2)-Ib*, *aph(2)-Ic*, *aph(2)-Id*; Kanamycin: *aph3-III*, *aadD*), Chloramphenicol ($cat_{pC194}$, $cat_{pIP501}$, $cat_{LM}$), MLS-Antibiotika (Erythromycin: *ermB*, *erm*C, *erm*D, *erm*G) und Tetracycline (*tet*K, *tet*M, *tet*O, *tet*S). Die dafür verwendeten Primerpaare sind in der Tabelle 2.6 sowie die verwendeten PCR-Programme unter 2.1.8 aufgelistet. Anhand dieser Primerpaare können Resistenzgene der genannten MGEs nachgewiesen werden (Tabelle 3.3). Die Binderegionen der Primer wurden mittels *Nucleotide BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) ermittelt und mit Hilfe von BioEdit (*Biological sequence alignment editor*) abgeglichen.

**Tab. 3.3: Binderegionen der verwendeten Primer**

| Primerpaar | Plasmid/Transposon/Chromosom ( Accession No., Bakterienstamm) | Fragmentgröße [bp] | Referenzen |
|---|---|---|---|
| *aac6-aph2a* | M13771, *E. faecalis*<br>pTEF1, NC_004669, *E. faecalis* V583<br>Tn*4001*, M18086, *S. aureus*<br>pSK41, NC_005024, *S. aureus**<br>pGO1, FM207042, *S. aureus*<br>pSK1, GU565967, *S. aureus*<br>pLW1043, NC_005054, *S. aureus*<br>pSK77, GQ900494, *S. aureus*<br>pSK23, GQ900491, *S. aureus*<br>pSK105, GQ900462, *S. aureus*<br>SCC*mec*ZH47, AM292304, *S. aureus*<br>Tn*6072*, GU235985, *S. aureus*<br>SAP082A, GQ900434, *S. aureus*<br>SAP080A, GQ900433, *S. aureus*<br>SAP079A, GQ900432, *S. aureus*<br>SAP069A, GQ900422, *S. aureus*<br>SAP068A, GQ900421, *S. aureus*<br>SAP018A, GQ900383, *S. aureus*<br>SAP017A, GQ900382, *S. aureus*<br>SAP016A, GQ900381, *S. aureus*<br>SAP015B, GQ900500, *S. aureus*<br>SAP014A, GQ900379, *S. aureus*<br>pMG1, AB206333, *E. faecium* | 611 | diese Arbeit |
| *aadD* | pSK41, NC_005024, *S. aureus**<br>pGO1, FM207042, *S. aureus*<br>pUB110, NC_001384, *S. aureus*<br>pTB19, MG3891, *B. stearothermophilus*<br>SAP082A, GQ900434, *S. aureus*<br>SAP080A, GQ900433, *S. aureus*<br>SAP079A, GQ900432, *S. aureus*<br>SAP069A, GQ900422, *S. aureus*<br>SAP016A, GQ900381, *S. aureus* | 525 | diese Arbeit |

**Tab. 3.3: Fortsetzung**

| Primerpaar | Plasmid/Transposon/Chromosom ( Accession No., Bakterienstamm) | Fragmentgröße [bp] | Referenzen |
|---|---|---|---|
| *aadD* | SAP069A, GQ900422, *S. aureus*<br>SAP016A, GQ900381, *S. aureus*<br>SAP015B, GQ900500, *S. aureus*<br>SAP014A, GQ900379, *S. aureus*<br>SCC*mec* IVA, EU437549, *S. aureus* cm11 | 525 | diese Arbeit |
| *aph(2)-Ib* | AF207840, *E. faecium* SF11770*<br>AF337947, *E. coli*<br>FN665654, *C. difficile* | 867 | Vakulenko and Mobashery (2003) |
| *aph(2)-Ic* | U51479, *E. gallinarum* SF9117* | 444 | Vakulenko and Mobashery (2003) |
| *aph(2)-Id* | AF016483, *E. casseliflavus* UC73*<br>AY677166, *E. faecium*<br>Tn*pA*, AY939911, *E. casseliflavus* | 641 | Vakulenko and Mobashery (2003) |
| *aph3-III* | M36771, *S. aureus*<br>Tn*1545*, AM903082, *S. pneumoniae*<br>Tn*6003*, AM410044, *S. pneumoniae*<br>Tn*1311*, FN667862, *S. pneumoniae*<br>SAP052A, GQ900412, *S. aureus*<br>SAP051A, GQ900410, *S. aureus*<br>SAP050A, GQ900409, *S. aureus*<br>SAP049A, GQ900407, *S. aureus*<br>SAP046A, GQ900403, *S. aureus*<br>SAP027A, GQ900388, *S. aureus*<br>SAP015A, GQ900380, *S. aureus*<br>p18811-P03, CP002143, *S. aureus*<br>p18810-P03, CP002141, *S. aureus*<br>p18809-P03, CP002139, *S. aureus*<br>p18808-P03, CP002137, *S. aureus*<br>p18807-P03, CP002135, *S. aureus*<br>p18806-P03, CP002134, *S. aureus*<br>p18811-P03, CP002132, *S. aureus*<br>pRE25, X92945, *E. faecalis* RE25*<br>pUSA300HOUMR, CP000731, *S. aureus* USA300-HOU-MR | 609 | diese Arbeit |
| $cat_{pC194}$ | pC194, NC_002013, *S. aureus**<br>pMC524-MBM, AJ312056, *S. aureus*<br>pTC82, U75299, *L. reuteri*<br>SAP065A, GQ900420, *S. aureus*<br>pC194-like, EU602348, *S. sciuri*<br>pKH15, EU170348, *S. aureus*<br>pKH13, EU170347, *S. aureus*<br>Tn*1311*, FN667862, *S. pneumoniae*<br>Tn*5253*-like, FM201786, *S. pneumoniae*<br>FM211187, *S. pneumoniae* ATCC700669<br>CP001033, *S. pneumoniae* CGSP14 | 414 | diese Arbeit |
| $cat_{pIP501}$ | pIP501, X65462, *S. agalactiae**<br>pSCS1, M64281, *S. intermedius*<br>pSCS6, X60827, *S. aureus*<br>pC221, X02529, *S. aureus*<br>pUB112, X02872, *S. aureus*<br>pKH7, U38429, *S. aureus*<br>pRE25, X92945, *E. faecalis* RE25<br>pGB354, U83488, *S. agalactiae*<br>pTZ12, M16192, *B. subtilis* | 409 | diese Arbeit |
| $cat_{LM}$ | pWDB100, X68412, *L. monocytogenes*<br>pC223, AY355285, *S. aureus*<br>pSBK203, M90091, *S. aureus*<br>SAP089A, GQ900440, *S. aureus*<br>SAP084A, GQ900436, *S. aureus*<br>pSK103, GQ900463, *S. aureus*<br>pRUM, AF507977, *E. faecium*<br>pK214, X92946, *L. lactis* K214* | 313 | diese Arbeit |

**Tab. 3.3: Fortsetzung**

| Primerpaar | Plasmid/Transposon/Chromosom ( Accession No., Bakterienstamm) | Fragmentgröße [bp] | Referenzen |
|---|---|---|---|
| *cat*$_{LM}$ | pWDB100, X68412, *L. monocytogenes*<br>pC223, AY355285, *S. aureus*<br>pSBK203, M90091, *S. aureus*<br>SAP089A, GQ900440, *S. aureus*<br>SAP084A, GQ900436, *S. aureus*<br>pSK103, GQ900463, *S. aureus*<br>pRUM, AF507977, *E. faecium*<br>pK214, X92946, *L. lactis* K214* | 313 | diese Arbeit |
| *ermB* | pIP501, U00453, *S. agalactiae**<br>pRE25, X92945, *E. faecalis* RE25<br>pTEF1, NC_004669, *E. faecalis* V583<br>pTW9, AB563188, *E. faecalis*<br>Tn*2010*, AB426620, *S. pneumoniae*<br>Tn*1545*, X52632, *S. pneumoniae*<br>Tn*1311*, FN667862, *S. pneumoniae*<br>Tn*6003*, AM410044, *S. pneumoniae*<br>pLFE1, FJ374272, *L. plantarum*<br>pTE44, AY082384, *L. reuteri* AE78<br>pTE80, AF080450, *L. reuteri* A1<br>p5753cB, GQ900487, *E. faecium*<br>pKL0018, AB290882, *L. garvieae*<br>pI258, GQ900378, *S. aureus* | 573 | Böckelmann *et al*. (2009) |
| *erm*C | pE194, V01278, *S. aureus*<br>pUSA03, CP000258, *S. aureus* USA300-FPR3757<br>pWBG738, DQ088624, *S. aureus* CA-MRSA<br>pWBG751, GQ900393, *S. aureus* CA-MRSA<br>pDLK1, GU562624, *S. aureus*<br>SAP085B, GQ900438, *S. aureus*<br>SAP078B, GQ900431, *S. aureus*<br>pKH19, EU350090, *S. aureus*<br>pKH20, EU350089, *S. aureus*<br>pSES31, Y17294, *S. aureus*<br>pSES5, Y09001, *S. hominis*<br>pSES4a, Y09002, *S. haemolyticus*<br>pSTE2, AJ888003, *S. lentus*<br>pPV141, U82607, *S. chromogenes*<br>pSHaeB, AP006718, *S. hemolyticus* JCSC1435<br>pSES22, AM159501, *S. saprophyticus* (1 mismatch) | 455 | diese Arbeit |
| *erm*D | M29832, *B. subtilis* BD662*<br>LO8389, *B. anthracis* 590 | 462 | diese Arbeit |
| *erm*G | M15332, *B. subtilis* BD1156*<br>CTnGERM1, AJ557257, *B. ovatus*<br>Tcr Emr 7853, L42817, *B. thetaiotaomicron* | 460 | diese Arbeit |
| *mec*A | X52593, *S. aureus* subsp. *aureus* (DSM 13661)*<br>SCC*mec*ZH47, AM292304, *S. aureus*<br>X52592, *S. epidermidis* | 733 | Böckelmann *et al*. (2009) |
| *tet*K | pT181, CP001783, *S. aureus**<br>pSK101, GQ900499, *S. epidermidis*<br>pWBG753, GQ900395, *S. aureus*<br>SAP103A, GQ900497, *S. aureus*<br>SAP095B, GQ900445, *S. aureus*<br>SAP094A, GQ900443, *S. aureus*<br>SAP093A, GQ900441, *S. aureus*<br>SAP085A, GQ900437, *S. aureus*<br>SAP060B, GQ900417, *S. aureus*<br>SAP014A, GQ900379, *S. aureus*<br>pSTE2, AJ888003, *S. lentus*<br>pKH1, U38656, *S. aureus*<br>pKH6, U38428, *S. aureus*<br>pKH16,EU365621, *S. aureus* | 539 | diese Arbeit |

**Tab. 3.3: Fortsetzung**

| Primerpaar | Plasmid/Transposon/Chromosom ( Accession No., Bakterienstamm) | Fragmentgröße [bp] | Referenzen |
|---|---|---|---|
| *tet*K | pKH17, EU365622, *S. aureus*<br>pSE-12228-01, AE015930, *S. epidermidis*<br>pUSA02, CP000257, *S. aureus* USA300-FPR3757<br>pSW174, AM040729, *S. warneri*<br>SCC*mec* and SCC*mercury*, AB037671, *S. aureus*<br>pJ3358, U36910, *S. aureus* | 539 | diese Arbeit |
| *tet*M | Tn*916*, U09422, *E. faecalis* DS16*<br>Tn*6085*, HM243623, *E. faecium* C68<br>Tn*6048*, HM243622, *E. faecium* C68<br>Tn*6085*, HM243621, *E. faecium* C68<br>Tn*916*, FN550102, *S. rostri*<br>Tn*5801*, EU918666, *S. aureus*<br>Tn*5251*, FJ711160, *S. pneumoniae*<br>pMD5057, AF440277, *L. plantarum* | 741 | Tenover and Rasheed (2004) |
| *tet*O | M18896, *C. jejuni*<br>Tn*5252*-like, FM178797, *S pneumoniae* | 738 | Böckelmann *et al*. (2009) |
| *tet*S | pK214, X92946, *L. lactis* K214*<br>Tn*6000*, FN555436, *E. casseliflavus* 664.1H1<br>p5753cB, GQ900487, *E. faecium*<br>pKL0018, AB290882, *L. garvieae*<br>Tn*916S*, AY534326, *S. intermedius*<br>pIP811, L09756, *L. monocytogenes* | 508 | diese Arbeit |
| *van*A | AF516335, *E. faecium* (DSM 17050)*<br>pUW786, AF516335, *E. faecium*<br>pIP816, X56895, *E. faecium*<br>pVEF1, AM296544, *E. faecium*<br>pVEF2, AM410096, *E. faecium*<br>pVEF3, AM931300, *E. faecium*<br>pVEF4, FN424376, *E. faecium*<br>p5753cA, GQ900435, *E. faecium*<br>Tn*1546*, FJ866609, *E. faecium*<br>pSL1, AB247327, *E. faecalis*<br>pLW1043, NC_005054, *S. aureus*<br>pWZ1668, GQ484956, *E. faecalis*<br>pWZ7140, GQ484955, *E. faecalis*<br>pWZ909, GQ484954, *E. faecalis* | 572 | Böckelmann *et al*. (2009) |
| *van*B | AE016833, *E. faecalis* V583*<br>U94527, *E. faecium* | 457 | Miele *et al*. (1995) |
| *van*C1/2 | AF162694/L29638, *E. gallinarum* SF9117* | 815/827 | Depardieu *et al*. (2004) |

*markiert die Referenzstämme für die jeweilige PCR, für *erm*C wurde *S. haemolyticus* VPS617 als positive Kontrolle verwendet; SAP: *S. aureus* Plasmid

Die Ergebnisse des Screenings auf Antibiotika-Resistenzgene sind in der Tabelle 3.4 zusammengefasst.

**Tab. 3.4: Antibiotika-Resistenzgene in den ISS und Concordia Isolaten**

| TU-Nr. | Spezies[a] | SCK·CEN Nummerierung[b] | Genotyp |
|---|---|---|---|
| 27. | *B. firmus* (16S) | T5-Air6-2 | *aph3-III* |
| 30. | *Paenibacillus* (16S) | T5-Air8-3 | $cat_{pIP501}$ |
| 33. | *B. cereus s.l.* (16S) | T6-Air5-1 | $cat_{pC194}$ |
| 34. | *B. cereus s.l.* (16S) | T8-Air6-4 | $cat_{pC194}$ |
| 37. | *B. cereus s.l.* (16S) | T9-Air1-1 | *erm*G |
| 38. | *Paenibacillus s*p. (16S) | T9-Air5-1 | *erm*C |
| 46. | *S. aureus* | T5-Air7-8 | $cat_{pIP501}$ |
| 47. | *S. aureus* (ISS) | R42 | $cat_{pIP501}$, *aadD* |
| 48. | *S. epidermidis* | R56 | $cat_{pIP501}$ |
| 49. | *S. epidermidis* (ISS) (16S) | R61 | *aac6-aph2a,* $cat_{pIP501}$ |
| 51. | *S. epidermidis* | T0-C2-HA37-1 | *erm*C, *erm*G |
| 55. | *S. epidermidis* | T11-Air2-8 | *erm*C, *tet*M, *tet*K, $cat_{LM}$ |
| 60. | *S. epidermidis* (ISS) | Plate5iso2 (p5i2) | $cat_{LM}$ |
| 61. | *S. capitis* subsp. *capitis* (16S) | T11-Air4-7 | *erm*C, *mec*A, $cat_{LM}$ |
| 64. | *S. epidermidis* (ISS) | R75 | *tet*K |
| 65. | *S. epidermidis* (ISS) | Plate8 iso1 | *tet*K |
| 66. | *S. epidermidis* (ISS) | Plate10 iso12 | *aph3-III* |
| 69. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso10 | *aph3-III*, $cat_{pIP501}$ |
| 70. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso11 | *aph3-III*, *tet*M, $cat_{pIP501}$ |
| 71. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso14 | *aph3-III*, *tet*M, $cat_{pIP501}$ |
| 72. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso16 | *aph3-III*, *tet*M, $cat_{pIP501}$ |
| 73. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso18 | *aph3-III*, *tet*M, $cat_{pIP501}$ |
| 74. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso2 | *aph3-III*, *erm*B, *tet*M, $cat_{pIP501}$ |
| 75. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso3 | *aph3-III*, *erm*B, *erm*D, *tet*M, $cat_{pIP501}$ |
| 76. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso4 | *aph3-III*, *tet*M, $cat_{pIP501}$ |
| 77. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso5 | *aph3-III*, *erm*B, *erm*D, *tet*M, $cat_{pIP501}$ |
| 78. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso7 | *aph3-III*, *erm*B, *erm*D, *tet*M, $cat_{pIP501}$ |
| 79. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso8 | *aph3-III*, *erm*B, *tet*M, *tet*O, $cat_{pIP501}$ |
| 80. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso9 | *aph3-III*, *erm*B, *tet*M, $cat_{pIP501}$ |
| 83. | *Microbacterium* sp. (16S) | T4-Air3-1 | *erm*C, *tet*K |
| 85. | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T3-Air3-4 | *erm*C, *tet*K |
| 98. | *Staphylococcus.* sp | T0-C4-HA28-3 | $cat_{pC194}$ |
| 100. | *S. lugdunensis* (ISS) | R76 | $cat_{pC194}$ |
| 101. | *S. lugdunensis* (ISS) (16S) | 4IJ-4 | $cat_{pC194}$ |
| 103. | *S. haemolyticus* (ISS) (16S) | 5IL-2 | *erm*C, *tet*K |
| 104. | *S. aureus* (ISS) (16S) | 6OD-2 | *erm*C |
| 105. | *S. pasteuri* | T0-C6-HA28-5 | *erm*C |
| 106. | *S. haemolyticus* (16S) | T0B-C2-HA37-3 | *aph3-III*, *erm*C |
| 108. | *S. hominis* (16S) | R44 | *erm*C, *tet*K |
| 109. | *S. haemolyticus* | R69 | *erm*C, *tet*K |
| 110. | *S. hominis* subsp. *hominis* (ISS) (16S) | 7IL-2 | *erm*C, *erm*G, *tet*K, $cat_{pC194}$ |
| 113. | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T2-Air5-3 | *erm*C, *tet*K |
| 114. | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T2-Air7-1 | *van*B, *erm*C, *erm*G |
| 120. | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T6-Air2-3 | $cat_{pIP501}$ |
| 124. | *S. epidermidis* (16S) | T11-Air4-3 | *erm*D, $cat_{pC194}$, *aac6-aph2a* |
| 125. | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T12-Air2-1 | *van*B, *erm*D, $cat_{pC194}$, $cat_{LM}$ |
| 130. | *S. epidermidis* (16S) | T0-C6-HA28-3 | *erm*C, *erm*D |
| 137. | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T0B-C4-HA37-4 | *van*B |

[a](16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK; sp: species; subsp: subspecies
[b]Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Plate: Isolate einer bestimmten Agarplatte
[c]*aac6-aph2a*: Gentamycin; *aadD*, *aph3-III*: Kanamycin; *cat*: Chloramphenicol; *erm*: Erythromycin; *mec*: Methicillin; *tet*: Tetracyclin; *van*: Vancomycin

In 48 Stämmen (42,5%) konnten Antibiotika-Resistenzgene nachgewiesen werden, alleine 29 Stämme (60,4%) beinhalten zwei oder mehr (bis zu fünf) Resistenzgene. In

den restlichen 19 (39,6%) konnte nur jeweils ein Resistenzgen detektiert werden (Tab. 3.4).

In 18 Stämmen (37,5%) wurde das $cat_{pIP501}$ Resistenzgen detektiert, das in 6 Stämmen (Enterokokken) in Verbindung mit *aph3-III*, *erm*B und *tet*M vorliegt. Fünf Stämme (Enterokokken) beinhalten zusätzlich zum $cat_{pIP501}$ das *aph3-III* und *tet*M Gen und in drei weiteren wurden jeweils zusätzlich die Gene *aph3-III* (*E. faecalis* 69), *aadD* (*S. aureus* 47) und *aac6-aph2a* (*S. aureus* 49) detektiert. Weiterhin wurde zusätzlich in drei Enterokokken (75, 77, 78) das *erm*D Gen gefunden, das bis jetzt nur in *Bacillus* Spezies detektiert werden konnte (Roberts, 2008). In einem einzigen *E. faecalis* Stamm (79) konnte das *tet*O Gen neben *tet*M, $cat_{pIP501}$, *erm*B und *aph3-III* nachgewiesen werden. In acht Stämmen konnte $cat_{pC194}$ detektiert werden, davon in zwei Stämmen in Verbindung mit *erm*D und *aac6-aph2a* (*S. epidermidis* 124) und *erm*D, $cat_{LM}$ und *vanB* (*S. hominis* subsp. *hominis* 125). Das Chloramphenicol-Resistenzgen $cat_{LM}$ konnte in vier Stämmen detektiert werden, in *S. epidermidis* 60, in *S. epidermidis* 55 in Verbindung mit *erm*C, *tet*M und *tet*K und in *S. capitis* subsp*. capitis* 61 in Verbindung mit *erm*C und *mec*A, sowie in *S. hominis* subsp. *hominis* 125.

In 16 Stämmen (33,3%) wurde das *erm*C Gen nachgewiesen, davon in acht Stämmen zusammen mit dem Tetracyclin-Resistenzgen *tet*K.

Das *erm*G Resistenzgen wurde in vier Stämmen nachgewiesen, davon einmal in *B. cereus s.l.* 37 und dreimal in Staphylokokken (51, 110, 114) zusammen mit dem *erm*C Gen. In drei Staphylokokken (124, 125 und 130) wurde zusätzlich das *erm*D Gen nachgewiesen, in *S. epidermidis* 130 zusammen mit *erm*C.

Das Kanamycin-Resistenzgen *aph3-III* wurde in 15 (31,3%) Stämmen nachgewiesen; in allen Enterokokken (12) in Verbindung mit anderen Resistenzgenen (siehe Abschnitt zu $cat_{pIP501}$), in zwei Staphylokokken (66 und 106) und in *Bacillus firmus* 27. Das „*high level*" Gentamycin-Resistenzgen *aac6-aph2a* konnte nur in zwei Stämmen (*S. epidermidis* 49 und 124) amplifiziert werden. Stamm 49 besitzt zusätzlich $cat_{pIP501}$ und die 124 noch *erm*D und $cat_{pC194}$. Nur in einem Stamm, *S. epidermidis* 47, wurde das *aadD* Gen nachgewiesen.

In 12 Stämmen (25%) konnte das *tet*M Gen detektiert werden, einmal in *S. epidermidis* 55 in Verbindung mit *tet*K, *erm*C und $cat_{LM}$, sowie in elf Enterokokken. Das *tet*K Gen wurde in zehn (20,8%) Staphylokokken Stämmen gefunden, acht davon tragen zusätzlich das *erm*C Gen und zwei (55 und 110) zusätzliche Resistenzgene.

Das Vancomycin-Resistenzgen *van*B konnte in insgesamt drei (6,3%) *Staphylococcus* Stämmen (114, 125, 137) mittels Southern-Hybridisierung nachgewiesen werden (Rogowski, 2010). Stämme 114 und 125 besitzen neben *van*B noch weitere Resistenzgene; 114 noch *erm*C und *erm*G und 125 *erm*D und $cat_{pC194}$.

### 3.1.4 Untersuchung der Isolate auf Transfergene mittels PCR

Für das PCR-Screening der Isolate auf mobile genetische Elemente wurden von Dr. Karsten Arends Primer für Relaxasen der $MOB_Q$ (pIP501, pRE25, pSK41, pGO1) und $MOB_V$ Familie (pT181, pJS42, pSK41, pGO1) mehrerer Plasmide aus G+ Bakterien (Smillie *et al*., 2010; Garcillán-Barcia *et al*., 2009; Francia *et al*., 2004) sowie Primer, die spezifisch an *virD4* (*orf10*/*traK*)*, virB1* (*orf7*/*traG*) und *virB4* (*orf5*/*traE*) ähnliche Gene von unterschiedlichen konjugativen Plasmiden (pIP501, pRE25, pSK41, pGO1, pSM19035, pMRC01) aus G+ Bakterien binden können, entwickelt. Anhand der auf Relaxase Genen basierten PCR-Assays können 44 verschiedene mobilisierbare und konjugative Plasmide, u.a. auch pUSA02 und pUSA03 des CA-MRSA USA300, detektiert werden (Tab.:3.5 und 3.6).

**Tab. 3.5: Binderegionen der Relaxase-Primer**

| Primerpaar | Plasmide (Name, Accession No., Bakterienstamm) | Produktgröße [bp] |
|---|---|---|
| pJS42 | pRI1, EU327398, *E. faecium* | 404 |
| | pJS42, NC_010291, *E. faecium** | |
| pSK41 *pre* | pUB110, NC_001384, *S. aureus* | |
| | pSK41, NC_005024, *S. aureus* SK982* | 396 |
| | pGO1, NC_012547, *S. aureus* RN7247 | |
| | pAMalpha1, AF503772, *E. faecalis* | |
| | pTB19, M63891, *G. stearothermophilus* | |
| | pTB53, D14852, *G. stearothermophilus* | |
| | pBC16, U32369, *B. cereus* | |
| | pGR71, X15503, *B. subtilis* | |
| | pIP1714, AF015628, *S. cohnii* | |
| | pKKS2187, FM207105, *S. aureus* | |
| | pKKS627, FN390948, *S. aureus* | |
| | SAP014A, GQ900379, *S. aureus* | |
| | SAP016A, GQ900381, *S. epidermidis* | |
| | pSES22, AM159501, *S. saprophyticus* (1 mismatch) | |
| pT181 | pT181, NC_001393, *S. aureus** | 400 |
| | pSTE2, AJ888003, *S. lentus* | |
| | pUSA02, CP000257, *S. aureus* | |
| | pSE-12228-01, AE015930, *S. epidermidis* | |
| | pKH1, U38656, *S. aureus* | |
| | pKH6, U38428, *S. aureus* | |
| | pKH7, U38429, *S. aureus* | |
| | pKH16, EU365621, *S. aureus* | |
| | pSK101, GQ900499, *S. epidermidis* | |
| | pWBG753, GQ900395, *S. aureus* | |
| | SAP103A, GQ900497, *S. aureus* | |
| | SAP095B, GQ900445, *S. aureus* | |
| | SAP094A, GQ900443, *S. aureus* | |

**Tab. 3.5: Fortsetzung**

| Primerpaar | Plasmide (Name, Accession No., Bakterienstamm) | Produktgröße [bp] |
|---|---|---|
| pT181 | SAP093A, GQ900441, *S. aureus* | 400 |
| | SAP085A, GQ900437, *S. aureus* | |
| | SAP060B, GQ900417, *S. aureus* | |
| | SAP014A, GQ900379, *S. aureus* | |
| | pJ3358, U36910, *S. aureus* | |
| | SCC*mec* and SCC*mercury*, AB037671, *S. aureus* | |
| pSK41 *nes* | pSK41, NC_005024, *S. aureus* SK982* | 328 |
| | pGO1, NC_012547, *S. aureus* RN7247 | |
| | pUSA03, CP000258, *S. aureus* USA300-FPR3757 | |
| | pLW1043, NC_005054, *S. aureus* | |
| | pPR9, GU237136, *S. aureus* | |
| | SAP082A, GQ900434, *S. aureus* | |
| | SAP080A, GQ900433, *S. aureus* | |
| | SAP079A, GQ900432, *S. aureus* | |
| | SAP069A, GQ900422, *S. aureus* | |
| | SAP068A, GQ900421, *S. aureus* | |
| | SAP014A, GQ900379, *S. aureus* | |
| | SAP015B, GQ900501, *S. aureus* | |
| pIP501 *orf1* | pRE25, X92945, *E. faecalis* RE25 | 339 |
| | pIP501, X65462, *S. agalactiae** | |

*markiert die Referenzstämme für die jeweilige PCR; SAP: *S. aureus* Plasmid

**Tab. 3.6: Binderegionen der Primer für die Transfergene**

| Primerpaar | Plasmide (Name, Accession No., Bakterienstamm) | Produktgröße [bp] |
|---|---|---|
| pSK41 *traE* | pSK41, NC_005024, *S. aureus* SK982* | 626 |
| | pGO1, NC_012547, *S. aureus* RN7247 | |
| | pUSA03, CP000258, *S. aureus* USA300-FPR3757 | |
| | pLW1043, NC_005054, *S. aureus* | |
| | pPR9, GU237136, *S. aureus* | |
| | pMRC01, AE001272, *L. lactis* | |
| | pV030-8, EU366902, *S. aureus* | |
| | SAP082A, GQ900434, *S. aureus* | |
| | SAP080A, GQ900433, *S. aureus* | |
| | SAP079A, GQ900432, *S. aureus* | |
| | SAP069A, GQ900422, *S. aureus* | |
| | SAP068A, GQ900421, *S. aureus* | |
| | SAP014A, GQ900379, *S. aureus* | |
| | SAP015B, GQ900501, *S. aureus* | |
| pSK41 *traG* | pSK41, NC_005024, *S. aureus* SK982* | 457 |
| | pGO1, NC_012547, *S. aureus* RN7247 | |
| | pUSA03, CP000258, *S. aureus* USA300-FPR3757 | |
| | pLW1043, NC_005054, *S. aureus* | |
| | pPR9, GU237136, *S. aureus* | |
| | pV030-8, EU366902, *S. aureus* | |
| | SAP082A, GQ900434, *S. aureus* | |
| | SAP080A, GQ900433, *S. aureus* | |
| | SAP079A, GQ900432, *S. aureus* | |
| | SAP079A, GQ900432, *S. aureus* | |
| | SAP069A, GQ900422, *S. aureus* | |
| | SAP068A, GQ900421, *S. aureus* | |
| | SAP014A, GQ900379, *S. aureus* | |
| | SAP015B, GQ900501, *S. aureus* | |
| pSK41 *traK* | pSK41, NC_005024, *S. aureus* SK982* | 573 |
| | pGO1, NC_012547, *S. aureus* RN7247 | |
| | pUSA03, CP000258, *S. aureus* USA300-FPR3757 | |
| | pLW1043, NC_005054, *S. aureus* | |
| | SAP082A, GQ900434, *S. aureus* | |
| | SAP080A, GQ900433, *S. aureus* | |
| | SAP079A, GQ900432, *S. aureus* | |
| | SAP069A, GQ900422, *S. aureus* | |

**Tab. 3.6: Fortsetzung**

| Primerpaar | Plasmide (Name, Accession No., Bakterienstamm) | Produktgröße [bp] |
|---|---|---|
| pSK41 *traK* | SAP068A, GQ900421, *S. aureus*<br>SAP014A, GQ900379, *S. aureus*<br>SAP015B, GQ900501, *S. aureus*<br>pMUP8, DQ232636, *S. aureus*<br>pMUP7, DQ232635, *S. aureus*<br>pMUP6, DQ232634, *S. aureus*<br>pMUP5, DQ232633, *S. aureus*<br>pMUP4, DQ232632, *S. aureus*<br>pMUP3, DQ232631, *S. aureus*<br>pMUP2, DQ232630, *S. aureus* | 573 |
| pSK41 *traL* | pSK41, NC_005024, *S. aureus* SK982*<br>pGO1, NC_012547, *S. aureus* RN7247<br>pUSA03, CP000258, *S. aureus* USA300-FPR3757<br>pLW1043, NC_005054, *S. aureus*<br>pPR9, GU237136, *S. aureus*<br>SAP082A, GQ900434, *S. aureus*<br>SAP080A, GQ900433, *S. aureus*<br>SAP079A, GQ900432, *S. aureus*<br>SAP069A, GQ900422, *S. aureus*<br>SAP068A, GQ900421, *S. aureus*<br>SAP014A, GQ900379, *S. aureus*<br>SAP015B, GQ900501, *S. aureus* | 388 |
| pSK41 *traM* | pSK41, NC_005024, *S. aureus* SK982*<br>pGO1, NC_012547, *S. aureus* RN7247<br>pUSA03, CP000258, *S. aureus* USA300-FPR3757<br>pLW1043, NC_005054, *S. aureus*<br>pPR9, GU237136, *S. aureus*<br>SAP082A, GQ900434, *S. aureus*<br>SAP080A, GQ900433, *S. aureus*<br>SAP079A, GQ900432, *S. aureus*<br>SAP069A, GQ900422, *S. aureus*<br>SAP068A, GQ900421, *S. aureus*<br>SAP014A, GQ900379, *S. aureus*<br>SAP015B, GQ900501, *S. aureus* | 181 |
| pIP501 *orf5* | pRE25, X92945, *E. faecalis* RE25<br>pIP501, X65462, *S. agalactiae**<br>pAMbeta1, GU128949, *E. faecalis*<br>pWZ1668, GQ484956, *E. faecalis*<br>pWZ7140, GQ484955, *E. faecalis*<br>pWZ909, GQ484954, *E. faecalis* | 654 |
| pIP501 *orf7* | pRE25, X92945, *E. faecalis* RE25<br>pIP501, X65462, *S. agalactiae**<br>pSM19035, AY357120, *S. pyogenes*<br>pWZ1668, GQ484956, *E. faecalis*<br>pWZ7140, GQ484955, *E. faecalis*<br>pWZ909, GQ484954, *E. faecalis* | 434 |
| pIP501 *orf10* | pRE25, X92945, *E. faecalis* RE25<br>pIP501, X65462, *S. agalactiae**<br>pSM19035, AY357120, *S. pyogenes*<br>pAMbeta1, GU128949, *E. faecalis*<br>pWZ1668, GQ484956, *E. faecalis*<br>pWZ7140, GQ484955, *E. faecalis*<br>pWZ909, GQ484954, *E. faecalis* | 729 |

*markiert die Referenzstämme für die jeweilige PCR; SAP: *S. aureus* Plasmid

Die Resultate des PCR-Screenings auf Schlüsselgene des konjugativen Transfers G+ Bakterien in den ISS und Concordia Stämmen sind in der Tabelle 3.7 zusammengefaßt. Die zusätzlich detektierten Resistenzgene sind mit aufgeführt.

**Tab. 3.7: Transfer- und Antibiotika-Resistenzgene in den ISS und Concordia Stämmen**

| TU-Nr. | Spezies[a] | SCK·CEN Nummerierung[b] | Genotyp[c] |
|---|---|---|---|
| 6. | *B. megaterium* (16S) | T0-Air8-9 | *nes*$_{pSK41}$ |
| 24. | *B. psychrodurans* (16S) | T4-Air1-6 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 25. | *B. simplex* (16S) | T5-Air1-1 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 27. | *B. firmus* (16S) | T5-Air6-2 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III* |
| 30. | *Paenibacillus* sp. (16S) | T5-Air8-3 | *pre*$_{pSK41}$, *cat*$_{pIP501}$ |
| 31. | *B. circulans* (16S) | T5-Air8-4 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 32. | *B. circulans* (16S) | T6-Air2-4 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 36. | *B. circulans (16S)* | T8-Air8-3 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 38. | *Paenibacillus s*p. (16S) | T9-Air5-1 | *pre*$_{pSK41}$, *erm*C |
| 39. | *Paenibacillus* sp. (16S) | T9-Air5-1 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 40. | *Paenibacillus* sp. (16S) | T8-Air6-5 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 41. | *S. aureus* (ISS) | R87 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 45. | *S. aureus* | T5-Air3-1 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 52. | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA28-3 | pT181-Relaxase |
| 53. | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA37-2 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 55. | *S. epidermidis* | T11-Air2-8 | pT181-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, *traK*, *erm*C, *tet*M, *tet*K, *cat*$_{LM}$ |
| 56. | *S. epidermidis* | T4-Air8-1 | pT181-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$ |
| 58. | *S. epidermidis* (ISS) (16S) | R12 | pT181-Relaxase, *nes*$_{pSK41}$,*pre*$_{pSK41}$, *traE*, *traG*, *traK*, *traM*, *traL* |
| 60. | *S. epidermidis* (ISS) | Plate5iso2 (p5i2) | *pre*$_{pSK41}$, pT181-Relaxase, *cat*$_{LM}$ |
| 61. | *S. capitis* subsp. *capitis* (16S) | T11-Air4-7 | *pre*$_{pSK41}$, *erm*C, *mec*A, *cat*$_{LM}$ |
| 62. | *S. epidermidis* (16S) | T0-C3-HA28-3 | *pre*$_{pSK41}$, pT181-Relaxase |
| 64. | *S. epidermidis* (ISS) | R75 | *pre*$_{pSK41}$, pT181-Relaxase, *tet*K |
| 65. | *S. epidermidis* (ISS) | Plate8 iso1 | *pre*$_{pSK41}$, pT181-Relaxase, *tet*K |
| 66. | *S. epidermidis* (ISS) | Plate10 iso12 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III* |
| 67. | *S. aureus* | T0-C2-HA28-5 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 68. | *S. aureus* | T0-C2-HA37-4 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 69. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso10 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III*, *cat*$_{pIP501}$ |
| 70. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso11 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III*, *tet*M, *cat*$_{pIP501}$ |
| 71. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso14 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III*, *tet*M, *cat*$_{pIP501}$ |
| 72. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso16 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III*, *tet*M, *cat*$_{pIP501}$ |
| 73. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso18 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III*, *tet*M, *cat*$_{pIP501}$ |
| 74. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso2 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III*, *erm*B, *tetM*, *cat*$_{pIP501}$ |
| 75. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso3 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III*, *erm*B, *erm*D, *tet*M, *cat*$_{pIP501}$ |
| 76. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso4 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III*, *tet*M, *cat*$_{pIP501}$ |
| 77. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso5 | *pre*$_{pSK41}$, *orf7*, *orf10*, *aph3-III*, *erm*B, *erm*D, *tet*M, *cat*$_{pIP501}$ |
| 78. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso7 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III*, *erm*B, *ermD*, *tet*M, *cat*$_{pIP501}$ |
| 79. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso8 | *pre*$_{pSK41}$, *aph3-III*, *erm*B, *tet*M, *tet*O, *cat*$_{pIP501}$ |
| 80. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso9 | *pre*$_{pSK41}$, *orf7*, *aph3-III*, *erm*B, *tet*M, *cat*$_{pIP501}$ |
| 83. | *Microbacterium* sp. (16S) | T4-Air3-1 | pT181-Relaxase, *erm*C, *tet*K |
| 85. | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T3-Air3-4 | pT181-Relaxase, *erm*C, *tet*K |
| 96. | *S. pasteuri* | T0-C3-HA28-2 | pT181-Relaxase |
| 97. | *S. pasteuri* (16S) | T0-C4-HA28-1 | pT181-Relaxase |
| 98. | *Staphylococcus* sp. (16S) | T0-C4-HA28-3 | *pre*$_{pSK41}$, *traE*, *cat*$_{pC194}$ |
| 99. | *S. saprophyticus* (ISS) (16S) | R13 | *nes*$_{pSK41}$, *traE*, *traG*, *traK*, *traM*, *traL* |
| 100. | *S. lugdunensis* (ISS) | R76 | *traE, traG, traM*, *traL*, *cat*$_{pC194}$ |
| 101. | *S. lugdunensis* (ISS) (16S) | 4IJ-4 | *traE, traG, traK, traM, cat*$_{pC194}$ |
| 103. | *S. haemolyticus* (ISS) (16S) | 5IL-2 | *traE, traG, traK, traM*, *traL, erm*C, *tet*K |
| 108. | *S. hominis* (ISS) (16S) | R44 | pT181-Relaxase, *erm*C, *tet*K |
| 109. | *S. haemolyticus* (ISS) | R69 | pT181-Relaxase, *traE*, *erm*C, *tet*K |
| 110. | *S. hominis* subsp*. hominis* (ISS) (16S) | 7IL-2 | *nes*$_{pSK41}$, pT181-Relaxase, *traE, traG, traK, traM*, *traL, erm*C, *erm*G, *tet*K, *cat*$_{pC194}$ |
| 111. | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T0-Air1-1 | pJS42-Relaxase, *nes*$_{pSK41}$ |

**Tab. 3.7: Fortsetzung**

| TU-Nr. | Spezies[a] | SCK·CEN Nummerierung[b] | Genotyp[c] |
|---|---|---|---|
| 113. | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T2-Air5-3 | pT181-Relaxase, *nes*$_{pSK41}$, *pre*$_{pSK41}$, *erm*C, *tet*K |
| 115. | *S. capitis* | T3-Air2-3 | nes$_{pSK41}$ |
| 116. | *S. epidermidis* (16S) | T5-Air4-3 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 118. | *S. epidermidis* (16S) | T6-Air2-1 | *nes*$_{pSK41}$ |
| 120. | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T6-Air2-3 | *nes*$_{pSK41}$, *cat*$_{pIP501}$ |
| 121. | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T9-Air2-4 | *orf5*$_{pIP501}$, *orf1*$_{pIP501}$ |
| 123. | *S. capitis* subsp. *capitis* (16S) | T11-Air2-3 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 124. | *S. epidermidis* (16S) | T11-Air4-3 | *nes*$_{pSK41}$, *erm*D, *cat*$_{pC194}$, *aac6-aph2a* |
| 127. | *S. epidermidis* | T0-C1-HA28-3 | *pre*$_{pSK41}$, *nes*$_{pSK41}$ |
| 130. | *S. epidermidis* (16S) | T0-C6-HA28-3 | *pre*$_{pSK41}$, *erm*C, *erm*D |
| 131. | *S. hominis* subsp. *hominis* | T0-C1-HA37-1 | *orf10* |
| 134. | *S. hominis hominis/novobiosepticus* (16S) | T0B-C2-HA37-2 | *nes*$_{pSK41}$ |
| 135. | *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (16S) | T0B-C2-HA37-4 | *nes*$_{pSK41}$ |
| 137. | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T0B-C4-HA37-4 | *pre*$_{pSK41}$, *van*B |

[a](16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK; sp: species; subsp: subspecies
[b]Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Plate: Isolate einer bestimmten Agarplatte
[c]*aac6-aph2a*: Gentamycin; *aadD*, *aph3-III*: Kanamycin; *cat*: Chloramphenicol; *erm*: Erythromycin; *mec*: Methicillin; *tet*: Tetracyclin; *van*: Vancomycin

In 43 (38 %) Stämmen wurde die Pre$_{pSK41}$-Relaxase detektiert, in 14 Stämmen davon (32,5 %) konnten keine weiteren Resistenz- und Transfergene nachgewiesen werden. In elf Enterokokken wurde die Pre$_{pSK41}$-Relaxase neben *aph3-III* und *cat*$_{pIP501}$ sowie *tetM* detektiert. Die Nes$_{pSK41}$-Relaxase wurde in 13 Stämmen (11,5%) nachgewiesen, in drei Stämmen zusammen mit der pT181-Relaxase (58, 110 und 113) und in einem Stamm mit der pJS42-Relaxase (111). Im *S. hominis* subsp. *hominis* 110 konnten die Nes$_{pSK41}$-Relaxase, die pT181-Relaxase und die Transfergene *traE*, *traG*, *traK*, *traM* und *traL* sowie das Tetracyclin-Resistenzgen *tet*K detektiert werden. *S. epidermidis* 58 besitzt auch die Transfergene *traE*, *traG*, *traK*, *traM* und *traL* neben drei Relaxasegenen (pT181, Pre$_{psk41}$ und Nes$_{pSK41}$) aber keine weiteren Resistenzgene.

Die pT181-Relaxase wurde in 16 Stämmen (14,2%) nachgewiesen, sieben (43,8%) davon besitzen auch das *tet*K und *erm*C Resistenzgen (55, 83, 85, 108, 109, 110 und 113).

In vier ISS Stämmen (58, 99, 103 und 110) konnten die Transfergene *traE*, *traG*, *traK*, *traM* und *traL* nachgewiesen werden. *S. epidermidis* 58 besitzt zusätzlich die Gene für drei Relaxasen (pT181, Pre$_{psk41}$ und Nes$_{pSK41}$), S. *hominis* subsp. *hominis* 110 für zwei Relaxasen (pT181 und Nes), *S. saprophyticus* 99 nur für die Nes$_{pSK41}$-Relaxase und in *S. haemolyticus* 103 konnten keine Relaxasegene nachgewiesen werden. Weitere Transfergene wurden in den Concordia Stämmen *S. epidermidis* 55 (*traK*, pT181- und Pre$_{pSK41}$-Relaxase) und *Staphylococcus* sp. 98 (*traE*, Pre$_{pSK41}$-Relaxase) sowie den ISS

Stämmen *S. lugdunensis* 100 (*traE*, *traG*, *traM* und *traL*), 101 (*traE*, *traG*, *traK*, *traM*) und *S. haemolyticus* 109 (pT181 Relaxase, *traE*) detektiert.
In vier Stämmen konnten pIP501 ähnliche Transfergene detektiert werden. In *S. hominis* subsp. *hominis* 121 konnte *orf5* und das Gen für die Orf1-Relaxase nachgewiesen werden, in *S. epidermidis* 131 *orf10*, in *E. faecalis* 77 *orf7* und *orf10* und in *E. faecalis* 80 *orf10*.
Auffallend ist, dass die Stämme, die die meisten Transfer- und Resistenzgene besitzen, von der ISS isoliert wurden.

### 3.1.5 Zusammenfassung der erhaltenen Daten

In diesem Kapitel werden die gewonnen Daten aus der Plasmidisolierung und der PCR auf Resistenz- und Transfergene zusammengefasst und mit den in der Literatur bekannten MGEs verglichen.
In fünf Stämmen (55, 108, 109, 110 und 113) konnten die Gene für die pT181-Relaxase, *erm*C (Erythromycin) und *tet*K (Tetracyclin) nachgewiesen werden. Diese drei Gene sind auch in dem 6,9 kb großen Plasmid pSTE2 aus *S. lentus* codiert, das voraussichtlich aus pT181- und pPV141-ähnlichen Plasmiden durch Kointegratbildung entstanden ist (Hauschild *et al*., 2005). Auf dem Plasmid pT181 sind die Gene für die Relaxase und das Tetracyclin-Resistenzgen *tet*K kodiert, das Plasmid pPV141 trägt das *erm*C Gen. In vier Stämmen (55, 108, 109 und 113) konnten durch Plasmidisolierung auch Plasmide, die kleiner als 8 kb sind, isoliert werden (Abb. 3.4 und 3.5). Somit können diese Stämme mobilisierbare Plasmide enthalten. In *S. hominis* subsp. *hominis* 110 (ISS) konnte nur ein ca. 20 kb großes Plasmid detektiert werden. In den Stämmen 55, 113 (Concordia), 109 und 110 (ISS) wurden noch weitere Resistenz- und Transfergene detektiert. Stamm 110 besitzt zusätzlich noch die pSK41-ähnlichen Transfergene *traE*, *traG*, *traK*, *traM*, *traL* und das Gen für die $Nes_{pSK41}$-Relaxase. Diese Gene, wie die pT181-Relaxase und das *tetK* Resistenzgen sind auch auf dem Plasmid SAP014A (50,4 kb, GQ900379), das aus einem HA-MRSA stammt, codiert. Das Plasmid SAP014A trägt aber zusätzliche Resistenzgene wie *aac6-aph2a* (Gentamycin) und *aadD* (Kanamycin), Stamm 110 besitzt dafür die Resistenzgene *erm*C, *erm*G (Erythromycin) und $cat_{pC194}$ (Chloramphenicol). Plasmide, die Ähnlichkeiten mit pSK41 aufweisen, wie u. a. pGO1, pUSA03, pLW1043 und pV030-8, tragen mehrere Kopien des Insertionselements IS*257*, das als „*Hot Spot*“ für Integration von Resistenzgenen fungiert (McDougal *et al*., 2010; Caryl and O´Neill, 2009). Im

Plasmid pUSA03 ist neben „*high-level*“ Mupirocinresistenz *ileS2* (*isoleucyl-tRNA synthetase*) auch das Erythromycin-Resistenzgen *erm*C kodiert. Das Plasmid aus Stamm 110 könnte durch Rekombinationsereignisse mit Hilfe von Insertionselementen aus pSK41- und pT181-ähnlichen Plasmiden entstanden sein.

*S. epidermidis* 55 besitzt, außer den Genen für die pT181-Relaxase, *erm*C und *tet*K, die Gene für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase, *traK* und die Resistenzgene *tet*M und $cat_{LM}$. Das Tetracyclin-Resistenzgen *tet*M findet man sehr häufig auf Transposons der Tn*916*-Tn*1545* Familie und das Chloramphenicol-Resistenzgen $cat_{LM}$ auf kleinen *multi-copy* Plasmiden in Verbindung mit *mob* Genen (z. B. pC223; 4,6 kb). Aus Stamm 55 konnten mehrere kleine Plasmide (<10 kb) und zwei große (≥ 20 kb) isoliert werden (Abb. 3.5). Die beiden Transfergene deuten auf ein konjugatives Element hin auch wenn nur das *traK* Gen und das Gen für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase detektiert wurden. Im Kapitel 3.1.6.1 konnte der Nachweis erbracht werden, dass es sich tatsächlich im *S. epidermidis* 55 um ein konjugatives Element handelt. Das *erm*C Gen konnte übertragen werden, die pT181-Relaxase nicht. Möglicherweise befindet sich das *erm*C Gen auf einem konjugativen Element oder wurde durch dieses mobilisiert.

Im Stamm 109 konnte zusätzlich das Transfergen *traE* und in 113 die Gene für die Relaxasen $Nes_{pSK41}$ und $Pre_{pSK41}$ detektiert werden aber keine weiteren Transfergene. Vermutlich handelt es sich hier um mobilisierbare Plasmide mit Resistenzgenen, die hier nicht nachgewiesen wurden. Aus Stamm 113 konnte zusätzlich zu kleinen Plasmiden ein ca. 38 kb großes Plasmid isoliert werden. Das Plasmid pT181 kann auch integriert in großen Plasmiden (pSTS21, 82 kb; pSTS22, 31 kb) oder im Chromosom in SCC*mec* Elementen vorkommen und ist in diesen von Insertionselementen flankiert (IS*257* und IS*431*) (Hanssen and Sollid, 2006; Werckenthin *et al*., 1996). Möglicherweise enthält Stamm 113 ein pSTE2-ähnliches Plasmid oder ein großes Plasmid, indem pT181 integriert vorkommt.

Die Gene für die pT181-Relaxase und das Tetracyclin-Resistenzgen *tet*K wurden auch in den drei *S. epidermidis* Stämmen 63 (Concordia), 64 und 65 (ISS) nachgewiesen. Diese beiden Gene sind häufig auf kleinen *Staphylococcus* Plasmiden, u. a. pT181 (4,4 kb), pUSA02 (4,4 kb), das aus CA-MRSA USA300 stammt, und pSK101 (4,2 kb) zu finden, können aber auch auf Plasmiden größer als 20 kb kodiert sein, da pT181 auch über IS*257* in großen Plasmiden integriert vorkommt. Beispiele hierfür sind die Staphylokokken Plasmide pWBG753 (30 kb), und SAP103A (29,2 kb, Teilsequenz). Diese

beiden Plasmide kodieren zusätzlich Resistenzen gegen β-Laktamasen (*blaZ*) und Cadmium. Aus *S. epidermidis* 63 und 65 konnte nur ein Plasmid um die 20 kb isoliert werden, aus Stamm 64 wurden keine Plasmide isoliert. In diesen Stämmen konnte noch zusätzlich das Gen für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase nachgewiesen werden. Es kann nicht genau bestimmt werden, welche großen Plasmide in den drei *S. epidermidis* Stämmen vorkommen, da in diesem Projekt auf das Resistenzgen *blaZ* und die Cadmiumresistenz nicht getestet wurde.

In sechs ISS Stämmen (58, 99, 100, 101, 103 und 110) konnten bis zu acht Transfergene detektiert werden. *S. epidermidis* 58 besitzt die Gene für drei Relaxasen (pT181, $Nes_{pSK41}$ und $Pre_{pSK41}$) sowie die Transfergene *traE*, *traG*, *traK*, *traM* und *traL*. In diesem Stamm konnten aber keine Resistenzgene detektiert werden. *S. saprophyticus* 99 fehlen im Vergleich zu Stamm 58 nur die Gene für die pT181- und $Pre_{pSK41}$-Relaxase. Es konnten auch bei diesem Stamm keine Resistenzgene nachgewiesen werden. Bei beiden Stämmen sind im Bereich 20-40 kb Plasmide detektiert worden (Abb. 3.5). Außerdem besitzen sie auch kleinere Plasmide. Bei *S. saprophyticus* 99 und *S. epidermidis* 58 handelt es sich wahrscheinlich um pV030-8 (39 kb), pUSA03 (37,1 kb), pPR9 (47,1) und pGO400 (34 kb) ähnliche Plasmide, die aus MRSA Stämmen isoliert wurden und der pSK41/pGO1 Familie angehören (Pérez-Roth *et al*., 2010; Diep *et al*., 2006). Auf diesen Plasmiden ist die komplette pSK41/pGO1 *tra* Region kodiert, die Pre-Relaxase mit *aadD* (pUB110), *aac6-aph2a* (Tn*4001*), das Trimethoprim-Resistenz Plasmid pSK639 und ein pSK89 ähnliches Plasmid (*qacC*; vermittelt Resistenz gegenüber quaternären Ammoniumverbindungen und Ethidiumbromid) fehlen, dafür besitzen die Plasmide das von IS*257* flankierte *ileS2* Gen für die „*high level*" Mupirocinresistenz. Beide Stämme sollten auf weitere Gene, wie das *ileS2* Gen untersucht werden, um die Ähnlichkeit mit diesen Plasmiden festzustellen.

In den Stämmen *S. lungdunensis* 100 und 101 sowie *S. haemolyticus* 103 konnten keine Relaxasen nachgewiesen werden, außerdem fehlt Stamm 100 das Gen für *traK* und 101 das Gen für *traL*. Diese Stämme besitzen zusätzlich noch Resistenzgene, Stamm 100 und 101 das Chloramphenicol-Resistenzgen $cat_{pC194}$ und Stamm 103 *erm*C und *tet*K. Aus den Stämmen 100 und 101 konnten keine großen Plasmide isoliert werden, nur in Stamm 100 konnten Plasmide kleiner als 8 kb nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt; Fürch, 2010). In Stamm 103 konnten ein großes Plasmid (ca. 28 kb) und kleinere Plasmide (<10 kb) detektiert werden (Abb. 3.5). Diese Stämme enthalten

möglicherweise Plasmide aus der pSK41/pGO1 Familie, auch wenn die Plasmidisolierung nicht für alle Stämme erfolgreich war, sowie pT181 (*tet*K) und pC194 (*cat*) ähnliche Plasmide aufgrund der detektierten Resistenzgene. Die PCR auf Relaxasegene sollte in diesem Fall mit isolierter Gesamt-DNA wiederholt werden.

In fast allen *E. faecalis* Stämmen (ISS) konnten die Resistenzgene *aph3-III* (Kanamycin), *tet*M (Tetracyclin) und $cat_{pIP501}$ (Chloramphenicol) detektiert werden, *E. faecalis* 69 fehlt das *tet*M Gen. In den Stämmen 74, 75, 77, 78, 79 und 80 konnte noch zusätzlich das Erythromycin-Resistenzgen *erm*B nachgewiesen werden. In *E. faecalis* 77 wurden außerdem die Transfergene *orf7* und *orf10* detektiert, in Stamm 80 nur *orf7*. Diese Gene sind auch auf den konjugativen Pheromon-unabhängigen Plasmiden pRE25 (50,2 kb; *aph3-III*, $cat_{pIP501}$, *erm*B, *tra* Region) und pIP501 (30,6 kb; $cat_{pIP501}$, *erm*B, *tra* Region) kodiert (Abajy *et al*., 2007; Grohmann *et al.*, 2003; Schwarz *et al*., 2001). Das Tetracyclin-Resistenzgen *tet*M ist in *E. faecalis* RE25 auf dem Chromosom zu finden. Abschnitte der konjugativen Plasmide pIP501 und pRE25 könnten in den isolierten Plasmiden, die ca. 130 kb groß sind, kodiert sein (Abb. 3.3). Zhu *et al*. (2010) konnten Inc18-ähnliche (*repA* homolog, *copR* nicht) *van*A Plasmide (pWZ909, 42,6 kb; pWZ1668, 48,4 kb; pWZ7140, 47,3 kb) aus *E. faecalis* isolieren, deren 16 *orfs* zu 100% mit der konjugativen Transferregion von pIP501 übereinstimmen. Der Hauptunterschied zu pIP501 liegt am Vorhandensein des Tn*1546 van*A Transposons. Das *ermB* Resistenzgen ist in allen drei Plasmiden vorhanden. Der in dieser Arbeit verwendete *erm*B *rev* Primer beinhaltet einen *mismatch* zu der *erm*B Sequenz der Inc18 *van*A Plasmide. Mittels PCR müsste bestätig werden, ob die Primer an das *erm*B-Fragment in diesen Plasmiden binden können und das Fragment amplifiziert werden kann. In den genannten *E. faecalis* Isolaten konnte das Gen aber nachgewiesen werden. Die Resistenzgene *tet*M, *erm*B und *aph3-III* werden auch oft auf Transposons der Tn*916*-Tn*1545* Familie gefunden (Soge *et al*. 2008; Rice, 1998). Das *van*A Gen konnte in den Stämmen nicht nachgewiesen werden. Um genau herauszufinden, ob es sich um Derivate bestimmter Plasmide handelt, müssten weitere PCRs sowie Transferversuche durchgeführt werden.

In nur einem *S. capitis* subsp*. capitis* 61 Isolat (Concordia) konnte das *mec*A Gen, das für die Methicillinresistenz verantwortlich ist, neben den Genen für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase, *erm*C und $cat_{LM}$ detektiert werden. Das *mec*A Gen ist im Chromosom auf der Pathogenitäts-Insel SCC*mec* lokalisiert. Bis jetzt wurden acht Hauptgruppen (I-VIII und $V_T$) und mehrere Untergruppen der SCC*mec* Elemente beschrieben. In einigen Gruppen

sind die Plasmide pUB110 (Pre-Relaxase, *aadD*, *ble*) und pT181 (pT181-Relaxase, *tet*K) über IS*431* in das SCC*mec* integriert (David and Daum, 2010; *International Working Group* SCC, 2009). Da das Gen für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase detektiert werden konnte, könnte man in diesem Fall auf das integrierte Plasmid pUB110 schließen. Das *aadD* Resistenzgen konnte aber nicht nachgewiesen werden, auf die Bleomycinresistenz (*ble*) wurde nicht getestet. Aus *S. capitis* subsp*. capitis* 61 konnten kleinere Plasmide (<8 kb) isoliert werden, so dass die Resistenzgene *erm*C und $cat_{LM}$ auf diesen kodiert sein könnten. Vertreter dieser Plasmide sind pE194 (*erm*C; 3,7 kb) und pC223 ($cat_{LM}$; 4,6 kb). In den Stämmen 114 (*S. hominis hominis*/*novobiosepticus*), 125 und 137 (*S. hominis* subsp. *hominis*) wurde das *van*B Gen mittels Southern Hybridisierung nachgewiesen. Bis jetzt wurde über das *van*B Gen nur in Enterokokken und Streptokokken berichtet, nicht aber in Staphylokokken. In allen drei Stämmen konnten große (>20 kb) und kleine (<10 kb) Plasmide detektiert werden. Stamm 114 besitzt ein Plasmid der Größe um 28 kb, Stamm 125 um 55 kb (Abb. 3.4) und Stamm 137 um 30 kb (Daten nicht gezeigt). In den Stämmen 114 und 125 wurden noch weitere Resistenzgene detektiert, in Stamm 114 die *erm*C und *erm*D Resistenzgene und in Stamm 125 *erm*D, $cat_{pC194}$ und $cat_{LM}$. In Stamm 137 konnte zusätzlich das Gen für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase detektiert werden. Die Resistenzgene *erm*C, $cat_{pC194}$ und $cat_{LM}$ können in diesen Stämmen von kleinen *multicopy* Plasmiden kodiert sein (pE194, pC194 und pC223 ähnlich). Das Erythromycin-Resistenzgen *erm*D ist ursprünglich im Chromosom vom *B. licheniformis* und später auch in *B. anthracis* 590 detektiert worden. Wahrscheinlich wurde das Resistenzgen zwischen *Bacillus* Spezies über Transposition weitergegeben (Kim *et al*., 1993; Gryczan *et al*., 1984). In Staphylokkoken wurde das Gen bis jetzt nicht nachgewiesen.

In einigen Stämmen wurde das Gen für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase neben Resistenzgenen wie *aph3-III* (*B. firmus* 27, *S. epidermidis* 66), $cat_{pIP501}$ (*Paenibacillus* sp. 30) und *erm*C (*Paenibacillus* sp. 38, *S. epidermidis* 130) sowie *erm*D (*S. epidermidis* 130) nachgewiesen. In diesen Fällen kann keine Aussage darüber gemacht werden, um welche Plasmide es sich handelt, da die $Pre_{pSK41}$-Relaxase auf Plasmiden kodiert ist, die Resistenzgene tragen, wie z. B. *tet*L (Tetracyclin) und *dfrK* (Trimethoprim) (pKKS627; pKKS2187) oder *aadD* (Neomycin, Kanamycin) und *ble* (Bleomycin) (pUB110), auf die hier nicht getestet wurde (außer *aadD*). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Relaxase- und die Resistenzgene auf unterschiedlichen Plasmiden kodiert sind. In *B. firmus* 27, *Paenibacillus* sp. 30 und 38 konnten nur kleine (<20 kb) Plasmide nachgewiesen werden

(Timmery *et al*., 2011). Die beiden *S. epidermidis* Stämme 66 und 130 beinhalten große (ca. 20-28 kb) und kleine Plasmide (<20 kb).

### 3.1.6 Horizontale Gentransfer Studien

Basierend auf den Ergebnissen der Antibiotikaresistenz-Studien, der Plasmidisolierungen, Biofilmbildung, sowie der PCR-Untersuchungen auf Resistenz- und Transfergene wurden geeignete Stämme für bi- und triparentale Kreuzungen ausgesucht, um ihre Fähigkeit, Antibiotika-Resistenzgene weiterzugeben oder andere Plasmide zu mobilisieren, zu untersuchen. Außerdem sollten ISS und Concordia Isolate ausgesucht werden, die sich als Rezipienten für Gentransferversuche eignen, da nicht nur die Weitergabe von MGEs, sondern auch die Aufnahmefähigkeit dieser untersucht werden sollte. Die ausgewählten Stämme sind in Tabelle 3.8 aufgelistet. Die Transferraten wurden als Anzahl der Transkonjuganten pro Rezipient bestimmt.

**Tab. 3.8: Ausgewählte Stämme für Kreuzungsexperimente**

| TU-Nr. | Spezies[a] | SCK·CEN Nummerierung[b] | Genotyp[c] |
|---|---|---|---|
| 41. | *S. aureus* | R87 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 45. | *S. aureus* | T5-Air3-1 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 53. | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA37-2 | *pre*$_{pSK41}$ |
| 55. | *S. epidermidis* | T11-Air2-8 | pT181-Relaxase, *traK*, *erm*C, *tet*M, *tet*K, *cat*$_{LM}$ |
| 99. | *S. saprophyticus* (ISS) (16S) | R13 | *nes*$_{pSK41}$, *traE*, *traG*, *traK*, *traM*, *traL* |
| 103. | *S. haemolyticus* (ISS) (16S) | 5IL-2 | *traE, traG, traK, traM*, *traL, erm*C, *tet*K |
| 110. | *S. hominis* subsp. *hominis* (ISS) (16S) | 7IL-2 | *nes*$_{pSK41}$, pT181-Relaxase, *traE, traG, traK, traM*, *traL, erm*C, *erm*G, *tet*K, *cat*$_{pC194}$ |
| 113. | *S. hominis hominis/novobiosepticus* | T2-AIR5-3 | pT181-Relaxase, *nes*$_{pSK41}$, *pre*$_{pSK41}$, *erm*C, *tet*K |

[a](16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK; subsp: subspecies
[b]Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew
[c]*cat*: Chloramphenicol; *erm*: Erythromycin; *tet*: Tetracyclin

Die Stämme *S. aureus* 41 und *S. epidermidis* 53 wurden für biparentale Kreuzungen als Rezipienten eingesetzt. Zu dem Zeitpunkt war nicht bekannt, dass beide Stämme die Pre$_{pSK41}$-Relaxase besitzen. Weiterhin wurde in Stamm 53 ein großes Plasmid (ca. 38 kb) nachgewiesen (Abb. 3.5). In *S. aureus* 41 konnten keine Plasmide detektiert werden. *S. aureus* 45 wurde wegen der guten Biofilmbildung ausgewählt (Will, 2008; Prescha, 2009). *S. epidermidis* 55 wurde aufgrund von *tra*K, des Gens für die pT181-Relaxase und des Vorhandenseins eines großen Plasmids ausgewählt, da es sich bei diesem voraussichtlich um ein konjugatives Plasmid handelt. Die Stämme *S. saprophyticus* 99, *S. haemolyticus* 103 und *S. hominis* subsp. *hominis* 110 wurden aufgrund der vorhandenen

Transfergene als potentiell konjugativ eingestuft. Bei *S. hominis hominis/novobiosepticus* 113 wurde vermutet, dass es mobilisierbare Plasmide enthält, da die Gene für drei Relaxasen und keine anderen Transfergene detektiert wurden.

#### 3.1.6.1 Biparentale Kreuzungsexperimente

Mit Hilfe der biparentalen Kreuzungsexperimente sollte überprüft werden, ob die in den Isolaten detektierten Resistenzgene mittels Konjugation auf einen Rezipienten (*S. aureus* oder *E. faecalis*) übertragen werden können. Da in den meisten Isolaten die Resistenzgene *erm*C und *tet*K detektiert wurden, erfolgte die Selektion auf Agarplatten, die eine Kombination aus zwei Antibiotika enthielten, einmal für den jeweiligen Rezipienten und dann entweder Erythromycin oder Tetracyclin.

*S. epidermidis* 55 wurde auf die Fähigkeit, die Erythromycin- und Tetracyclin-Resistenzgene auf *E. faecalis* OG1X zu übertragen, mittels biparentalen Matings überprüft (Rogowski, 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass *S. epidermidis* 55 die Erythromycin-Resistenz auf *E. faecalis* OG1X mit einer Transferrate von $5{,}19\times10^{-7}$ übertragen kann und somit ein konjugatives Element besitzt. Bei der Transferrate handelt es sich um den Mittelwert von drei unabhängigen Messungen. In den Transkonjuganten wurde mittels PCR das *erm*C Gen aber nicht das Gen für die pT181-Relaxase nachgewiesen. Das bedeutet, dass die beiden Gene nicht auf einem Plasmid liegen. Möglicherweise befindet sich das *erm*C Gen auf einem konjugativen Element oder wurde durch dieses mobilisiert. Die Tetracyclin-Resistenz konnte mittels biparentalen Matings nicht übertragen werden. Voraussichtlich sind die Gene für die pT181-Relaxase und die Tetracyclinresistenz *tet*K auf einem Plasmid kodiert, das durch das konjugative Element nicht mobilisierbar ist. Das Tetracyclin-Resistenzgen *tet*M ist auf konjugativen Transposons der Tn*916*/Tn*1545* Familie zu finden. Wahrscheinlich waren die gegebenen Bedingungen nicht optimal für einen Gentransfer. Der konjugative Transfer von Tn*916*/Tn*1545* wird erheblich gesteigert, wenn der Donor im Medium mit Tetracyclin kultiviert wurde (Rice, 1998).

Ein zweites biparentales Mating wurde mit den Stämmen *S. haemolyticus* 103 als Donor und *E. faecalis* OG1X als Rezipient durchgeführt. Die Erythromycin-Resistenz konnte mit einer Transferrate von $3{,}4\times10^{-7}$ auf *E. faecalis* OG1X übertragen werden. Es handelt sich hier um den Mittelwert von zwei unabhängigen Versuchen. In den Transkonjuganten konnte das *erm*C Gen mit Hilfe von PCR nachgewiesen werden.

Im dritten Mating wurden *S. hominis* subsp. *hominis* 110 (Donor) und *E. faecalis* OG1X (Rezipient) eingesetzt. Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte durch das Wachstum auf Antibiotikaplatten mit Streptomycin für den Rezipienten und Erythromycin für das mobile genetische Element. In den Transkonjuganten konnte die pT181-Relaxase nachgewiesen werden aber nicht die Erythromycin-Resistenzgene *erm*C und *erm*G. Die Transferrate betrug $1{,}1\times10^{-7}$. In dem Fall ist das Gen für die pT181-Relaxase wahrscheinlich nicht mit *erm*C auf einem mobilen Element kodiert. Da die Erythromycin-Resistenzgene *erm*C und *erm*G nicht nachgewiesen werden konnten, handelt es sich hier wahrscheinlich um andere Erythromycin-Resistenzdeterminanten, die auf die Transkonjuganten übertragen wurden. Beispiele hierfür wären die Gene für die rRNA Methylasen *erm*A und *erm*33 sowie die Effluxgene *msr*A und *vga*A, die Resistenz gegenüber Erythromycin in *Staphylococcus* Spezies vermitteln.

In einem weiteren Versuch sollte der konjugative Transfer von pSK41 und pGO1 in die beiden Stämme *S. aureus* 41 (ISS) und *S. epidermidis* 53 (Concordia) untersucht und deren Fähigkeit zur Plasmidaufnahme ermittelt werden. Die Multiresistenz Plasmide pSK41 und pGO1 wurden aus klinischen *S. aureus* Stämmen isoliert, sie sind zum Selbsttransfer befähigt und können andere Plasmide mobilisieren (Berg *et al*., 1998). In diesem Fall wurde die Transferrate pro Donor ermittelt. Das Plasmid pGO1 konnte in den Rezipientenstamm *S. aureus* 41 mit einer Transferrate von $1{,}2\times10^{-6}$ übertragen werden. Die Transferrate von pGO1 in *S. epidermidis* 53 betrug $8{,}9\times10^{-7}$. Für die Übertragung von pSK41 in *S. aureus* 41 wurde die Transferrate von $8{,}6\times10^{-8}$ ermittelt. Die Übertragung von pSK41 in *S. epidermidis* 53 erfolgte mit einer Transferrate von $1{,}4\times10^{-7}$. Das Transfergen *traK* konnte in allen getesteten Transkonjuganten nachgewiesen werden. Die Rezipientenstämme 41 und 53 sind *traK* negativ (Prescha, 2009). Der konjugative Transfer von Plasmiden der pSK41 Familie erfolgt mit einer Transferrate von $10^{-5}$-$10^{-7}$ Transkonjuganten pro Donorzelle innerhalb der Spezies *S. aureus* und innerhalb *S. epidermidis* sowie zwischen diesen beiden Spezies (Firth and Skurray, 2006; Archer *et al*., 1986, Archer and Johnston, 1983). Die hier ermittelten Werte liegen in diesem Bereich. Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die *Staphylococcus* Isolate fähig sind konjugative Elemente aufzunehmen, auch wenn in einem Isolat bereits ein großes Plasmid vorhanden ist. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesem Plasmid nicht um ein pSK41-ähnliches Plasmid handelt, da in diesem Stamm keine pSK41 ähnlichen Transfergene detektiert werden konnten.

### 3.1.6.2 Triparentale Kreuzungsexperimente

Um konjugative Plasmide in den ISS und Concordia Isolaten nachweisen zu können, wurde von Dr. Karsten Arends im Rahmen seiner Doktorarbeit GFP-markierte, mobilisierbare Plasmide, pMSP-*orf1*-GFP und pMSP-*orf1*-P$_{nisA}$-GFP, konstruiert. Diese Plasmide beinhalten das pIP501 *orf1* Gen, das für die *oriT*$_{pIP501}$ sequenzspezifische Relaxase codiert, den Transferursprung (*oriT*$_{pIP501}$) und das *gfp* Gen. Im Plasmid pMSP-*orf1*-GFP ist den Genen *orf1* und *gfp* ein mit Nisin induzierbarer Promotor (P*nisA*) vorgeschaltet. Das GFP wurde zu schwach exprimiert, so dass ein weiteres Plasmid konstruiert wurde. Bei dem Plasmid pMSP-*orf1*-P$_{nisA}$-GFP stehen beide Gene, *orf1* und *gfp*, jeweils unter der Kontrolle eines eigenen *nisA* Promotors. Das mobilisierbare Plasmid kann von seinem ursprünglichen Wirt (Donor II) in Gegenwart eines konjugativen Plasmids in einem Donor I, z.B. einem MISSEX oder COMICS-Isolat, in einen Rezipienten übertragen werden.

Im ersten Versuch wurde *S. aureus* 45 als Donor I, *E. faecalis* OG1X pMSP-*orf1*-GFP als Donor II und als Rezipient *E. faecalis* JH2-2 verwendet. Es konnte eine Mobilisierungsrate von $3{,}3\times10^{-8}$ ermittelt werden. *S. aureus* 45 beinhaltet somit konjugative Elemente, die nicht pSK41- und pIP501 ähnlich sind (Prescha, 2009).

Ein weiteres triparentales Kreuzungsexperiment wurde mit dem Stamm *S. saprophyticus* 99 als Donor I, *E. faecalis* OG1X mit dem mobilisierbaren Plasmid pMSP-*orf1*-P$_{nisA}$-GFP als Donor II und dem Rezipienten *E. faecalis* JH2-2 durchgeführt. Die Mobilisierungsrate betrug $3{,}3\times10^{-8}$. Das mobilisierbare Plasmid pMSP-*orf1*-P$_{nisA}$-GFP konnte mittels GFP-Induktion und PCR auf das *gfp* Gen in den Transkonjuganten nachgewiesen werden (Fürch, 2010).

Im dritten triparentalen Mating wurden die Stämme *S. aureus* SK5428 (pSK41) als Donor I, *S. hominis hominis/novobiosepticus* 113 als Donor II und *S. aureus* RN4220RF als Rezipient verwendet. *S. hominis hominis/novobiosepticus* 113 wurde als Donor II ausgewählt, da dieser Stamm wahrscheinlich mobilisierbare Plasmide enthält. Es konnten die Gene für drei Relaxasen (pT181-Relaxase, Pre$_{pSK41}$ und Nes$_{pSK41}$) und die Resistenzgene *erm*C und *tet*K detektiert werden. Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte auf Agarplatten, die das Antibiotikum für den Rezipienten (Rifampicin) und das Tetracyclin für das wahrscheinlich mobilisierbare Plasmid (pT181-ähnlich) enthielten. In den Transkonjuganten konnte das *tet*K Gen und die pT181-Relaxase, die auch auf dem pT181 Plasmid kodiert sind, nachgewiesen werden. In diesem Fall könnte es sich um ein

pT181-ähnliches mobilisierbares Plasmid handeln, das mit einer Mobilisierungsrate von $4{,}7\times10^{-7}$ übertragen werden konnte. Es handelt sich hier um den Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen. Die Selektion der Transkonjuganten mittels Erythromycin-Resistenz war nicht erfolgreich. Es könnte sich um ein nicht mobilisierbares Plasmid handeln.

## 3.2 Biofilme

Nahezu 99% der Mikroorganismen auf der Erde leben in mikrobiellen Lebensgemeinschaften, bekannt als Biofilme. Biofilme entstehen durch Adhäsion der Zellen an Grenzflächen und sind als komplexe Verbände von extrazellulären polymeren Substanzen, der EPS umgeben. Diese EPS ist für die Bildung und Struktur des Biofilms wichtig, da es die Mikroorganismen vor Umwelteinflüssen wie z. B. Austrocknung, Nährstofflimitierung, UV Einstrahlung und erhöhter Temperatur schützt und den Eintritt von antimikrobiellen Substanzen und Xenobiotika verhindert. Biofilme stellen die weitaus überwiegende Lebensweise der Mikroorganismen dar und kommen in Böden, Sedimenten, Pflanzen, extremen Lebensräumen wie der Antarktis, heißen Quellen sowie technischen Bereichen wie Kühlkreisläufen in Kraftwerken und sogar hochbestrahlten Bereichen von Kernkraftwerken vor (de Carvalho, 2007). Im medizinischen Bereich verursachen Biofilme, die u. a. in Kathetern, Implantaten und Dialyseschläuchen vorkommen, schwere chronische Infektionen, da Mikroorganismen in Biofilmen eine 10-1000mal höhere Antibiotikaresistenz aufweisen können, als die Mikroorganismen in der planktonischen Phase und weniger anfällig für die humane Immunabwehr sind (López *et al*., 2010; Donlan, 2008; Bryers, 2008; Jefferson, 2004).
Da die überwiegende Zahl von Bakterien in Oberflächen-assoziierten Gemeinschaften, den Biofilmen vorkommt, sollen natürliche Bedingungen nachgestellt werden und die Biofilmbildung der bakteriellen ISS oder Concordia Isolate sowie der Gentransfer dieser Isolate in Biofilmen untersucht werden.

### 3.2.1 Biofilm-Screening

Um gute Biofilmbildner für die Biofilmexperimente in up-flow Biofilmreaktoren zu finden, wurde ein Standard-Biofilm-Screening in Mikrotiterplatten (MT) durchgeführt (2.2.1.8) (Klingenberg *et al*., 2005; Christensen *et al*., 1985). Mit dieser Methode kann die

Fähigkeit der Bakterien sich anzuheften und Biofilme auszubilden, eingeschätzt werden. Dabei kann das Kristallviolett an negativ geladene Oberflächenproteine, Polysaccharide sowie Nukleinsäuren binden (Li *et al*., 2007).

Die Stämme wurden nach dem Kriterium ausgewählt, ob sie als mögliche Donoren von konjugativen oder mobilisierbaren Elementen oder als Rezipienten in Gentransferversuchen im Biofilmreaktor eingesetzt werden könnten. Die Inkubation der MT-Platten mit den Kulturen erfolgte bei Raumtemperatur, da die Biofilmreaktoren bei dieser Temperatur betrieben wurden.

Als Positivkontrolle (PK) für den MT-Test wurde bei den *Bacillus* Stämmen zunächst *Sinorhizobium* 30A verwendet, da dieser Stamm im up-flow Biofilmreaktor bei Wicke *et al*. (2007) die höchste Biofilmbildung gezeigt hatte. Nach der ersten erfolgreichen Biofilmbildung im Biofilmreaktor wurden dann die Concordia Stämme *B. cereus s.l.* 1, *S. aureus* 45, *S. epidermidis* 55 und *S. aureus* 67 als Positivkontrollen verwendet. Als Negativkontrolle (NK) diente das jeweilige Medium, das nicht mit Bakterien inokuliert wurde. Rot markiert sind die Stämme, die im Biofilmreaktor auf Biofilmbildung getestet wurden. Die *Bacillus* Stämme wurden auf Biofilmbildung in TSB und BHI Medium, und die *Staphylococcus* sowie *Enterococcus* Stämme in BHI und THB Medium getestet.

**Tab. 3.9: Biofilm-Screening der Stämme 1-40**
Daten aus der Diplomarbeit von Frau Dipl.-Biol. Sandra Hahn. PK1 und PK2: *Sinorhizobium* 30A

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **TSB** | **1** | **4** | **5** | **6** | **12** | **13** | **14** | **17** | **23** | **24** | **25** | **27** | **PK1** |
| | **0,477** | 0,233 | **0,903** | 0,148 | **0,711** | 0,223 | 1,189 | 0,112 | 0,159 | **0,160** | 0,208 | 0,247 | 0,246 |
| | **29** | **30** | **31** | **32** | **33** | **34** | **36** | **37** | **38** | **39** | **40** | **PK2** | **NK** |
| | 0,149 | 0,217 | 0,578 | 0,229 | **1,555** | 1,032 | 0,288 | 0,950 | 0,516 | 0,346 | 0,427 | 0,293 | 0,116 |
| **BHI** | **1** | **4** | **5** | **6** | **12** | **13** | **14** | **17** | **23** | **24** | **25** | **27** | **PK1** |
| | 0,439 | 0,091 | 0,316 | 0,087 | 0,221 | 0,149 | 0,238 | 0,251 | 0,147 | 0,170 | 0,096 | 0,162 | 0,154 |
| | **29** | **30** | **31** | **32** | **33** | **34** | **36** | **37** | **38** | **39** | **40** | **PK2** | **NK** |
| | 0,124 | 0,186 | 0,293 | 0,166 | 0,646 | 0,376 | 0,181 | 0,355 | 0,403 | 0,234 | 0,303 | 0,311 | 0,113 |

Die Stämme *B. cereus sensu lato (s.l.)* 1, 5, 12 und 33 wurden als geeignete Kandidaten für den Biofilmreaktor ausgewählt, da in allen Stämmen große Plasmide detektiert worden waren und diese sich als Donoren im Gentransfer-Versuch eignen könnten. Die Stämme 1 und 12 konnten in triparentalen Matings Plasmide (pUB110 und pBC16) mobilisieren und enthalten somit konjugative Elemente (Timmery, 2007). In *B. cereus s.l* 33 konnte zusätzlich noch das $cat_{pC194}$ Resistenzgen detektiert werden. *B. psychrodurans* 24 wurde für den Biofilmreaktor ausgewählt, da dieser Stamm keine Plasmide sowie Transfergene besitzt. Dieser Stamm könnte in zukünftigem Gentransfer-Versuch als möglicher Rezipient dienen.

**Tab. 3.10: Biofilm-Screening der Stämme 41-60 mit Glukose-Zusatz (1%)**
Daten aus der Bachelorarbeit von Frau B. Sc. Anja Will, 2008.

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **THB** | **41** | **42** | **45** | **46** | **47** | **48** | **49** | **50** | **52** |
| | 0,180 | 0,191 | 0,126 | 0,105 | 0,102 | 0,173 | 0,227 | 0,100 | **0,456** |
| | **53** | **54** | **55** | **56** | **57** | **58** | **60** | **NK** | |
| | 0,163 | 0,248 | 0,114 | 0,094 | 0,115 | 0,149 | 0,189 | 0,094 | |
| **BHI** | **41** | **42** | **45** | **46** | **47** | **48** | **49** | **50** | **52** |
| | 0,147 | 0,148 | **0,249** | 0,109 | 0,117 | 0,194 | 0,273 | 0,110 | 0,225 |
| | **53** | **54** | **55** | **56** | **57** | **58** | **60** | **NK** | |
| | 0,181 | 0,177 | 0,167 | 0,113 | 0,174 | 0,176 | 0,111 | 0,096 | |

**Tab. 3.11: Biofilm-Screening der Stämme 41-60 ohne Glukose-Zusatz**
Daten aus der Bachelorarbeit von Frau B. Sc. Anja Will, 2008.

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **THB** | **41** | **42** | **45** | **46** | **47** | **48** | **49** | **50** | **52** |
| | 0,125 | 0,098 | 0,128 | 0,101 | 0,097 | 0,185 | 0,280 | 0,099 | 0,204 |
| | **53** | **54** | **55** | **56** | **57** | **58** | **60** | **NK** | |
| | 0,144 | 0,210 | 0,170 | 0,115 | 0,215 | 0,196 | 0,268 | 0,097 | |
| **BHI** | **41** | **42** | **45** | **46** | **47** | **48** | **49** | **50** | **52** |
| | 0,122 | 0,105 | **0,205** | 0,155 | 0,126 | 0,162 | 0,273 | 0,123 | 0,146 |
| | **53** | **54** | **55** | **56** | **57** | **58** | **60** | **NK** | |
| | 0,123 | 0,231 | **0,264** | 0,129 | 0,157 | **0,341** | 0,162 | 0,091 | |

Das Biofilm-Screening der Stämme 41 bis 60 erfolgte mit und ohne Glukose-Zusatz. Dem Medium in den MT-Platten wurde zusätzlich noch 1% Glukose zugesetzt, so dass eine Glukose-Gesamtkonzentration von 1,2% erreicht wurde, da die Medien BHI und THB jeweils 0,2% Glukose schon enthalten. Es sollte herausgefunden werden, ob Glukose-Zusatz die Biofilmbildung in den Isolaten steigert, da in einigen Studien Glukose einen Einfluss auf die Biofilmbildung hatte (Eftekhar and Speert, 2009; Mohamed and Huang, 2007; Stepanovic *et al.*, 2000). *S. aureus* 45 sowie *S. epidermidis* 55 und 58 wurden trotz der niedrigen Werte für den Biofilmreaktor ausgewählt, da diese Stämme als mögliche Donoren im Gentransfer-Versuch dienen sollten. Es konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* 45 ein konjugatives Element besitzt (Prescha, 2009; 3.1.6.2). In *S. epidermidis* 55 wurden die Gene für die pT181-Relaxase, *traK* und vier Resistenzgene (*erm*C, *tet*M, *tet*K, $cat_{LM}$) detektiert. Das *erm*C Resistenzgen konnte in biparentalen Matings (3.1.6.1) auf *E. faecalis* OG1X übertragen werden. *S. epidermidis* 58 besitzt sieben Transfergene aber keine Resistenzgene (Tab. 3.4). In beiden Stämmen konnten zusätzlich noch große Plasmide detektiert werden (Abb. 3.5).

**Tab. 3.12: Biofilm-Screening der Stämme 61-80**
PK: *B. cereus s.l.* 1

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BHI** | **61** | **62** | **64** | **65** | **66** | **67** | **68** | **69** | **70** | **71** | **PK** |
| | 0,095 | 0,060 | 1,324 | 0,186 | 0,156 | **0,370** | 0,184 | 0,072 | 0,053 | 0,128 | 0,215 |
| | **72** | **73** | **74** | **75** | **76** | **77** | **78** | **79** | **80** | | **NK** |
| | 0,129 | 0,270 | 0,167 | **0,302** | 0,498 | **0,258** | 0,169 | 0,079 | 0,038 | | 0,079 |
| **THB** | **61** | **62** | **64** | **65** | **66** | **67** | **68** | **69** | **70** | **71** | **PK** |
| | 0,095 | 0,102 | 1,623 | 0,344 | 0,218 | **0,748** | 0,311 | 0,073 | 0,145 | 0,162 | 0,497 |
| | **72** | **73** | **74** | **75** | **76** | **77** | **78** | **79** | **80** | | **NK** |
| | 0,198 | 0,478 | 0,256 | **0,592** | 0,712 | **0,449** | 0,292 | 0,072 | 0,116 | | 0,105 |

*S. aureus* 67 wurde für den Biofilmreaktor ausgewählt, da dieser große Plasmide beinhaltet, die konjugativ sein können (Abb. 3.1). Die *E. faecalis Stämme* 75 und 77 wurden aufgrund der vorhandenen Resistenzgene (Tab. 3.4) und dem Vorhandensein großer Plasmide (Abb. 3.2) ausgesucht. In Stamm 77 wurden zusätzlich die pIP501 Transfergene *orf7* und *orf10* detektiert. Diese Stämme könnten in zukünftigen Experimenten als mögliche Donoren von konjugativen Elementen dienen.

**Tab. 3.13: Biofilm-Screening der Stämme 81-110**
Daten aus der Diplomarbeit von Frau Dipl.-Ing. Svea Fürch. PK1: *B. cereus s.l.* 1; PK45: *S. aureus* 45; PK67: *S. aureus* 67

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BHI** | **81** | **82** | **83** | **85** | **86** | **87** | **88** | **89** | **90** | **91** | **NK** | **PK1** |
| | 0,117 | 0,172 | 0,142 | **0,164** | 0,129 | 0,149 | 0,968 | 0,133 | 0,146 | 0,191 | 0,127 | 0,252 |
| | **92** | **93** | **94** | **95** | **96** | **97** | **98** | **99** | **100** | **101** | **103** | **PK45** |
| | 0,139 | 0,632 | 0,158 | 0,280 | 0,132 | 0,193 | 0,830 | **0,458** | 0,355 | 0,179 | 0,209 | 0,490 |
| | **104** | **105** | **106** | **108** | **109** | **110** | | | | | | **PK67** |
| | 0,902 | 0,520 | **0,702** | 0,115 | 0,141 | **0,164** | | | | | | 0,377 |
| **THB** | **81** | **82** | **83** | **85** | **86** | **87** | **88** | **89** | **90** | **91** | **NK** | **PK1** |
| | 0,117 | 0,118 | 0,117 | 0,128 | 0,139 | 0,130 | 0,718 | 0,440 | 0,136 | 0,161 | 0,130 | 0,151 |
| | **92** | **93** | **94** | **95** | **96** | **97** | **98** | **99** | **100** | **101** | **103** | **PK45** |
| | 0,124 | 0,730 | 0,126 | 0,371 | 0,147 | 0,154 | 1,152 | 0,507 | 0,306 | 0,150 | 0,139 | 0,220 |
| | **104** | **105** | **106** | **108** | **109** | **110** | | | | | | **PK67** |
| | 0,587 | 0,702 | 0,480 | 0,094 | 0,173 | 0,171 | | | | | | 0,368 |

Die Stämme *S. saprophyticus* 99 (*traE*, *traG*, *traK*, *traM*, *traL*, Gen für $Nes_{pSK41}$-Relaxase) und *S. hominis* subsp. *hominis* 110 (Gene für pT181-, $Nes_{pSK41}$-Relaxase, *traE*, *traG*, *traK*, *traM*, *traL*, *ermC*, *ermG*, *tetK*, $cat_{pC194}$) wurden als mögliche Donoren aufgrund der detektierten Transfergene für den Biofilmreaktor ausgewählt. In Kreuzungsexperimenten (3.1.6.1 und 3.1.6.2) konnte nachgewiesen werden, dass beide Stämme ein konjugatives Element besitzen. *S. hominis hominis/novobiosepticus* 85 (pT181-Relaxase, *erm*C, *tet*K) wurde als Donor eines potentiellen mobilisierbaren Elements und *S. haemolyticus* 106 (*aph3-III*, *erm*C) als möglicher Rezipient ausgewählt, da aus diesem Stamm keine Plasmide isoliert werden konnten (Daten nicht gezeigt, Fürch, 2010).

**Tab. 3.14: Biofilm-Screening der Stämme 111-130**
PK1: *B. cereus s.l.* 1; PK45: *S. aureus* 45; PK67: *S. aureus* 67

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BHI** | **111** | **112** | **113** | **114** | **115** | **116** | **117** | **118** | **119** | **120** | **NK** | **PK1** |
| | 0,256 | 0,178 | 0,191 | 0,192 | 0,141 | 0,154 | 0,349 | 1,488 | 0,266 | 0,127 | 0,114 | 0,430 |
| | **121** | **122** | **123** | **124** | **125** | **126** | **127** | **128** | **130** | | **PK67** | **PK45** |
| | **0,196** | 0,174 | 0,173 | **0,144** | 0,134 | 0,120 | **0,217** | 0,131 | **0,357** | | 0,237 | 0,269 |
| **THB** | **111** | **112** | **113** | **114** | **115** | **116** | **117** | **118** | **119** | **120** | **NK** | **PK1** |
| | 0,231 | 0,127 | 0,181 | 0,197 | 0,143 | 0,165 | 0,363 | 0,643 | 0,346 | 0,154 | 0,123 | 0,214 |
| | **121** | **122** | **123** | **124** | **125** | **126** | **127** | **128** | **130** | | **PK67** | **PK45** |
| | 0,165 | 0,159 | 0,788 | 0,243 | 0,182 | 0,142 | 0,428 | 0,173 | 0,849 | | 0,154 | 0,966 |

**Tab. 3.15: Biofilm-Screening der Stämme 131-137**
PK1*: B. cereus s.l.* 1; PK45: *S. aureus* 45; PK67: *S. aureus* 67

| | **131** | **132** | **133** | **134** | **135** | **136** | **137** | **NC** | **PK1** | **PK45** | **PK67** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BHI** | 1,053 | 0,362 | 0,278 | 0,201 | 0,198 | 0,754 | **0,189** | 0,133 | 0,485 | 0,733 | 0,623 |
| **THB** | 1,089 | 0,366 | 0,157 | 0,215 | 0,202 | 0,926 | 0,156 | 0,130 | 0,263 | 0,560 | 0,325 |

In *S. hominis* subsp. *hominis* 121 konnte *orf5*$_{pIP501}$ und das Gen für die Orf1$_{pIP501}$-Relaxase detektiert werden, so dass dieser Stamm im Biofilmreaktor als möglicher Donor eines konjugativen Elements für Gentransferversuche getestet wurde. *S. epidermidis* 124 besitzt drei Resistenzgene sowie die Nes-Relaxase, so dass dieser Stamm sich als Donor eines mobilisierbaren Elements eignen würde. In *S. epidermidis* 127 konnten die Gene für zwei Relaxasen detektiert werden (Pre und Nes) sowie große Plasmide, die ca. 55 kb groß sind (Abb. 3.4). Aufgrund der großen Plasmide, die möglicherweise konjugativ sind, ist dieser Stamm ein potentieller Donor für Gentransferversuche. *S. epidermidis* 130 wurde aufgrund von Pre$_{pSK41}$-Relaxase, *erm*C und *erm*D, kleineren Plasmiden (<20 kb) sowie eines großen Plasmids (ca. 30 kb; Abb. 3.4-3.5) als potentieller Donor eines mobilisierbaren oder konjugativen Elements ausgewählt, auch wenn keine weiteren pSK41-ähnlichen Transfergene detektiert werden konnten. Der Stamm *S. hominis* subsp. *hominis* 137 wurde aufgrund des *van*B Gens, des Gens für die Pre$_{pSK41}$-Relaxase und eines großen Plasmids (ca. 28 kb; Daten nicht gezeigt) für den Biofilmreaktor als potenzieller Donor ausgewählt.

## 3.2.2 Monospezies Biofilmreaktoren

Nach einem zuvor durchgeführten Screening auf Biofilmbildner wurden geeignete *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Enterococcus* Stämme für die Biofilmreaktoren ausgewählt. Diese Stämme sind in Tab. 3.16 nochmals zusammengefasst. Blau markiert sind die Stämme, die Biofilm im Biofilmreaktor ausbilden konnten. Die Durchführung erfolgte nach 2.2.1.9.

**Tab. 3.16: Ausgewählte Stämme für den Biofilmreaktor**

| TU-Nr. | Stamm[a] | SCK CEN Nummerierung[b] | Genotyp[c] | Plasmide[d] groß [>20kb] | klein [<20kb] |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | *B. cereus s.l.* (16S) | T0-Air6-1 | n. d. | 1 | 2 |
| 5. | *B. cereus s.l.* (16S) | T0-Air8-1 | n. d. | 4 | 1 |
| 12. | *B. cereus s.l.* (16S) | T0B-C6-HA37-1 | n. d. | 1 | 2 |
| 24. | *B. psychrodurans* (16S) | T4-Air1-6 | n. d. | 0 | 0 |
| 33. | *B. cereus s.l.* (16S) | T6-Air5-1 | $cat_{pC194}$ | 1 | 2 |
| 45. | *S. aureus* | T5-Air3-1 | n. d. | 1 | 0 |
| 52. | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA28-3 | pT181-Relaxase | 0 | 4 |
| 55. | *S. epidermidis* | T11-Air2-8 | pT181-Relaxase, *traK*, *erm*C, *tet*M, *tet*K, $cat_{LM}$ | 3 | 7 |
| 58. | *S. epidermidis* (ISS) (16S) | R12 | pT181-Relaxase, $nes_{pSK41}$,$pre_{pSK41}$, *traE*, *traG*, *traK*, *traM*, *traL* | 4 | 8 |
| 67. | *S. aureus* | T0-C2-HA28-5 | $pre_{pSK41}$ | 3 | 7 |
| 75. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso3 | $pre_{pSK41}$, *aph3-III*, *erm*B, *erm*D, *tet*M, $cat_{pIP501}$ | 1 | 0 |
| 77. | *E. faecalis* (ISS) | Plate10 iso5 | $pre_{pSK41}$, *orf7*, *orf10*, *aph3-III*, *erm*B, *erm*D, *tet*M, $cat_{pIP501}$ | 1 | 0 |
| 85. | *S. hominis hominis/ novobiosepticus* | T3-Air3-4 | pT181-Relaxase, *erm*C, *tet*K | 0 | 1 |
| 99. | *S. saprophyticus* (ISS) (16S) | R13 | *traE*, *traG*, *traK*, *traM*, *traL*, $nes_{pSK41}$ | 4 | 4 |
| 106. | *S. haemolyticus* (ISS) (16S) | T0B-C2-HA37-3 | *aph3-III*, *ermC* | 0 | 0 |
| 110. | *S. hominis* subsp. *hominis* (ISS) (16S) | 7IL-2 | $nes_{pSK41}$, pT181-Relaxase, *traE, traG, traK, traM*, *traL*, *erm*C, *erm*G, *tet*K, $cat_{pC194}$ | 1 | 0 |
| 121. | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T9-Air2-4 | $orf5_{pIP501}$, $orf1_{pIP501}$ | 3 | 7 |
| 124. | *S. epidermidis* (16S) | T11-Air4-3 | $nes_{pSK41}$, *erm*D, $cat_{pC194}$, *aac6-aph2a* | 5 | 1 |
| 127. | *S. epidermidis* | T0-C1-HA28-3 | $pre_{pSK41,}$ $nes_{pSK41}$ | 2 | 2 |
| 130. | *S. epidermidis* (16S) | T0-C6-HA28-3 | $pre_{pSK41}$, *erm*C, *erm*D | 1 | 5 |
| 137. | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T0B-C4-HA37-4 | $pre_{pSK41}$, *van*B | 2 | 0 |

[a](16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK
[b]Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Plate: Isolate einer bestimmten Agarplatte
[c]*aph3-III*: Kanamycin; *cat*: Chloramphenicol; *erm*: Erythromycin; *tet*: Tetracyclin; *van*: Vancomycin; n.d: nicht detektiert
[d]Die Zahl korrespondiert mit der Anzahl der Banden auf dem Gelbild

### 3.2.2.1 Biofilmreaktoren mit *Bacillus* Stämmen

Für die Analyse der Biofilmbildung wurden *Bacillus* Stämme mit großen Plasmiden (50-128 kb) ausgewählt (Timmery *et al*., 2011). Im ersten Reaktorlauf wurden die *B. cereus s.l.* Stämme 5 und 12 untersucht. Im Biofilmreaktor wurde für beide Stämme TSB als Nährmedium verwendet, da dieses Medium für die Aufzucht von *Bacillus* Spezies gut geeignet ist (MacFaddin, 1985). Bei beiden Stämmen war nach 10 Tagen eine Ansammlung von Bakterienaggregaten, die nicht an den Glaskugeln anhafteten, festzustellen. Für die Untersuchung von *B. cereus s.l* 33 diente ebenfalls TSB als Wachstumsmedium. Nach 10 Tagen zeigte sich auch bei diesem keine Biofilmbildung.

*B. cereus s.l* 5 zeigte im ersten Reaktorlauf mit Glaskugeln keine Bildung eines Biofilms, so dass dieser Stamm einem erneuten Test mit granuliertem Polystyrol (Durchmesser ~2 mm) als Aufwuchsmaterial unterzogen wurde. Die Multiwell-Mikrotiterplatten, in denen das Biofilm-Screening durchgeführt wurde, bestehen aus dem Kunststoff Polystyrol. In diesem Versuch wurde BHI als Nährmedium verwendet, da im ersten Reaktorlauf mit TSB-Medium keine Biofilmbildung verzeichnet werden konnte. Nach Ablauf der 10tägigen Laufzeit war auch in diesen Reaktoren keine Biofilmbildung festzustellen.

*B. cereus s.l* 1 wurde im Biofilmreaktor unter Verwendung von TSB-Medium auf Biofilmbildung getestet. Im Biofilmreaktor zeigte dieser Stamm eine sich schneller entwickelnde und stärkere Trübung als die Bakterienstämme 5, 12 und 33 in den vorangegangenen Versuchen. Nach ca. 7 Tagen konnte die Ausbildung eines Biofilms beobachtet werden. Dieser Stamm wurde auch in Zwei- und Multispezies Biofilmreaktoren eingesetzt (3.2.3 und 3.2.4).

Im Biofilmreaktor mit *B. psychrodurans* 24 war eine Ansammlung von Bakterienaggregaten zu sehen, bei der Entnahme von Proben aus dem Reaktor konnte eine schleimige Konsistenz festgestellt werden. Dieser Stamm wurde auch in einem Multispezies Biofilmreaktor eingesetzt.

#### 3.2.2.2 Biofilmreaktoren mit *Staphylococcus* Stämmen

Der erste Reaktorlauf erfolgte mit Stamm 58 (*S. epidermidis,* ISS), da in diesen sieben Transfergene detektiert worden waren. Als Medium diente BHI. Dieser Stamm zeigte nach dem 10tägigen Reaktorlauf kein Biofilmwachstum.

Der zweite Versuchslauf erfolgte mit dem Stamm *S. aureus* 45 (Concordia), da dieser ein konjugatives Element beinhaltet. Als Medium wurde BHI, diesmal aber mit Glukosezusatz (1%) verwendet, da der $OD_{570}$-Wert des Biofilm-Screenings geringfügig höher (0,245) lag als der Wert ohne Glukose-Zusatz (0,205). *S. aureus* 45 konnte nach 8 Tagen einen dichten Biofilm ausbilden und wurde im Zwei- und Multispezies Biofilmreaktoren eingesetzt (3.2.3 und 3.2.4).

Ein weiterer Reaktorlauf erfolgte mit *S. aureus* 67 (Concordia), da in diesem Stamm große Plasmide detektiert worden waren. Als Medium wurde BHI verwendet. Dieser Stamm zeigte schon nach vier Tagen Reaktorlauf Biofilmbildung (Abb. 3.7 B). Der

Reaktor lief für insgesamt 10 Tage. Dieser Stamm diente auch als Biofilmbildner im Multispezies Biofilmreaktor (3.2.4).

In weiteren Biofilmreaktoren wurden *S. epidermidis* 55 (Concordia), *S. saprophyticus* 99 (ISS), *S. hominis* subsp. *hominis* 110 (ISS) und 137 (Concordia) auf Biofilmbildung untersucht. In den beiden Stämmen 99 und 110 konnten Transfergene detektiert (Tab. 3.16) und in Kreuzungsexperimenten der Nachweis erbracht werden, dass diese Stämme konjugative Elemente besitzen (3.1.6.1 und 3.1.6.2). *S. epidermidis* 55 konnte im biparentalen Mating das Erythromycin-Resistenzgen *erm*C auf *E. faecalis* OG1X übertragen (3.1.6.1). In *S. hominis* subsp. *hominis* 137 konnten das *vanB* Gen sowie ein ca. 28 kb großes Plasmid detektiert werden. Nach vier Tagen konnte beim Stamm 55 eine Biofilmbildung beobachtet werden (Abb. 3.7 A). Bei den Stämmen 99 und 110 (Abb. 3.7 C) wurde nach sieben Tagen und beim Stamm 137 nach acht Tagen Biofilmbildung beobachtet. Der Biofilm der Stämme 99, 110 und 137 war im Gegensatz zu den Biofilmen der Stämm 55 und 67 nicht so stark ausgebildet. Als Medium wurde BHI verwendet.

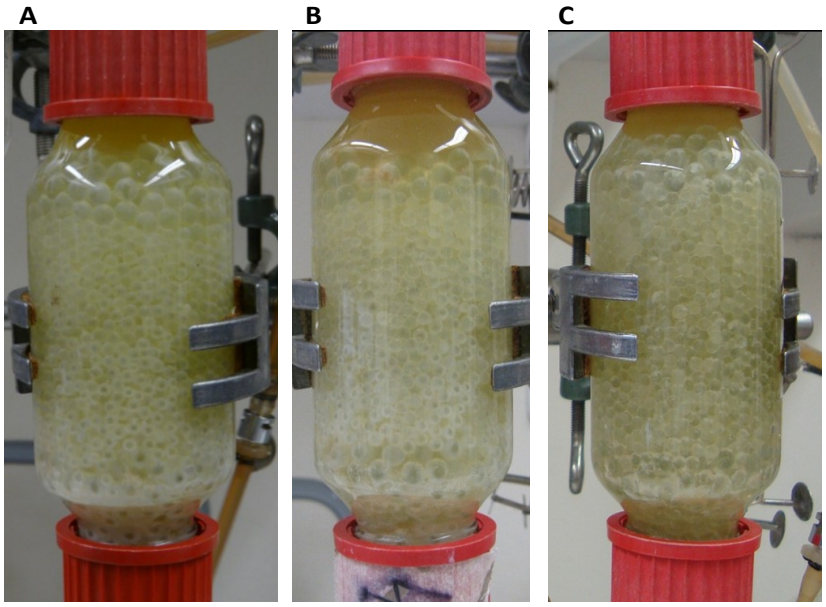



**Abb. 3.7: Biofilmreaktoren nach 10 Tagen Inkubation**
**A**: *S. epidermidis* 55
**B**: *S. aureus* 67
**C**: *S. hominis* subsp. *hominis* 110

Monospezies Biofilmreaktoren mit den Stämmen *S. hominis* subsp. *hominis* 121, *S. epidermidis* 127 und *S. epidermidis* 130 wurden für 10 Tage durchgeführt. Nach diesem Zeitraum war nur eine Ansammlung von Bakterienaggregaten, die nicht an die Glaskugen anhafteten, zu erkennen. Bei den Biofilmreaktoren mit den Stämmen *S.*

*hominis hominis/novobiosepticus* 85, *S. haemolyticus* 106 und *S. epidermidis* 124 konnte nach 10 Tagen keine Biofilmbildung beobachtet werden.

#### 3.2.2.3 Biofilmreaktoren mit *Enterococcus* Stämmen

Zwei *E. faecalis* Stämme, die 75 und die 77 wurden für den Biofilmreaktor ausgewählt, da in beiden Stämmen fünf Resistenzgene und das Gen für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase detektiert worden waren. Stamm 77 beinhaltet zusätzlich noch die pIP501 Transfergene *orf7* und *orf10*. Für den Reaktor wurde das Standard-Medium BHI gewählt. Nach 10 Tagen konnte nur eine Ansammlung von losen Bakterienaggregaten festgestellt werden.

### 3.2.3 Zweispezies Biofilmreaktor

In einer weiteren Versuchsanordnung sollte auf Bildung von Zweispezies Biofilmen untersucht werden. Dafür wurden *B. cereus s.l.* 1 und *S. aureus* 45, die in Monospezies Reaktoren (3.2.2) Biofilmbildung gezeigt hatten, für diesen Versuch ausgewählt. Dieser Versuch wurde mit Glaskugeln und BHI als Wachstumsmedium nach 2.2.1.9 durchgeführt. Stamm Nr. 1 bildete in TSB Medium Biofilm aus und Stamm Nr. 45 in BHI mit Glukosezusatz, so dass BHI als Kompromiss-Medium für beide Stämme diente. Nach ca. 8 Tagen war die Ausbildung eines Biofilms erkennbar (siehe Abb. 3.8). Zur Überprüfung, ob beide Stämme nach dem Reaktorlauf in dem Biofilmreaktor detektiert werden können, wurden Proben aus den Parallelläufen auf nicht selektiven BHI Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Es konnte das Wachstum beider Stämme auf den Platten beobachtet werden, die anhand ihrer charakteristischen Zellmorphologie unter dem Mikroskop unterscheidbar sind (Abb. 3.9).

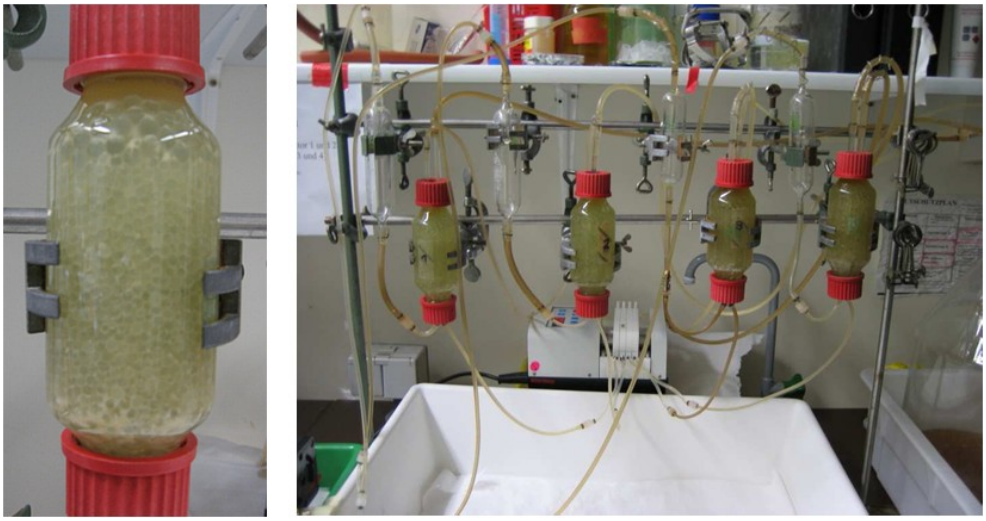


**Abb. 3.8: Zweispezies Biofilmreaktor mit *S. aureus* 45 und *B. cereus s.l.* 1**
Aufnahme nach 10 Tagen Reaktorlauf. Als Medium wurde BHI verwendet.

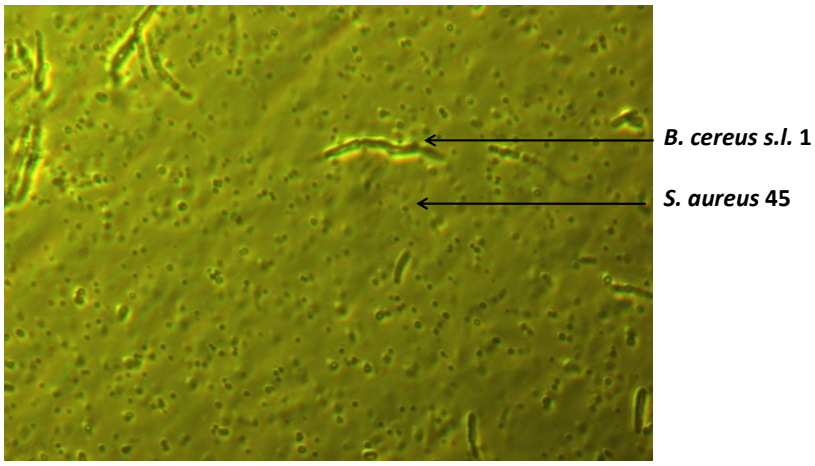



**Abb. 3.9: Mikroskopische Aufnahme von *B. cereus s.l.* 1 und *S. aureus* 45**

### 3.2.4 Multispezies Biofilmreaktor

Ein weiterer Versuch diente dem Aufbau eines Multispezies Biofilmreaktors. Fünf Bakterienstämme, die in vorherigen Einspezies Biofilmreaktoren untersucht worden waren und Biofilm gebildet hatten, wurden ausgesucht. Folgende Bakterienstämme wurden verwendet: *B. cereus s.l.* 1, *S. aureus* 45, *S. aureus* 67, *E. faecalis* 77 und *B. psychrodurans* 24. Stamm Nr. 1 und 45 bildeten in Monospezies und Zweispezies Biofilmreaktoren einen Biofilm aus. Stamm 67 produzierte Biofilm, der sehr schleimig war, bei Stamm 77 und 24 konnte eine Ansammlung von lose anhaftenden Bakterienaggregaten beobachtet werden. Alle fünf Stämme konnten zusammen in dem Biofilmreaktor einen Biofilm ausbilden (Abb. 3.10). Nach 10 Tagen Reaktorlauf wurde von beiden Reaktoren ein Verdünnungsaustrich auf BHI Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum (Tab. 3.17) und ohne erstellt. Alle Stämme außer Stamm 24 konnten so

nachgewiesen werden. Für Stamm 24 konnte keine Antibiotika-Resistenz ermittelt werden. Stamm Nr. 24 könnte im Laufe der 10 Tage im Reaktor durch Nahrungskonkurrenz verdrängt oder aus dem Reaktor vollständig ausgewaschen worden sein. Weiterhin war zu dem Zeitpunkt nicht bekannt, dass dieser Stamm resistent gegen Nalidixinsäure ist (Timmery *et al*., 2011). Im Agardiffusionstest wurde dieses Antibiotikum nicht verwendet (3.1.2). Deswegen konnte dieser Stamm zu dem Zeitpunkt nicht auf Nalidixinsäure-haltigem Medium nachgewiesen werden können.

**Tab. 3.17: Verwendete Antibiotika**

| TU-Nr. | Spezies | Antibiotika [µg/mL] |
|---|---|---|
| 1 | *B. cereus s.l* T0-Air6-1 | Amp25/Oxa5 |
| 45 | *S. aureus* T5-Air3-1 | Amp25/Genta10 |
| 67 | *S. aureus* T0-C2-HA28-5 | Van5/Cat10 |
| 77 | *E. faecalis* Plate10 iso5 | Cat10/Erm30 |

Amp: Ampicillin; Cat: Chloramphenicol; Erm: Erythromycin; Genta: Gentamycin; Oxa, Oxacillin; Van: Vancomycin



**Abb. 3.10: Multispezies Biofilmreaktor**
Folgende Stämme wurden verwendet: *B. cereus s.l*. 1, *S. aureus* 45 und 67, *E. faecalis* 77 sowie *B. psychrodurans* 24. Aufnahme nach 10 Tagen Reaktorbetrieb. Als Medium wurde BHI verwendet.

### 3.2.5 Detektion von Biofilmen mittels Lektinfärbung

Für einige im Biofilmreaktor untersuchte Stämme wurde nach 10 Tagen Reaktorbetrieb ein Lektin-Bindungs Assay (2.2.1.10) durchgeführt. Lektine sind zuckerbindende Proteine, die mit Fluoreszenzmarkern gekoppelt, zur Lokalisierung von Kohlenhydrat-Strukturen auf Zelloberflächen oder in Biofilmen eingesetzt werden können. Für das Assay wurde das Lektin FITC-WGA aus *Triticum vulgaris* verwendet. Dieses Lektin ist spezifisch für *N*-Acetylglukosamin, bindet bevorzugt aber an Dimere und Trimere dieses Zuckers. Das WGA bindet Oligosaccharide, die endständige *N*-Acetylglukosamine oder Chitobiosen enthalten. Das WGA kann an das bakterielle Peptidoglykan, Glykosaminoglykane und Glykolipide binden. Sanford *et al.* (1995) fanden heraus, dass

WGA an die Schleimmatrix von *S. epidermidis* binden kann. Einige *S. aureus* und *S. epidermidis* Stämme produzieren ein hochmolekulares Polymer, das Poly-*N*-Acetylglukosamin (PNAG), das an der Biofilmbildung, der Anhaftung an synthetische Substrate, wie Implantate und Katheter sowie an der interzellulären Adhäsion beteiligt ist (Jabbouri and Sadovskaya, 2010). Propidiumiodid (PI) wurde zur Gegenfärbung der Zellen verwendet. Es ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an DNA bindet und wie Ethidiumbromid DNA-interkalierend wirkt. Dieser Farbstoff kann nur in geschädigte oder tote Zellen eindringen und diese rot färben. Die CLSM-Aufnahme erfolgte mit Leica TCS SP 5 II.

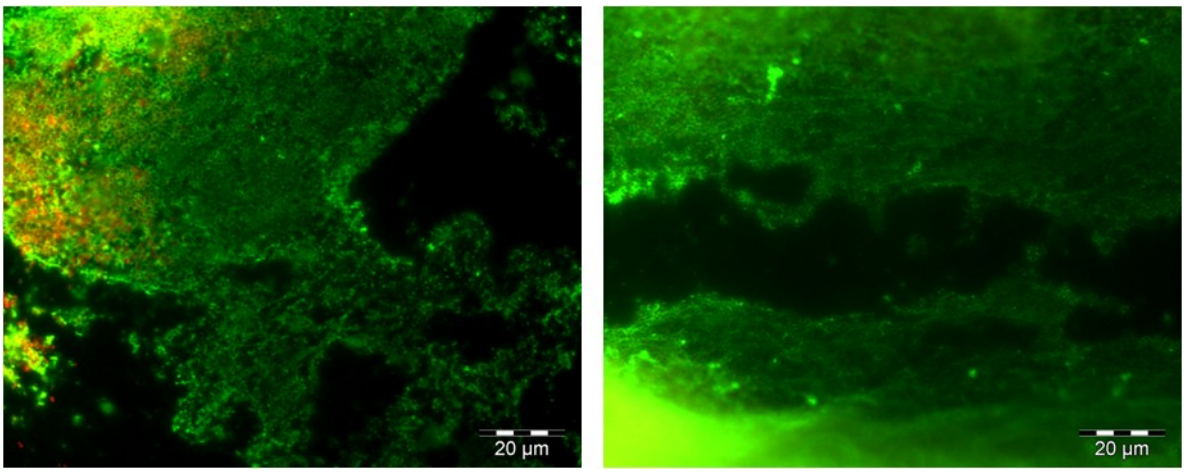



**Abb. 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des *S. epidermidis* 55 Biofilms nach Färbung mit WGA (grün) und PI (rot)**
Die Entnahme der Probe erfolgte nach 10 Tagen Reaktorlauf. Anregung bei 450-490 nm.

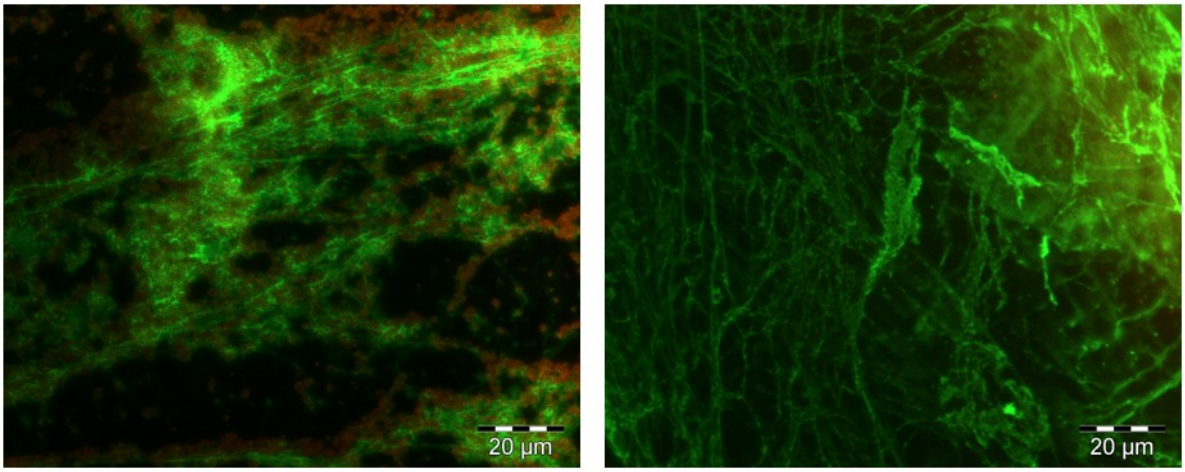



**Abb. 3.12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des *S. aureus* 67 Biofilms nach Färbung mit WGA (grün) und PI (rot)**
Die Entnahme der Probe erfolgte nach 10 Tagen Reaktorlauf. Anregung bei 450-490 nm.

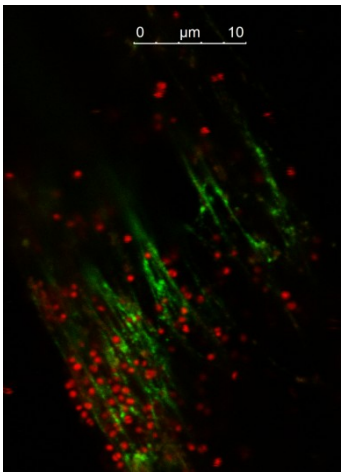



**Abb. 3.13: CLSM Aufnahme des *S. aureus* 67 Biofilms nach Färbung mit WGA (grün) und PI (rot)**
Die Entnahme der Probe erfolgte nach 10 Tagen Reaktorlauf.

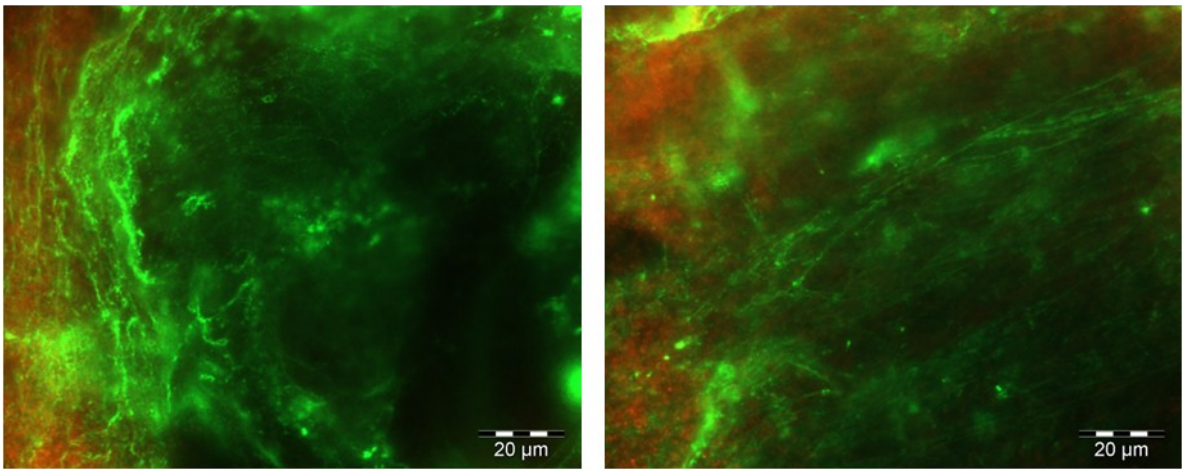



**Abb. 3.14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des *S. hominis* subsp. *hominis* 110 Biofilms nach Färbung mit WGA (grün) und PI (rot)**
Die Entnahme der Probe erfolgte nach 10 Tagen Reaktorlauf. Anregung bei 450-490 nm

Mit der Lektinfärbung konnte nachgewiesen werden, dass Poly-*N*-Acetylglukosamin ein Bestandteil des Biofilms aus *S. epidermidis* 55, *S. aureus* 67 und *S. hominis* subsp. *hominis* 110 ist (Abb. 3.11-3.14). Das Lektin WGA konnte auch an die EPS von *S. saprophyticus* 99 binden (Fürch, 2010).

### 3.2.6 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Die Raster-Elektronenmikroskopie ist eine wichtige Methode zur Oberflächen-Strukturanalyse mit hohem Auflösungsvermögen. Die Proben müssen jedoch fixiert, entwässert und leitfähig gemacht werden, was einen Nachteil dieser Methode darstellt, da Untersuchungen an lebenden biologischen Objekten nicht möglich sind. Diese Methode wurde angewandt, um die Oberfläche einer Glaskugel aus einem

Biofilmreaktor sichtbar zu machen. Dabei sollte bestätigt werden, dass die Bakterien in der Lage sind, sich an diese Glaskugeln anzuheften und Biofilm auszubilden.
Nach 10 Tagen Reaktorbetrieb wurden einige Glaskugeln aus den Biofilmreaktoren mit *S. epidermidis* 130 und *S. aureus* 67 entnommen und für die Raster-Elektronenmikroskopie (REM) vorbereitet. Das beinhaltete die Fixierung der Zellen auf den Glaskugeln mittels Formaldehyd und eine sechsstufige Acetonreihe (2.2.1.11). Anschließend wurden die Glaskugeln einer Critical-Point-Trocknung unterzogen und mit Gold beschichtet (Abb. 3.15 und 3.16).

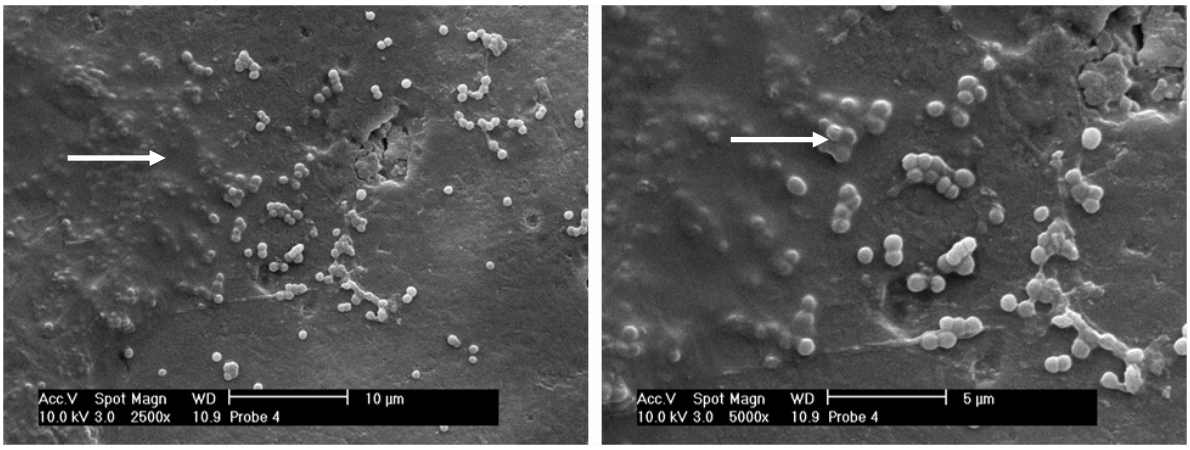



**Abb. 3.15: REM-Aufnahmen einer Glaskugel aus dem Biofilmreaktor mit *S. aureus* 67**
Die Entnahme der Glaskugel (ø 5 mm) erfolgte nach 10 Tagen Reaktorbetrieb.

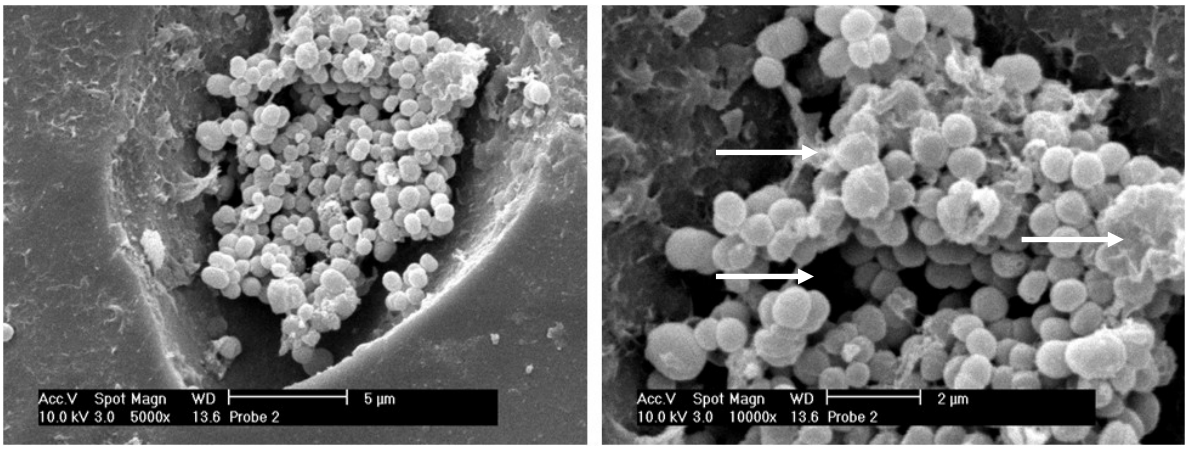



**Abb. 3.16: REM-Aufnahmen einer Glaskugel aus dem Biofilmreaktor mit *S. epidermidis* 130**
Die Entnahme der Glaskugel (ø 3 mm) erfolgte nach 10 Tagen Reaktorbetrieb.

In Abb. 3.15 kann man sehr gut die in die EPS-Matrix eingebetteten Staphylokokken erkennen (siehe Pfeile), da hier die EPS als gelartige Substanz erscheint. Dieser Stamm, *S. aureus* 67, ist in der Lage im Reaktor einen sehr dichten und schleimigen Biofilm zu bilden. Dieses wurde durch die REM Bilder bestätigt. In Abb. 3.16 ist eine Senke zu erkennen, in der dicht beieinander liegende *S. epidermidis* 130 Zellen eingebettet sind.

Die EPS-Matrix ist hier nur an einigen Stellen (siehe Pfeile) erkennbar und unterscheidet sich im Aussehen deutlich von der EPS-Matrix in Abb. 3.15. Im Biofilmreaktor mit S. *epidermidis* 130 wurde nur eine Ansammlung von Bakterienaggregaten, die nicht an die Glaskugeln anhafteten, beobachtet, so dass dies den Unterschied in dem Aussehen der EPS in den REM Bildern verdeutlicht. Die EPS Matrix besteht bis zu 95% aus Wasser sowie Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren. Durch die Entwässerung der Probe für REM können filamentöse Strukturen entstehen (Donlan and Costerton, 2002).

Die REM Bilder bestätigen, dass die genannten Bakterien in der Lage sind, sich an die Glaskugeln anzuheften und dort Biofilm auszubilden.

### 3.2.7 Sauerstoffmessung im Biofilmreaktor

Die Sauerstoffmessung erfolgte mit einem nicht-invasiven $O_2$-Sensorspot (Ø 5mm, PreSens), der in den Reaktor eingeklebt wurde (Abb. 3.17). Gemessen wurde von außen, so dass die Biofilmbildung nicht gestört wurde. Die Daten wurden von dem Sensorspot über den Lichtleiter an das Meßgerät (Fibox 3, PreSens, Deutschland) weitergegeben und von der Fibox Software am Laptop gespeichert (Abb. 3.17). Die Messung des Sauerstoffs erfolgte alle 10 min am Tage für bis zu max. 10 Stunden. Am Ende der Messung wurde der Durchschnittswert des Tages ermittelt und in der Grafik Abb. 3.18 dargestellt. Aufgrund der Fähigkeit sehr dichten und schleimigen Biofilm auszubilden, wurde für die Sauerstoffmessung *S. aureus* 67 ausgewählt, als Medium diente BHI (100%) (3.2.2.2; Abb. 3.7).

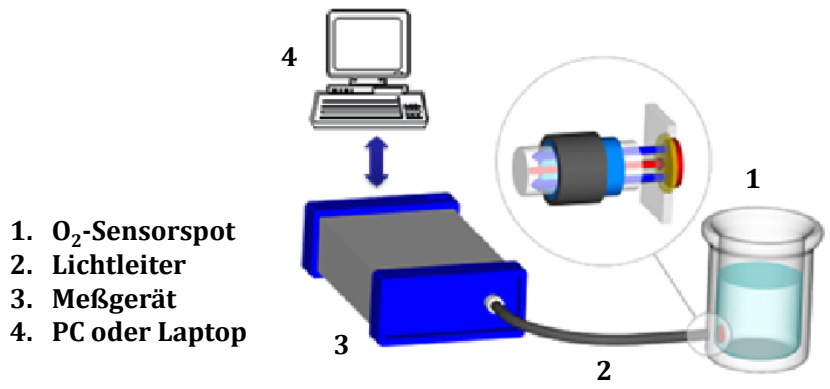



**Abb. 3.17: Beispiel der $O_2$-Messung mit einem nicht-invasiven Sensor (PreSens)**

Die Sauerstoffsättigung ist der maximale Sauerstoffgehalt, der bei gegebenen Bedingungen, Temperatur und Luftdruck, im Wasser im Gleichgewicht lösbar ist. Dieser maximale Sauerstoffgehalt wird als 100%ige Sauerstoffsättigung bezeichnet und beträgt bei 20°C 9,08 $mg \cdot L^{-1}$. Mit zunehmendem Druck, Temperatur und Mineralstoffkonzentration nimmt das Sauerstofflösungsvermögen von Wasser weiter ab (Truesdale *et al.*, 1955). Die Messung ergab, dass im Biofilmreaktor die $O_2$-Sättigung zwischen 0-0,16%, in Abhängigkeit von der Temperatur (21 bis 27°C) im Labor, schwankte. Je höher die Temperatur lag, desto niedriger war die Sauerstoffsättigung, bei 27°C lag diese bei 0% (Daten nicht gezeigt). Dies erklärt auch die Schwankungen in Abb. 3.18. Cotter *et al.* (2009) fanden heraus, dass der Sauerstoffverbrauch von *S. epidermidis* im *Rotating-Disc*-Reaktor höher liegen kann, als die kontinuierliche Zufuhr von 21% Sauerstoff. Nach fünf Stunden Meßzeit sank die Sauerstoffsättigung auf null im umgebenden Medium des Reaktors (25% BHI) (Cotter *et al.*, 2009).

Der Biofilmreaktor in meiner Arbeit wurde mit einer ÜN-Kultur angeimpft und die Sauerstoffmessung begann erst nach vier Stunden Inkubationszeit mit dem Start des kontinuierlichen Betriebs des Reaktors. Die Möglichkeit besteht, dass der durch das Medium und die Gas-durchlässigen Schläuche zugeführte Sauerstoff in dem Biofilmreaktor sofort von den Bakterien verbraucht wurde.

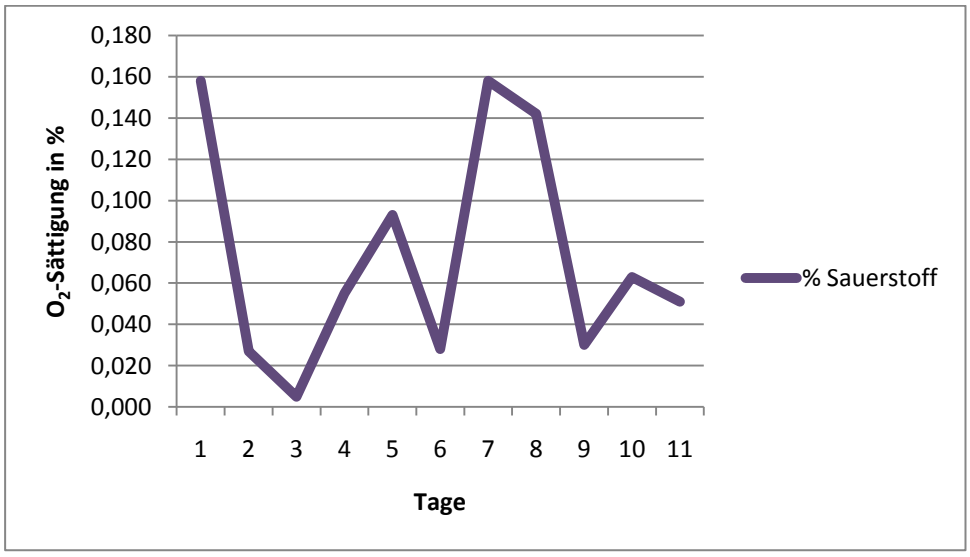



**Abb. 3.18: $O_2$-Sättigung während des 11-tägigen Reaktorlaufs**

### 3.2.8 Gentransferstudien im Biofilmreaktor

In diesem Versuch sollte der Plasmidtransfer in Biofilmen untersucht werden, da Bakterien in der Natur überwiegend in Biofilmen vorkommen. Der Gentransfer sollte unter naturnahen Bedingungen stattfinden. Die Gentransferversuche wurden für 10 Tage („*short term*“) oder 26 Tage („*long term*“) betrieben. In diesen Versuchen wurden zwei mobilisierbare Plasmide benutzt, pMSP-*orf1*-GFP und pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP, die sich darin unterscheiden, das in pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP dem *orf1* und *gfp* jeweils ein *nisA* Promotor vorgeschaltet ist. In pMSP-*orf1*-GFP ist nur ein *nisA* Promotor der *orf1*-GFP-Kassette vorgeschaltet. Ein zusätzlicher Promotor wurde upstream von *gfp* eingebaut, da die GFP-Induktion sehr schwach gewesen ist und die Transkonjuganten kaum Grün geleuchtet hatten.

Das erste Plasmidmobilisierungs-Experiment im Biofilmreaktor wurde mit den Stämmen *S. aureus* 45 (T5-Air3-1) als Donor I, *E. faecalis* OG1X mit dem mobilisierbaren Plasmid pMSP-*orf1*-GFP als Donor II und als Rezipient *E. faecalis* JH2-2 durchgeführt.

Die ersten beiden Reaktoren (Parallellauf, Reaktor I und II) wurden zuerst nur mit Donor I inokuliert, nach 8 Tagen wurden Donor II und der Rezipient hinzugefügt. Reaktor III und IV (Parallellauf) wurden am ersten Tag mit beiden Donoren inokuliert. Nach 8 Tagen wurde der Rezipient zugegeben. Am 8. Tag vor dem 2. Beimpfen wurden Proben aus der Flüssigphase entnommen, weitere am 9., 10. und 11. Tag. Die Proben wurden auf selektiven Agarplatten ausgestrichen, um Transkonjuganten nachzuweisen sowie zum Nachweis aller drei Kreuzungspartner. Wir erhielten eine Mobilisierungsrate (Durchschnitt aus den 4 Reaktoren) von $3{,}1\times10^{-8}$ pro Rezipient. In Filtermating Experimenten, die eine Inkubationszeit von 4 Stunden hatten, betrug diese $3{,}9\times10^{-8}$ pro Rezipient. Beide Transferfrequenzen sind somit sehr ähnlich.

Bei dem zweiten Mating Experiment verwendeten wir als Donor I *E. faecalis* T9, ein klinisches Isolat, das ein konjugatives Element enthält. In diesem Stamm konnten die Transfergene *traE*, *traK*, *traG* und das Gen für die $Nes_{pSK41}$-Relaxase mittels Southern Hybridisierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Als Donor II und Rezipient wurden *E. faecalis* OG1X pMSP-*orf1*-GFP und *E. faecalis* JH2-2 verwendet. Zwei Reaktoren wurden im Parallellauf mit beiden Donoren beimpft und für 8 Tage inkubiert. Am 8. Tag wurde der Rezipient zugegeben. Proben wurden vor der Beimpfung am 8. Tag und am 10. sowie am 11. Tag entnommen und auf selektiven Agarplatten ausgestrichen.

Die Mobilisierungsrate betrug in diesem Fall $4,5\times10^{-8}$ pro Rezipient. Durch Filtermating Experimente (Inkubation 4 Stunden) erhielten wir eine Mobilisierungsrate von $7,7\times10^{-8}$ pro Rezipient. Auch in diesem Fall ähnelten sich die Mobilisierungsfrequenzen.

Bei dem dritten Versuch diente wieder *E. faecalis* T9 als Donor I, *E. faecalis* OG1X mit dem mobilisierbaren Plasmid pMSP-*orf1*-GFP als Donor II und als Rezipient *E. faecalis* JH2-2. In diesem Versuch wurden die Biofilmreaktoren von Anfang an mit allen drei Stämmen beimpft und 10 Tage inkubiert. Am 6., 8. und 10. Tag des Reaktorlaufs wurden Proben gezogen und auf selektiven Platten ausgestrichen. Am letzten Tag des Biofilmreaktorlaufs wurden Glaskugeln mit Biofilm entnommen und mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen, um die Zellen von den Glaskugeln zu lösen. Die Zellsuspension wurde auf selektiven Platten ausgestrichen und die Transferrate bestimmt. Die Mobilisierungsrate in der Flüssigphase betrug durchschnittlich $7,2\times10^{-7}$ pro Rezipient, an den Glaskugeln durchschnittlich $2,6\times10^{-6}$ pro Rezipient und im Filtermating Experiment $7,7\times10^{-8}$ pro Rezipient. Somit ließen sich im Vergleich zum Filtermating (4 h Inkubation) wesentlich höhere Mobilisierungsraten im Biofilmreaktor erhalten, wenn der Reaktor mit allen drei Kreuzungspartnern gleichzeitig inokuliert wurde. In allen drei Versuchen wuchsen die Transkonjuganten nach 48-72h auf selektiven Medien.

Das zweite Plasmidmobilisierungs-Experiment im Biofilmreaktor wurde mit den Stämmen *E. faecalis* T9 als Donor I, *E. faecalis* OG1X mit dem mobilisierbaren Plasmid pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP als Donor II und als Rezipient *E. faecalis* JH2-2 durchgeführt. Der Biofilm Reaktor wurde 26 Tage lang betrieben und gleichzeitig mit allen drei Kreuzungspartnern inokuliert. Die erste Probeentnahme erfolgte am Startpunkt des Reaktorlaufs, dabei wurde eine Flüssigprobe entnommen, Verdünnungen hergestellt und auf jeweiligen Antibiotika-haltigen Platten im Doppelansatz ausgestrichen. Die zweite Probeentnahme erfolgte nach 24 Stunden, hier wurde zusätzlich eine Probe mit mehreren Glaskugeln entnommen. Weitere Proben, jeweils eine Flüssigprobe und drei Proben mit mehreren Glaskugeln, wurden jeweils nach fünf Tagen entnommen. Die Glaskugeln wurden immer mit 1 mL 0,9% NaCl-Lösung versetzt und von jeder Probe Verdünnungen hergestellt und im Doppelansatz auf Antibiotika-haltigen Platten ausgestrichen. Nach 18 Tagen konnte im Reaktor Biofilmbildung beobachtet werden. Die Mobilisierungsrate in der Flüssigphase betrug durchschnittlich $4\times10^{-8}$ pro Rezipient und an den Glaskugeln $7\times10^{-8}$ pro Rezipient. In diesem Fall konnten nur 2-3,5 fach höhere Mobilisierungsraten im Vergleich zum Filtermating ($2\times10^{-8}$ pro Rezipient, 6h

Inkubation) im Biofilmreaktor erreicht werden. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis ist, dass der Donor II, *E. faecalis* OG1X mit dem mobilisierbaren Plasmid pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP, am Anfang des Reaktorlaufs mit $1{,}2\times10^7$ Zellen/100 µL detektierbar war und am Ende des Reaktors nur noch $8\times10^2$ Zellen/100 µL nachgewiesen werden konnten. Ohne Selektionsdruck, ohne Zugabe des Antibiotikums Erythromycin, verliert *E. faecalis* OG1X das Plasmid pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP.

Die Transkonjuganten wuchsen im Gegensatz zu vorherigen „*short term*" Versuchen im Durchschnitt erst nach 14 Tagen an. Diese wurden auf Antibiotika-haltige Platten, denen Nisin zugesetzt wurde nochmal ausgestrichen und auf GFP Fluoreszenz überprüft. In diesem Fall betrug die Wachstumszeit ca. 5 Tage (Abb. 3.19). Die Möglichkeit besteht, dass nach 14 Tagen auch der Donor II auf den Transkonjuganten Platten wachsen könnte. Die Kontrollplatten, die am Anfang des Versuches mit Reinkulturen erstellt worden waren, zeigten in diesem Fall für beide Donoren nach 15 Tagen Inkubation kein Wachstum. Aus anderen Versuchen ist aber bekannt, dass der Donor II in einem sehr geringen Umfang (ca. 5 Kolonien) auf diesen Platten nach ca. 5 Tagen wachsen kann. Die Transkonjuganten wurden außerdem auf den Donor II Platten ausgestrichen, um nachweisen zu können, dass es sich nicht um den Donor II handelt. Nach einigen Tagen konnte auf den Platten Wachstum beobachtet werden, so dass nicht sicher gestellt war, ob es Transkonjuganten oder der Donor II war.

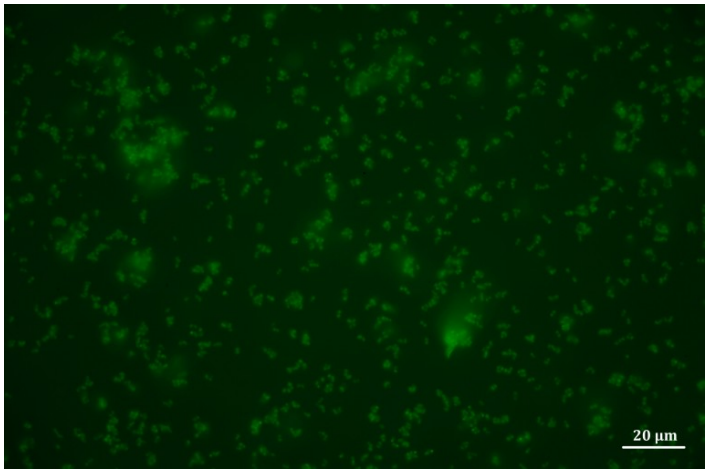



**Abb. 3.19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *E. faecalis* JH2-2 (pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP) Transkonjuganten nach Induktion mit Nisin (100 ng·mL$^{-1}$)**

## 3.3 Molekulare Charakterisierung von Antibiotika resistenten Milchsäurebakterien aus Milch- und Fleischprodukten

Milchsäurebakterien (LAB) spielen eine große Rolle in der Herstellung von Milchprodukten sowie fermentierten Lebensmitteln und sind Bewohner des menschlichen und tierischen Magen-Darm- und Urogenital-Traktes. Zu den Milchsäurebakterien gehören u. a. *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* und *Bifidobacterium* Spezies. Einige ausgewählte Stämme von *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*, dienen außerdem als Lebensmittelzusätze (Probiotika), da sie das Gleichgewicht der Darmflora fördern und sich positiv auf das Immunsystem auswirken (Klare *et al*., 2007). Enterokokken stellen die meist diskutierte Gruppe der Milchsäurebakterien dar, da diese Bewohner des Magen-Darm-Traktes sind, für Fermentationsprozesse und als Probiotika genutzt werden und auch wichtige nosokomiale Pathogene darstellen. Durch Untersuchungen von traditionell hergestellten Käseprodukten aus den mediterranen Raum wurde rausgefunden, dass Enterokokken eine große Rolle bei dem Reifeprozess des Käses spielen und somit an der Entwicklung des Geschmacks und Aromas wesentlich beteiligt sind (Vankerckhoven *et al*., 2008; Foulquié Moreno *et al*., 2006).

Die hier untersuchten 100 LAB Stämme wurden von Kooperationspartnerin (Prof. Dr. Zerrin Ergýnkaya, Cukurova University, Adana, Türkei) aus traditionell hergestellten Milch- und Fleischprodukten isoliert und deren Antibiotikaresistenzen mittels Agardiffusionstest bestimmt. In 91% der Stämme wurde Vancomycin-Resistenz nachgewiesen, 77% der Stämme sind resistent gegenüber Ciprofloxacin, 25% gegenüber Gentamycin, 17% gegenüber Nitrofurantoin, 9% besitzen Erythromycin-Resistenz und 4% Tetracyclin-Resistenz. In 36% der LAB Stämme sind drei oder mehr Resistenzen detektiert worden. *Lactobacillus* und *Pediococcus* Spezies besitzen eine natürliche Vancomycin-Resistenz (Mathur and Singh, 2005; Miele *et al*., 1995).

Unsere Aufgabe bestand darin die resistenten LAB Stämme auf Plasmide, Antibiotikaresistenz- und Transfergene zu untersuchen sowie deren phylogenetischen Einordnung mittels 16S rDNA-Sequenzierung. In triparentalen Kreuzungs-Experimenten sollte untersucht werden, ob ausgewählte LAB Stämme konjugative Elemente besitzen und Plasmide mobilisieren können. Teile dieses Projekts wurden im Rahmen von Praxis- und Bachelorarbeiten am FG Umweltmikrobiologie der TU Berlin von Isabel Knittel und

Linda Mende, sowie den studentischen Hilfskräften Anita Püngel und Julia Rosenlöcher durchgeführt.

### 3.3.1 Untersuchung der Milchsäurebakterien auf Resistenz- und Transfergene

Die LAB Stämme wurden auf 22 unterschiedliche Resistenzgene untersucht, die Resistenzen gegen Glykopeptide (Vancomycin: *van*A, *van*B, *van*C1/2), β-Lactam Antibiotika (*mec*A, *amp*C), Aminoglycoside (Gentamycin: *aac6-aph2a*, *aph(2)-Ib*, *aph(2)-Ic*, *aph(2)-Id*; Kanamycin: *aph3-III*, *aadD*), Chloramphenicol ($cat_{pC194}$, $cat_{pIP501}$, $cat_{LM}$), MLS-Antibiotika (Erythromycin: *erm*B, *erm*C, *erm*D, *erm*G) und Tetracycline (*tet*K, *tet*M, *tet*O, *tet*S) kodieren. Die dafür verwendeten Primerpaare sind in der Tabelle 2.6 sowie die verwendeten PCR-Programme unter 2.1.8 aufgelistet. Die Binderegionen dieser Primerpaare sind in der Tabelle 3.3 im Kapitel 3.1.3 (S. 71) zusammengefasst. Die LAB Stämme wurden außerdem auf Relaxasen der $MOB_Q$ (pSK41, pGO1, pMRC01, pK214, pLTK13), $MOB_V$ (pSK41, pGO1, pT181, pSMA23, pJS42) und $MOB_P$ (pRS01) Familie von unterschiedlichen Plasmiden aus G+ Bakterien (Smillie *et al*., 2010; Garcillán-Barcia *et al*., 2009;Francia *et al*., 2004) sowie auf *virD4* (*orf10/traK/trsK*), *virB1* (*orf7/traG*) und *virB4* (*orf5/traE/trsE*) homologe Gene von unterschiedlichen konjugativen Plasmiden aus G+ Bakterien (pIP501, pSK41, pSM19035, pMRC01, plca36) untersucht. Die Binderegionen der LAB-spezifischen Primerpaare sind in Tabelle 3.18 aufgelistet. Falls die Bande des PCR Produkts zu schwach, oder mehrere Banden auf dem Agarosegel zu sehen waren, wurde eine Southern Hybridisierung durchgeführt (2.2.2.9; Tab. 2.9).

**Tab. 3.18: Binderegionen der LAB-spezifischen Primer**

| Primerpaar | Mobile genetische Elemente (Name, Accession No., Bakterienstamm) | Produktgröße [bp] | Referenz |
|---|---|---|---|
| pRS01 *ltrB* | pRS01, U50902, *L. lactis* subsp. *lactis*<br>CP002094, *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000<br>pFI430, DQ011112, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363<br>AM406671, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 | 396 | Arends, 2010 |
| pLTK13 | pLTK13, AB450918, *L. plantarum* L137<br>pLgLA39, AB436615, *L. gasseri* LA39<br>plca36, CP000935, *L. casei* Zhang<br>pLR002, CP001156, *L. rhamnosus* HN001 | 880 | Arends, 2010 |
| pK214 *nel* | pMRC01,AE001272, *L. lactis* DPC3147<br>pK214, X92946, *L. lactis* subsp. *lactis* | 500 | Arends, 2010 |
| pSMA23 *mob* | pSMA23, DQ116709, *L. casei* A23<br>p141, AB517606, *L. plantarum*<br>pRS4, AJ968953, *P. pentosaceus* RS4<br>pLC88, U31333, *L. casei* | 348 | Arends, 2010 |

**Tab. 3.18: Fortsetzung**

| Primerpaar | Mobile genetische Elemente (Name, Accession No., Bakterienstamm) | Produktgröße [bp] | Referenz |
|---|---|---|---|
| *trsE*_plca36 | plca36, CP000935, *L. casei* str. Zhang<br>pLgLA39, AB436615, *L. gasseri*<br>Contig2, AY673958, *L. paracasei* NFBC338<br>pWCFS103, NC_006377, *L. plantarum* WCFS1 | 603 | diese Arbeit |
| *trsK*_plca36 | plca36, CP000935, *L. casei* str. Zhang<br>pLgLA39, AB436615, *L. gasseri*<br>Contig2, AY673958, *L. paracasei* NFBC338<br>pWCFS103, NC_006377, *L. plantarum* WCFS1 | 670 | diese Arbeit |

Die in den LAB nachgewiesenen Resistenz- und Transfergene sind in Tabelle 3.19 zusammengefaßt.

**Tab. 3.19: Resistenz- und Transfergene in den LAB Stämmen**

| Stamm | Genotyp[a] | Resistenzen[b] |
|---|---|---|
| LAB5 | *tet*M, pSMA23-Relaxase | V, C, T |
| LAB10 | $pre_{pSK41}$, $nes_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE*, *orf7* | V, C |
| LAB11 | $pre_{pSK41}$, $nes_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traG* | V, C, N |
| LAB12 | pSMA23-Relaxase, *traG* | V, C, N |
| LAB13 | $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traG*, *orf5* | V, C |
| LAB14 | pSMA23-Relaxase, *trsK*, *traE* | V, C |
| LAB15 | pLTK13-Relaxase, $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE* | V, C |
| LAB16 | $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE*, *orf5*, *orf7* | V, C, N |
| LAB17 | $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE* | V, C |
| LAB18 | pLTK13-Relaxase, $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE*, *traG*, *orf7* | V, C |
| LAB19 | $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE*, *orf7* | V, C |
| LAB20 | pLTK13-Relaxase, $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *traE* | V, C, N |
| LAB21 | *van*C1/2, pLTK13-Relaxase, $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE* | V, C, N |
| LAB22 | pLTK13-Relaxase, $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE*, *orf5* | V, C, N |
| LAB23 | pLTK13-Relaxase, $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE*, *orf5* | V, C |
| LAB24 | $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *orf5* | V, C |
| LAB25 | $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase | V, C, N |
| LAB26 | pLTK13-Relaxase, $pre_{pSK41}$, *trsE*, *trsK*, *traE* | V, C, N |
| LAB27 | $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE*, *orf5* | V, C |
| LAB28 | pSMA23-Relaxase, *traG* | V, C, N |
| LAB29 | pSMA23-Relaxase, *traG* | V, C, N |
| LAB43 | *van*C1/2, pLTK13-Relaxase, pSMA23-Relaxase, *trsK* | V, C |
| LAB45 | *van*C1/2, pRS01-Relaxase, pSMA23-Relaxase | V, C, G |
| LAB54 | *tet*M, pJS42-Relaxase, $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE* | V, C, T, A, E, G |
| LAB57 | *aph2-Ic*, pSMA23-Relaxase | V, C, G |
| LAB58 | *erm*G, pLTK13-Relaxase, $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK* | V, C |
| LAB66 | *erm*B, *erm*G, pJS42-Relaxase, $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase | V, E |
| LAB72 | *erm*B, pJS42-Relaxase, pSMA23-Relaxase | V, E |
| LAB76 | pT181-Relaxase, pSMA23-Relaxase | V, C |
| LAB77 | *erm*B, pSMA23-Relaxase | E, G |
| LAB79 | *erm*B, pSMA23-Relaxase | V, C, E, R |
| LAB82 | pK214-Relaxase | V, C, G |
| LAB84 | *erm*B, *tet*M, *van*C1/2, pSMA23-Relaxase | V, C, G |
| LAB85 | pSMA23-Relaxase | V, C, G |
| LAB86 | pSMA23-Relaxase | V, C, G |
| LAB87 | pLTK13-Relaxase, pSMA23-Relaxase | V, C, G |
| LAB89 | *aph3-III*, pSMA23-Relaxase | V, C, G |
| LAB92 | pSMA23-Relaxase | V.,C, G, N |
| LAB93 | pSMA23-Relaxase | C, G, N, T |
| LAB95 | pLTK13-Relaxase, pSMA23-Relaxase | V, C, G, N |

[a] *aph2-Ic*: Gentamycin; *aph3-III*: Kanamycin; *erm*: Erythromycin; *tet*: Tetracyclin; *van*: Vancomycin
[b] N-Nitrofurantoin 300 µg; C-Ciprofloxacin 5 µg; V-Vancomycin 30 µg; T-Tetracyclin 30 µg; G-Gentamycin 10 µg; A-Ampicillin 10 µg; E-Erythromycin 15 µg; R-Rifampicin 5 µg;

In 84 LAB Stämmen (84%) wurde das Gen für die pSMA23-Relaxase nachgewiesen und in 19 (19%) Stämmen das Gen für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase. Diese Stämme enthalten noch zusätzliche Gene, die für pSMA23-, Nes-, pJS42- oder pLTK13-Relaxasen kodieren. In insgesamt 14 (14%) Stämmen konnten Gene für zwei Relaxasen detektiert werden, elf Stämme (11%) beinhalten sogar drei Relaxasegene. Das Gen für die pLTK13-Relaxase wurde in elf Stämmen nachgewiesen. Die *virD4* und *virB4* homologen Gene *trsK* und *trsE* sind in jeweils acht (8%) LAB Stämmen nachgewiesen worden. In sechs Stämmen sind die beiden Transfergene, *trsE* und *trsK* zusammen mit dem Gen für die pLTK13-Relaxase detektiert worden (18, 21, 22, 23, 26 und 58). Diese Stämme enthalten zusätzliche Transfergene wie *traE* und *traG* (*virB1* homolog), die in Staphylokokken vertreten sind, oder pIP501 ähnliche Gene (*orf5* und *orf7*). In 20 Stämmen (20%) konnten drei oder mehr (bis zu acht) Transfergene nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind die Stämme LAB18, LAB22 und LAB23. In LAB18 wurden neben drei Relaxasegenen (pLTK13, $Pre_{pSK41}$ und pSMA23) fünf Transfergene (*trsE*, *trsK*, *traE*, *traG*, *orf7*) detektiert. Die Stämme LAB22 und LAB23 beinhalten insgesamt sieben Transfergene (pLTK13, $Pre_{pSK41}$, pSMA23, *trsE*, *trsK*, *traE*, *orf5*).

Die pT181-, pRS01- und pK214-Relaxasegene konnten in nur jeweils einem Stamm detektiert werden (LAB76, LAB45 und LAB82). LAB76 und LAB45 beinhalten zusätzlich noch das Gen für die pSMA23-Relaxase. Es konnten keine weiteren Transfergene in diesen drei Stämmen festgestellt werden.

In nur 13 LAB Stämmen (13%) wurden Resistenzgene nachgewiesen. Diese Stämme beinhalten aber zusätzlich eine oder mehrere Relaxasen. Das Erythromycin-Resistenzgen *erm*B konnte in fünf LAB Stämmen detektiert werden (66, 72, 77, 79 und 84). Das *erm*G Resistenzgen wurde in den LAB Stämmen 58 und 66 nachgewiesen. LAB58 enthält zusätzlich noch drei Relaxasen sowie die Transfergene *trsE* und *trsK*. Im Agardiffusionstest wurden die Stämme 66, 72, 77 und 79 als Erythromycin resistent eingestuft, die Stämme 84 und 58 als sensitiv.

Das Vancomycin-Resistenzgen *van*C1/2 wurde mittels Southern Hybridisierung in vier LAB Stämmen detektiert (21, 43, 45, 84; Abb. 3.20). Diese Stämme wurden auch im Agardiffusionstest als Vancomycin resistent eingestuft.

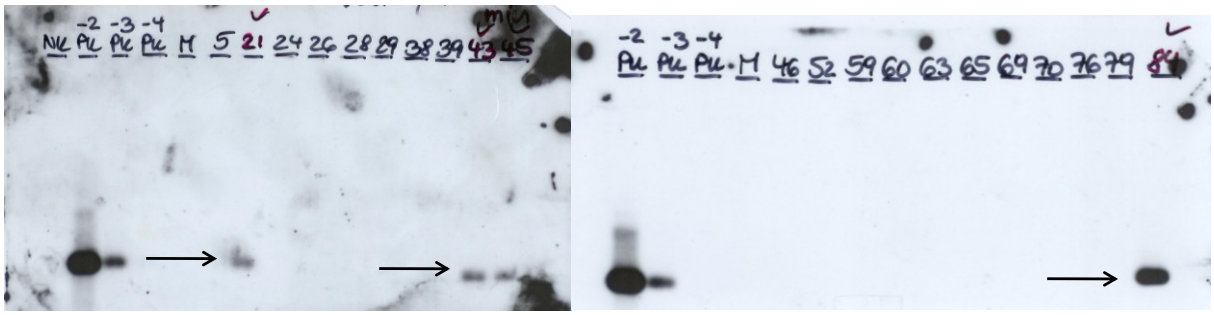



**Abb. 3.20: Nachweis der *van*C1/2 Resistenzgene in den LAB Stämmen mittels Southern Hybridisierung**
Die Detektion mit CSPD erfolgte für 20 min. NK: Negative Kontrolle; PK: Positive Kontrolle; PK-2: 360 pg; PK-3: 36 pg, PK-4: 3,6 pg. Positive Stämme sind mit Pfeilen markiert.

Das Tetracyclin-Resistenzgen *tet*M konnte in drei LAB Stämmen amplifiziert werden (LAB5, LAB54 und LAB84). LAB84 besitzt somit drei Resistenzgene (*erm*B, *tet*M und *van*C1/2) und das Gen für die pSMA23-Relaxase. Im Agardiffusionstest war LAB84 sensitiv gegenüber Tetracyclin. In einigen Tetracyclin sensitiven *Streptococcus* Spezies konnte auch das *tet*M Gen nachgewiesen werden. Im Agardiffusions-Test wird die Tetracyclin Resistenz ohne vorherige Induktion der Resistenz bewertet, so dass einige Tetracyclin resistente Stämme fälschlicherweise als sensitiv bewertet werden können. Die Induzierbarkeit der Tetracyclinresistenz konnte für *S. aureus in vivo* bestätigt werden (Doherty *et al*., 2000; Trzcinski *et al*., 2000). Eine weitere Möglichkeit besteht, dass das Gen eine Mutation enthält und somit nicht aktiv ist.
In nur jeweils einem Stamm wurde das Kanamycin-Resistenzgen *aph3-III* (LAB89) sowie das Gentamycin-Resistenzgen *aph2-Ic* (LAB57) detektiert. Beide Stämme wurden im Agardiffusionstest als resistent gegenüber Gentamycin eingestuft. Das *aph3-III* Resistenzgen kodiert Resistenzen gegenüber Kanamycin und Neomycin, nicht aber gegenüber Gentamycin (Vakulenko and Mobashery, 2003).

## 3.3.2 Plasmidisolierung aus Milchsäurebakterien

Plasmide spielen eine große Rolle in Milchsäurebakterien, da viele ihrer Eigenschaften, die industriell signifikant sind, wie z. B. Laktosefermentation, proteolytische Aktivität, Bakteriophagen Resistenz oder Bakteriocin Produktion, auf Plasmid-DNA kodiert sind (Mills *et al*., 2005). Beispiele hierfür sind die konjugativen Plasmide pMRC01 und pLgLA39, die Gene für Bacteriocin Produktion und Immunität tragen. Das Plasmid pMRC01 kodiert außerdem für Resistenz gegen Bacteriophagen CP-1. Plasmide aus LAB Stämmen können zusätzlich *mob* oder *tra* Gene sowie IS Elemente tragen, die den

genetischen Austausch innerhalb und außerhalb der Speziesgrenzen vermitteln und so die Weitergabe oder Aufnahme (*capture*) von Resistenzgenen begünstigen. Ein Beispiel hierfür ist das 30 kb große konjugative Plasmid pK214, das aus *L. lactis* K214 (1993, Rohmilchkäse) isoliert wurde. Dieses Plasmid kodiert für drei Antibiotikaresistenzen, Tetracyclin (*tet*S), Chloramphenicol ($cat_{LM}$) und Streptomycin (*str*), die von *Enterococcus* IS Elementen flankiert sind. Das Resistenzgen *tet*S stimmt zu 99,8% mit dem aus dem pathogenen Stamm *L. monocytogenes* überein. Die Resistenzgene $cat_{LM}$ und *str* stimmen zu 99,9% und 98% mit denen aus *S. aureus* überein (Perreten *et al*., 1997).

Die Plasmidisolierung erfolgte nach Anderson und McKay (1983) mit einigen Modifikationen (2.2.2.5). Es konnten nicht aus allen LAB Stämmen Plasmide isoliert werden, da erst am Ende des Projektes ein Protokoll vorlag, das gute Ergebnisse lieferte. Eine Zusammenfassung der isolierten Plasmide ist in Tabelle 3.20 zu finden. In Abbildung 3.21 sind die Plasmide einiger LAB Stämme zu sehen. Einige Plasmide konnten mittels Gesamt-DNA Isolierung detektiert werden (2.2.2.6). Schwache Plasmidbanden sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.

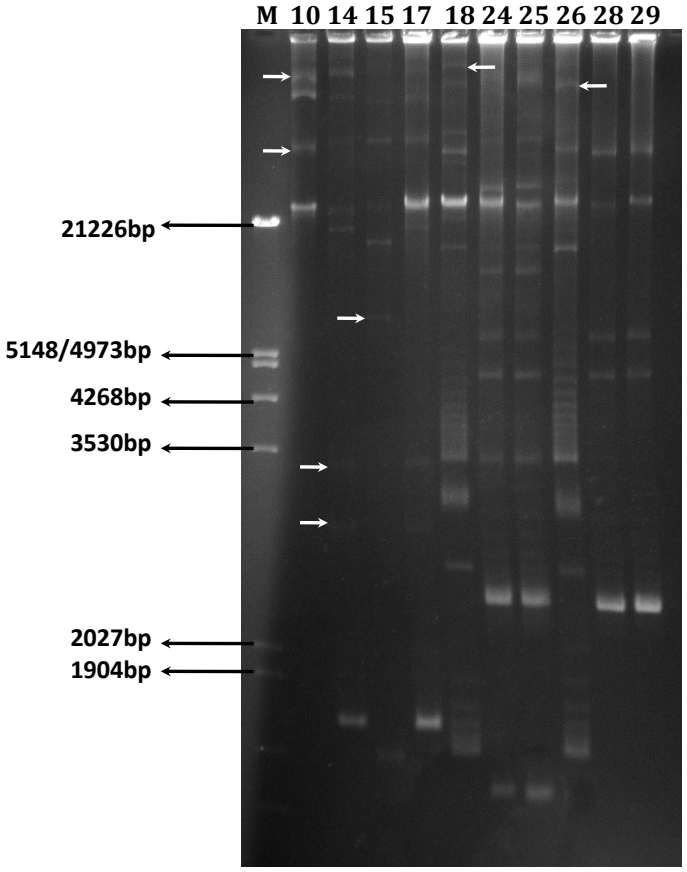



**Abb. 3.21: Plasmidisolierung aus ausgewählten LAB Stämmen**
M: Lambda DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII DNA Marker
Weiße Pfeile markieren schwache Plasmid Banden

Die zehn LAB Stämme enthalten Plasmide, die größer als 20 kb sind. Alle außer LAB10 enthalten auch kleinere Plasmide (<20 kb). Bei den Stämmen 14 und 17 kann man erkennen, dass diese Stämme das gleiche Plasmidprofil besitzen aber sich nur in zwei Transfergenen ähneln (pSMA23-Relaxase und *traE*). Ähnliche Plasmidprofile besitzen auch die Stämme 18 und 26, 20 und 21 (Daten nicht gezeigt; Knittel, 2010), 24 und 25 sowie 28 und 29 (in der Tabelle 3.20 farblich markiert). Die Stämme 18 und 26 unterscheiden sich aber in der Anzahl an Transfergenen. In LAB26 wurden fünf Transfergene detektiert, in LAB18 acht. Bei beiden Stämmen sind mehrere Banden über der 20 kb Marker-Bande zu erkennen, auch kleinere Plasmide sind vorhanden. Der Stamm 21 unterscheidet sich vom Stamm 20 in den Genen *van*C1/2 und *trsK*. Aus beiden Stämmen konnten keine großen Plasmide isoliert werden. LAB24 unterscheidet sich von LAB25 nur in dem Transfergen *orf5*. In beiden Stämmen konnten nur zwei Relaxasen detektiert werden. Diese Stämme besitzen aber Plasmide, die größer als 20 kb sind und mehrere kleinere. Die Anzahl der Banden oberhalb der 20 kb Markerbande ist bei LAB24 nicht gut erkennbar. In den LAB Stämmen 28 und 29 konnte das Gen für die pSMA23-Relaxase und *traG* detektiert werden. Es konnten auch ein großes Plasmid und drei kleine Plasmide isoliert werden. Die hier erhaltenen Daten werden im Kapitel 3.3.4 mit den Daten aus der 16S Sequenzierung und bekannten LAB Plasmiden verglichen.

**Tab. 3.20: Plasmide in Milchsäurebakterien**
Farblich markiert sind die Stämme, die ein ähnliches Plasmidprofil aufweisen.

| Stamm | Genotyp[a] | Plasmide[b] groß (>20kb) | klein (<20kb) |
|---|---|---|---|
| LAB2 | n.d | 1 | 6 |
| LAB10 | *pre*$_{pSK41}$, *nes*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE*, *orf7* | 4 | n.d |
| LAB11 | *pre*$_{pSK41}$, *nes*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traG* | 1 | 1 |
| LAB12 | pSMA23-Relaxase, *traG* | 2 | 3 |
| LAB13 | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traG*, *orf5* | n.d | 2 |
| LAB14 | pSMA23-Relaxase, *trsK*, *traE* | 3 | 2 |
| LAB15 | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE* | 2 | 3 |
| LAB16 | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE*, *orf5*, *orf7* | 2 | 1 |
| LAB17 | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE* | 3 | 4 |
| LAB18 | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE*, *traG*, *orf7* | 5 | 6 |
| LAB19 | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE*, *orf7* | 5 | 3 |
| LAB20 | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *traE* | n.d | 6 |
| LAB21 | *van*C1/2, pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE* | n.d | 6 |
| LAB22 | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE*, *orf5* | 2 | 3 |
| LAB23 | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE*, *orf5* | n.d | 5 |
| LAB24 | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *orf5* | 3 | 6 |
| LAB25 | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase | 4 | 7 |
| LAB26 | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, *trsE*, *trsK*, *traE* | 3 | 5 |
| LAB27 | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE*, *orf5* | 1 | 4 |
| LAB28 | pSMA23-Relaxase, *traG* | 1 | 3 |
| LAB29 | pSMA23-Relaxase, *traG* | 1 | 3 |

**Tab. 3.20: Fortsetzung**

| Stamm | Genotyp[a] | Plasmide[b] groß (>20kb) | klein (<20kb) |
|---|---|---|---|
| LAB45 | *van*C1/2, pRS01-Relaxase, pSMA23-Relaxase | 1 | 4 |
| LAB53 | pSMA23-Relaxase | 1 | n.d |
| LAB66 | *erm*B, *erm*G, pJS42-Relaxase, $pre_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase | n.d | 3 |
| LAB79 | *erm*B, pSMA23-Relaxase | 1 | 2 |
| LAB85 | pSMA23-Relaxase | n.d | 1 |
| LAB86 | pSMA23-Relaxase | n.d | 1 |
| LAB87 | pLTK13-Relaxase, pSMA23-Relaxase | n.d | 1 |
| LAB88 | pSMA23-Relaxase | 1 | n.d |
| LAB89 | *aph3-III*, pSMA23-Relaxase | n.d | 2 |
| LAB92 | pSMA23-Relaxase | n.d | 2 |
| LAB95 | pLTK13-Relaxase, pSMA23-Relaxase | 1 | n.d |
| LAB97 | pSMA23-Relaxase | 1 | n.d |

[a]*aph2-Ic*: Gentamycin; *aph3-III*: Kanamycin; *erm*: Erythromycin; *tet*: Tetracyclin; *van*: Vancomycin
[b]Die Zahl korrespondiert mit der Anzahl der Banden auf dem Gelbild; n.d: nicht detektiert

## 3.3.3 Plasmidmobilisierung

Die LAB Stämme 18, 21 und 26 wurden aufgrund der detektierten Transfergene und der nachgewiesenen Plasmide für triparentale Kreuzungsexperimente (2.2.1.6) ausgewählt, um nachweisen zu können, dass diese Stämme konjugative Elemente besitzen. Als mobilisierbares Plasmid wurde pVA-GFP in *E. faecalis* OG1X verwendet. Dieses Plasmid beinhaltet den pIP501 Transferursprung (*oriT*) und das *gfp* Gen, das unter der Kontrolle des *nisA* Promotors steht (Arends, 2010). Als Rezipient diente *L. lactis* UW4127RF. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.21 dargestellt. Die Mobilisierungsraten wurden als Anzahl der Transkonjuganten pro Rezipient bestimmt.

**Tab. 3.21: Mobilisierungsraten der LAB Stämme**

| Donor I (DI) | Donor II (DII) | Rezipient (R) | Verhältnis DI:DII:R | Mobilisierungsrate |
|---|---|---|---|---|
| LAB18 | *E. faecalis* OG1X pVA-GFP | *L. lactis* UW4127RF | 1:1:2 | $3{,}8\times10^{-7}$ |
| | | | 1:1:10 | $8{,}1\times10^{-6}$ |
| LAB21 | | | 1:1:2 | $3{,}0\times10^{-6}$ |
| LAB26 | | | 1:1:2 | $3{,}7\times10^{-6}$ |

Die drei LAB Stämme konnten erfolgreich das Plasmid pVA-GFP in den Rezipienten übertragen. Damit konnte bewiesen werden, dass diese Stämme mindestens ein konjugatives Element besitzen. Die Mobilisierungsraten lagen bei allen Stämmen im $10^{-6}$ Bereich. LAB18 erreichte eine bessere Mobilisierungsrate bei einem Zellzahl-Verhältnis von 1:1:10 (DI:DII:R), die $8{,}1\times10^{-6}$ im Vergleich zu $3{,}8\times10^{-7}$ (1:1:2) betrug. Das mobilisierbare Plasmid pVA-GFP konnte durch Antibiotikaselektion, GFP-Expression (Abb. 3.22) und Fluoreszenzmikroskopie sowie *gfp* spezifische PCR in den *L. lactis* UW4127RF Transkonjuganten nachgewiesen werden (Knittel, 2010).

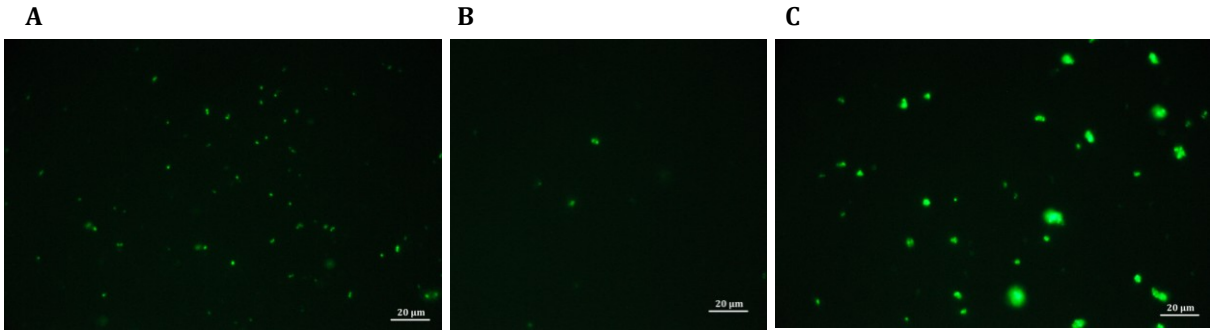



**Abb. 3.22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *L. lactis* UW4127RF (pVA-GFP) nach Induktion mit Nisin (100 ng·mL$^{-1}$)**
**A**: Transkonjuganten aus dem Mating mit LAB18
**B**: Transkonjuganten aus dem Mating mit LAB21
**C**: Transkonjuganten aus dem Mating mit LAB26

### 3.3.4 Identifizierung der LAB Stämme mittels 16S rDNA-Sequenzierung

Die 16S rDNA Sequenzierung ist das bekannteste Verfahren für die phylogenetische Einordnung von Bakterien. Die ribosomale DNA, die für die ribosomale RNA kodiert und in allen Lebewesen vorhanden ist, enthält konservierte, variable und hoch variable Regionen, die eine Bakterienidentifizierung anhand ihrer DNA-Sequenz möglich machen. Unbekannte Sequenzen können somit mit bereits sequenzierten und bekannten Bakterienstämmen in einer Datenbank verglichen werden. Die bekannteste Datenbank ist die *NCBI GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Weitere Datenbanken wie das *Ribosomal Database Project* (RDP; http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp) und *Comprehensive Ribosomal RNA Databases* (SILVA; http://www.arb-silva.de/) sind auf Sequenzen ribosomaler Gene spezialisiert. Die *RIDOM* Datenbank (*Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms*; http://rdna.ridom.de/) wurde speziell für die klinische Diagnostik pathogener Mikroorganismen entwickelt (Harmsen *et al*., 2002).
Von ausgewählten LAB Stämmen (41) wurde eine Gesamt-DNA Isolierung durchgeführt (2.2.2.6) und die isolierte Gesamt-DNA für die 16S rDNA PCR eingesetzt. Die erhaltenen PCR Produkte wurden von der Firma MACROGEN (Seoul, Südkorea) sequenziert und die doppelsträngigen Sequenzen mit Hilfe der BioNumerics Software (Applied Maths NV, Belgien) zusammengefügt. Diese Sequenzen wurden mit der *NCBI GenBank* mittels *Nucleotide BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.22 zusammengefasst. Die Sequenzierungen der LAB Stämme 2, 10, 13, 27, 54, 75, 84 und 97 müssen wiederholt werden, da nicht

genügend Sequenzinformationen für eine eindeutige Identifizierung erhalten werden konnten.

**Tab. 3.22: Identifizierung der LAB Stämme**

| Stamm | BLAST | Identität [bp/bp;(%)] | Genotyp[a] |
|---|---|---|---|
| LAB5 | *L. plantarum* NWL44 | 1113/1119 (99%) | *tet*M, pSMA23-Relaxase |
| LAB11 | *P. acidilactici* strain L94 | 1210/1219 (99%) | *pre*$_{pSK41}$, *nes*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traG* |
| LAB14 | *L. plantarum* IMAU20014 | 638/648 (99%) | pSMA23-Relaxase, *trsK*, *traE* |
| LAB15 | *L. plantarum* strain AB13 | 1181/1187 (99%) | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE* |
| LAB16 | *L. plantarum* strain UB9 | 1071/1073 (99%) | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE*, *orf5*, *orf7* |
| LAB17 | *L. plantarum* subsp. *plantarum* AB13 | 1211/1211 (100%) | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE* |
| LAB18 | *P. pentosaceus* PP | 971/989 (98%) | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE*, *traG*, *orf7* |
| LAB19 | *L. plantarum* subsp. *plantarum* UB9 | 1193/1217 (98%) | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *traE*, *orf7* |
| LAB20 | *P. pentosaceus* PP | 1178/1182 (99%) | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *traE* |
| LAB21 | *P. pentosaceus* PP | 1165/1165 (100%) | *van*C1/2, pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE* |
| LAB22 | *P. acidilactici* L169 | 1149/1153 (99%) | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE*, *orf5* |
| LAB23 | *P. acidilactici* L94 | 1246/1253(99%) | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK*, *traE*, *orf5* |
| LAB24 | *P. acidilactici* L94 | 1205/1208(99%) | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *orf5* |
| LAB25 | *P. acidilactici* L94 | 1232/1232 (100%) | *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase |
| LAB26 | *P. pentosaceus* PP | 1228/1247 (98%) | pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, *trsE*, *trsK*, *traE* |
| LAB28 | *P. acidilactici* L94 | 1166/1173 (99%) | pSMA23-Relaxase, *traG* |
| LAB29 | *P. acidilactici* L169 | 989/1003 (98%) | pSMA23-Relaxase, *traG* |
| LAB43 | *L. brevis* NWL53 | 1215/1217 (99%) | *van*C1/2, pLTK13-Relaxase, pSMA23-Relaxase, *trsK* |
| LAB45 | *P. acidilactici* L94 | 1213/1215 (99%) | *van*C1/2, pRS01-Relaxase, pSMA23-Relaxase |
| LAB57 | *L. rhamnosus* NM94-5 | 1190/1192 (99%) | *aph2-Ic*, pSMA23-Relaxase |
| LAB58 | *L. plantarum* IMAU10124 | 1222/1222 (100%) | *erm*G, pLTK13-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase, *trsE*, *trsK* |
| LAB66 | *L. rhamnosus* NM94-5 | 1115/1115 (100%) | *erm*B, *erm*G, pJS42-Relaxase, *pre*$_{pSK41}$, pSMA23-Relaxase |
| LAB72 | *L. rhamnosus* NM94-5 | 1192/1192 (100%) | *erm*B, pJS42-Relaxase, pSMA23-Relaxase |
| LAB77 | *L. rhamnosus* NM94-5 | 1209/1209 (100%) | *erm*B, pSMA23-Relaxase |
| LAB79 | *E. durans* HJ6 | 1111/1111 (100%) | *erm*B, pSMA23-Relaxase |
| LAB82 | *P. acidilactici* L169 | 1123/1129 (99%) | pK214-Relaxase |
| LAB85 | *P. acidilactici* L94 | 1078/1081 (99%) | pSMA23-Relaxase |
| LAB86 | *P. acidilactici* L94 | 1125/1127 (99%) | pSMA23-Relaxase |
| LAB87 | *P. acidilactici* L94 | 1189/1191 (99%) | pLTK13-Relaxase, pSMA23-Relaxase |
| LAB89 | *L. plantarum* subsp. *plantarum* UB9 | 1222/1222 (100%) | *aph3-III*, pSMA23-Relaxase |
| LAB92 | *P. acidilactici* L94 | 1195/1195 (100%) | pSMA23-Relaxase |
| LAB93 | *P. acidilactici* L94 | 1212/1212 (100%) | pSMA23-Relaxase |
| LAB95 | *P. acidilactici* L94 | 1165/1167 (99%) | pLTK13-Relaxase, pSMA23-Relaxase |

[a]*aph2-Ic*: Gentamycin; *aph3-III*: Kanamycin; *erm*: Erythromycin; *tet*: Tetracyclin; *van*: Vancomycin; n.d: nicht detektiert; sp: species; subsp: subspecies

Durch die Vergleiche mit *GenBank* konnten von den 33 LAB Stämmen 19 *Pediococcus*, 13 *Lactobacillus* und ein *Enterococcus durans* identifiziert werden. Die 19 Pediokokken Stämme unterteilen sich in zwei Spezies, *P. pentosaceus* und *P. acidilactici.* Als *P. pentosaceus* wurden vier LAB Stämme identifiziert, nämlich LAB18, LAB20, LAB21 und

LAB26. Die restlichen 15 LAB Stämme gehören der Spezies *P. acidilactici* an. Darunter vertreten ist der Stamm 22, der sieben Transfergene beinhaltet, unter anderem das Gen für die pLTK13-Relaxase und die Transfergene *trsE* und *trsK*. Die drei Stämme LAB18, LAB21 und LAB26, die ein konjugatives Plasmid beinhalten sowie LAB20 wurden als *P. pentosaceus* identifiziert. Diese Stämme sind aus Wurstwaren isoliert worden. *Pediococcus* und *Lactobacillus* Spezies werden für die Fermentation von Wurstwaren und Käse verwendet (Scott and Sullivan, 2008). *P. acidilactici* Stämme dienen auch als Starter-Kulturen für fermentierte Wurst- und Gemüsewaren. In den drei Stämmen, die konjugative Plasmide enthalten, wurden u. a. die Gene für die pLTK13-Relaxase sowie die Transfergene *trsE* und *trsK* nachgewiesen. Das *trsK* Gen konnte in LAB20 nicht nachgewiesen werden. Die Transfergene *trsE* und *trsK* sind auf den *Lactobacillus* Plasmiden plca36, pLgLA39, Contig2 (14,1 kb; Teilsequenz eines Plasmids aus *L. paracasei* NFBC338) und pWCFS103 (36 kb; *L. plantarum* WCFS1) kodiert (Desmond *et al*., 2005; Van Kranenburg *et al*., 2005; Ito *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2008). In den Plasmiden plca36 und pLgLA39 ist außerdem das Gen für die pLTK13-Relaxase kodiert. Das Plasmid plca36 stamm aus *L. casei* Zhang, das aus *Kumys* (natürlich vergorene Stutenmilch) isoliert wurde. Das Plasmid pLgLA39 wurde aus *L. gasseri* LA39 isoliert, einem Bewohner des menschlichen Magen-Darm-Trakts (Ito *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2008). Die Wahrscheinlichkeit liegt nahe, dass es sich in den *Pediococcus* Stämmen 18, 20, 21, 22 und 26 um plca36 oder pLgLA39 ähnliche Plasmide handelt, die aus *Lactobacillus* Spezies stammen. Nur aus LAB20 und 21 konnten keine großen Plasmide isoliert werden. Diese beiden Stämme besitzen auch ein sehr ähnliches Plasmidprofil (Daten nicht gezeigt; Knittel, 2010). Nur für pLgLA39 und pWCF103 konnte der Plasmidtransfer innerhalb *Lactobacillus* Spezies bestätigt werden. Der Plasmidtransfer nach *Pediococcus* Spezies wurde nicht untersucht (Ito *et al*., 2009; Van Kranenburg *et al*., 2005).

In den Stämmen LAB43 und LAB58 wurden auch die Gene für die pLTK13 Relaxase und *trsK* detektiert, in LAB58 zusätzlich noch das *trsE* Gen. Beide Stämme wurden als *Lactobacillus* Spezies identifiziert; LAB43 als *L. brevis* und LAB58 als *L. plantarum*. In diesen Stämmen könnten auch plca36 oder pLgLA39 ähnliche Plasmide vorkommen. In beiden Stämmen konnten zusätzlich Resistenzgene detektiert werden, in LAB 43 das Vancomycin-Resistenzgen *van*C1/2 und in LAB58 das Erythromycin-Resistenzgen *erm*G. Aus diesen Stämmen wurden keine Plasmide isoliert. Die Vancomycin-Resistenzgene

*van*C1 und *van*C2 sind in *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* auf dem Chromosom lokalisiert. Ob diese Gene auf einem mobilen genetischen Element kodiert sind, ist nicht bekannt (Werner *et al*. 2008). Das Resistenzgen *ermG* ist auch in *Lactobacillus* Spezies detektiert worden (Roberts, 2008). In den LAB Stämmen 21 (*P. pentosaceus*) und 45 (*P. acidilactici*) wurde auch das *van*C1/2 Gen detektiert. In LAB45 ist noch das Gen für die pRS01-Relaxase nachgewiesen worden. Diese Relaxase ist auf dem Chromosom und Plasmid pF1430 (59,5 kb) aus *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 sowie dem konjugativen Plasmid pRS01 (48,4 kb) aus *L. lactis* subsp. *lactis* ML3 kodiert (Mills *et al*., 1998). Aus LAB45 konnte ein großes Plasmid (>20 kb) isoliert werden. Bei diesem Plasmid handelt es sich wahrscheinlich um ein pRS01 ähnliches Plasmid. Dieser Stamm sollte auf weitere pRS01 Transfergene untersucht werden.

Insgesamt konnten acht Stämme als *L. plantarum* identifiziert werden (LAB5, 14, 15, 16, 17, 19, 58 und 89). In LAB5 wurde das *tet*M und in LAB89 das *aph3-III* Resistenzgen nachgewiesen. Beide Stämme kodieren für das Gen pSMA23-Relaxase. Das *tet*M Gen konnte in *L. paracasei* Stämmen auf dem konjugativen Transposon Tn*916* oder auf dem Plasmid pMD5057 aus *L. plantarum* 5057 nachgewiesen werden (Devirgiliis *et al*., 2009; Danielsen, 2002). LAB5 wurde keiner Plasmidisolierung unterzogen, so dass keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob es sich hier um ein Plasmid handelt. Die pSMA23-Relaxase ist auf dem 3,5 kb Plasmid pSMA23 aus *L. casei* A23 codiert (Sudhamani *et al*., 2008). Diese Relaxase ist auf drei weiteren LAB Plasmiden kodiert; p141 (3,6 kb; nicht publiziert) aus *L. plantarum*, pRS4 (kryptisch, 3,55 kb) aus *P. pentosaceus* RS4 und pLC88 (3,5 kb) aus *L. casei* (Alegre *et al*., 2005). Aus LAB89 konnten nur kleinere Plasmide (2-5 kb) isoliert werden, so dass es sich in diesem Stamm und bei LAB5 um eines dieser pSMA23 ähnlichen Plasmide handeln könnte. Das *aph3-III* Resistenzgen kommt überwiegend mit anderen Aminoglykosid-Resistenzgenen (*aadE*) oder anderen Antibiotika-Resistenzgenen, wie *erm*B und *tet*M auf Transposons verbunden vor. Diese Transposons können ins Chromosom oder in Plasmiden integriert vorkommen (Vakulenko and Mobashery, 2003). Wiederholung der PCR mit Plasmid-DNA, die rein von chromosomaler DNA ist, würde Aufschluss über das Vorhandensein des *aph3-III* Resistenzgens geben.

Die *L. plantarum* Stämme 14, 15, 16, 17 und 19 beinhalten mehr als zwei Transfergene. In LAB14 konnten die Gene für die pSMA23-Relaxase, *trsK* und *traE* detektiert werden. In LAB15 wurden die Gene für drei Relaxasen (pLTK13-, $Pre_{pSK41}$- und pSMA23-

Relaxase) sowie das Transfergen *traE* detektiert. LAB16, LAB17 und LAB19 kodieren für die Gene der Relaxasen $Pre_{pSK41}$ und pSMA23, sowie das Transfergen *traE*. In LAB16 wurden noch die pIP501/pRE25 orthologen Transfergene *orf5* und *orf7* und in LAB19 *orf7* detektiert. Aus allen diesen Stämmen konnten große (>20 kb) sowie kleine Plasmide (<20 kb) isoliert werden (Tab. 3.20). Das Gen für die pSMA23-Relaxase deutet auf die Plasmide pSMA23, p141, pRS4 und pLC88 hin. In den Stämmen wurden noch die pSK41/pGO1 orthologen Transfergene *traE* und $pre_{pSK41}$ detektiert. Die *traE* Primer können auch an das konjugative Plasmid pMRC01 aus *L. lactis* binden, so dass es sich bei den Plasmiden mit dem *traE* Gen auch um pMRC01-ähnliche Plasmide handeln könnte. Es könnte sich um Derivate der pSK41/pGO1 Plasmidfamilie handeln da keine Resistenzgene sowie Transfergene wie *traG* und *traK* detektiert werden konnten. Die pLTK13 Relaxase ist auf dem 33,5 kb großen Plasmid pLTK13, das aus *L. plantarum* L137 isoliert worden war, kodiert und ist in drei weiteren Plasmiden vorhanden; pLgLA39 (konjugativ; 33,3 kb) aus *L. gasseri* LA39, plca36 (36,5 kb) aus *L. casei* Zhang und pLR002 (31,5 kb) aus *L. rhamnosus* HN001 (Ito *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2008; Kim *et al*., 2008). Da keine plca36/pLgLA39 ähnlichen Transfergene (*trsE* und *trsK*) detektiert werden konnten, könnte es sich um ein pLTK13 oder pLR002 ähnliches Plasmid handeln. Die pIP501/pRE25-typischen Transfergene *orf5* und *orf7* könnten auf pIP501/pRE25 ähnlichen Plasmiden kodiert sein. Die Resistenzgene *erm*B und *aph3-III* konnten in den Stämmen nicht detektiert werden. Auf $cat_{pIP501}$ wurden die Stämme nicht untersucht, da der Phänotyp dieser Stämme Resistenz gegenüber Chloramphenicol nicht aufweist.

Weitere vier *Lactobacillus* Stämme wurden als *L. rhamnosus* (LAB57, 66, 72, und 77) und ein Stamm als *L. brevis* (LAB43) identifiziert. In drei *L. rhamnosus* Stämmen (66, 72, 77) wurde das *erm*B Resistenzgen detektiert, *L. rhamnosus* 66 enthält zusätzlich noch *ermG*. Roberts (2008) berichtete, dass *erm*B an *erm*G gekoppelt sein kann. Das *erm*B Gen wurde auch auf einem 4 kb kleinen Plasmid (pLFE1) aus *L. plantarum* M345 detektiert, dieser Stamm wurde aus Rohmilchkäse isoliert (Feld *et al*., 2009). In LAB66 und LAB72 konnten noch die Gene für die pSMA23- und pJS42-Relaxase nachgewiesen werden. Hierbei könnte es sich um kleine Plasmide handeln, da die pSMA23-Relaxase auf Plasmiden der Größe 3,5-3,6 kb kodiert ist und die pJS42-Relaxase in zwei Plasmiden, pJS42 (4,2 kb) und pRI1 (kryptisch, 6 kb) vorkommt, die aus *E. faecium* isoliert wurden (Garcia-Migura *et al*., 2008). Aus LAB66 konnten kleine Plasmide (2-5 kb) isoliert

werden. Es wurde keine Plasmidisolierung aus LAB72 durchgeführt. In LAB57 konnte das Gentamycin-Resistenzgen *aph2-Ic* nachgewiesen werden. Dieses Gen ist in *E. gallinarum*, *E. faecium* und *E. faecalis* nachgewiesen worden und konnte innerhalb und zwischen *E. faecalis* und *E. faecium* Isolaten mit einer Transferrate von $10^{-9}$ bis $10^{-2}$ übertragen werden (Donabedian *et al*., 2003).

Der Stamm LAB79 wies 100% Identität mit *E. durans* auf. In LAB79 konnten nur die Gene für die pSMA23-Relaxase sowie *erm*B nachgewiesen werden. Aus diesem Stamm wurden Plasmide isoliert, ein großes (>20 kb) und zwei kleinere, die im Größenbereich zwischen 5 und 20 kb liegen. Hierbei könnte es sich bei den kleinen Plasmiden um pSMA23 ähnliche Plasmide (3-4 kb) handeln oder um das *erm*B Plasmid pLFE1 (4 kb).

In einigen nicht sequenzierten Stämmen konnten weitere Transfergene detektiert werden. In LAB10 konnten die Gene für drei Relaxasen ($Pre_{pSK41}$, $Nes_{pSK41}$ und pSMA23) sowie die Transfergene *traE* und *orf7* detektiert werden. Resistenzgene wurden nicht nachgewiesen und es konnten nur große Plasmide (>20 kb) aus diesem Stamm isoliert werden. Bei den enthaltenen Plasmiden handelt es sich wahrscheinlich um pSK41 und pIP501 ähnliche Plasmide. Es müssten weitere PCRs mit isolierter Plasmid-DNA auf Resistenz- und Transfergene durchgeführt werden, um diese Plasmide genauer zuordnen zu können. Der Resistenzphänotyp dieses Stammes zeigte nur Resistenzen gegenüber Vancomycin und Ciprofloxacin. Die Resistenzgene *erm*B (pIP501/pRE25) und *aph3-III* (pRE25) konnten nicht nachgewiesen werden. Trotzdessen sollte dieser Stamm auf das auf pIP501 und pRE25 kodierte Resistenzgen $cat_{pIP501}$ sowie auf die auf pGO1 kodierten Resistenzgene *ble* (Bleomycin), *aadD* (Tobramycin), *aac6-aph2a* (Gentamycin) und *dfrA* (Trimethoprim) überprüft werden.

In den Stämmen LAB85, LAB86 und LAB93 wurde das Gen für die pSMA23-Relaxase detektiert. Aus LAB85 und LAB86 konnte jeweils ein kleines Plasmid isoliert werden (ca. 5 kb), aus LAB93 wurde keine Plasmidisolierung durchgeführt. Bei den kleinen Plasmiden handelt es sich wahrscheinlich um die Plasmide pSMA23, p141, pRS4 oder pLC88. In dem LAB Stamm 12 konnte zusätzlich zu dem Gen für die pSMA23-Relaxase noch das Transfergen *traG* detektiert werden. Aus diesem Stamm wurden auch zwei große (>20 kb) und drei kleinere Plasmide (<20 kb) isoliert (Abb. 3.20). In den Stämmen LAB13 und LAB27 konnten die Gene für die $Pre_{pSK41}$- und die pSMA23-Relaxase, sowie das Transfergen *orf5* nachgewiesen werden. In LAB13 ist außerdem das Transfergen *traG* und in LAB27 *traE* kodiert. Aus LAB27 konnten ein großes Plasmid (>20 kb) und

vier kleine (<20 kb) isoliert werden. In LAB13 wurden nur zwei kleine Plasmide (<20 kb) nachgewiesen. Bei den großen Plasmiden handelt es sich wahrscheinlich um pIP501/pRE25 sowie pSK41/pGO1 ähnliche Plasmide. Die kleineren Plasmide sind wahrscheinlich pSMA23 ähnlich.

# 4 DISKUSSION

## 4.1 Mobile genetische Elemente in bakteriellen ISS und Concordia Isolaten

Die ISS und Concordia Forschungsstation stellen begrenzte Habitate dar. Diese Habitate sind in Bezug auf Abfallbeseitigung und persönliche Hygiene der Crew begrenzt und erzeugen zwangsläufig eine besondere Mikroorganismenflora im Habitat. Diese Mikroorganismen stammen hauptsächlich von der Crew selbst, beinhalten aber auch Umweltmikroorganismen, die bei dem Aufbau der Stationen eingebracht wurden. Als vorherrschende Mikroflora der Luft in der Concordia Station wurden die Klassen Bacilli (43,5%) und α-Proteobacteria (17,4%) identifiziert. Die dominierenden Gruppen der Bacilli waren *Staphylococcus* (57,3% der Bacilli und 24,9% insgesamt), die von *S. hominis*, *S. capitis* und *S. epidermidis* repräsentiert wurden, sowie *Bacillus* (26,7% der Bacilli und 11,6% insgesamt), beides Gattungen der menschlichen Mikroflora (Van Houdt *et al*., 2009). In den Luftproben der ISS wurden zu 38,8% *Staphylococcus* Spezies nachgewiesen, dabei waren *S. epidermidis* und *S. auricularis* am häufigsten vertreten (Novikova *et al*., 2006). Diese vorherrschende Mikroflora der begrenzten Habitate ist mit der menschlichen Aktivität assoziiert und stellt ein Gefahrenpotential für die Besatzung der Forschungsstationen dar. Es ist seit langem bekannt, dass Stress, bedingt durch Isolation, Ernährungsumstellung sowie veränderte persönliche Hygienebedingungen das natürliche Gleichgewicht der Mikroflora stören kann und die gestresste Person dadurch empfänglicher für mikrobielle Infektionen macht. Diese Faktoren steigern das Risiko der Crew an Infektionskrankheiten durch opportunistisch pathogene Bakterien, oder durch Bakterien, die die pathogenen Eigenschaften in Folge von horizontalem Gentransfer erworben haben, zu erkranken.

Die meisten Untersuchungen der Luftkeime in Krankenhäusern, Büroräumen und Häusern befassen sich mit der Zusammensetzung der Mikroorganismenflora, aber nicht mit deren Resistenzen und Resistenzgenen sowie MGEs. In diesen Studien wurden als vorherrschende Mikroflora in den Luftkeimen von Innenräumen G+ Spezies, u. a. *Staphylococcus*, *Micrococcus* und *Bacillus* Spezies nachgewiesen. Der Ausgangspunkt dieser Bakterien ist die menschliche Haut, da sie natürliche Besiedler dieser sind (Gilbert *et al*., 2010; Tang, 2009; Van Houdt *et al*., 2009; Rintala *et al*., 2008; Bouillard *et*

*al*., 2005). Die häufigste Form der Übertragung von nosokomialen Infektionserregern in Krankenhäusern ist durch den direkten Kontakt mit infizierten Personen, den Krankenhausmitarbeitern, kontaminierten Geräten sowie Wasser und unzureichender Hygiene. Die Keimbelastung stammt hauptsächlich von Patienten und Mitarbeitern selbst. Betroffen sind vor allem immungeschwächte, ältere Patienten sowie Kinder und Neugeborene. Mittlerweile wird aber die Verbreitung und Übertragung multiresistenter Mikroorganismen über die Luft diskutiert, da in den letzten Jahren der Anteil an MRSA Infektionen, die außerhalb von Krankenhäusern erworben wurden und gesunde Menschen betreffen (CA-MRSA), anstieg (Weber *et al*., 2010; Dancer, 2008; Tang *et al*., 2006; Gastmeier *et al*., 2006).

Gandara *et al*. (2006) untersuchten das Vorkommen von *S. aureus* in der Luft von Häusern in El Paso, Texas und testeten die *S. aureus* Isolate auf Resistenzen gegenüber Ampicillin, Penicillin und Cefaclor (β-Lactam Antibiotika). Etwa die Hälfte der Isolate war resistent gegenüber Ampicillin, 60% gegenüber Penicillin und 13% gegenüber Cefaclor. In 14% der Isolate konnten Resistenzen gegen zwei Antibiotika nachgewiesen werden. Es kann in dieser Arbeit kein direkter Vergleich zu den Daten von Gandara *et al*. erhoben werden, da es sich hier um unterschiedliche Habitate handelt, ein geschlossenes (Container) sowie offenes System (Wohnhäuser). Außerdem wurde in dieser Arbeit nicht nur auf eine Antibiotikaklasse getestet, sondern auf sechs. In 12,4% der Isolate konnte Ampicillinresistenz nachgewiesen werden, und 40,7% waren resistent gegen zwei oder mehrere Antibiotika.

Gilbert *et al*. (2010) konnten *S. epidermidis*, *S. hominis*, *Bacillus* sp. und *Micrococcus luteus* als dominierende Luftkeime in Krankenhauszimmern (Québec, Kanada) nachweisen und in allen Luftproben konnten Erythromycin-Resistenzgene detektiert werden. Tetracyclin-Resistenzgene wurden nur in einigen Luftproben nachgewiesen.

Die begrenzten Habitate ISS und Concordia Station besitzen Ähnlichkeiten mit der Umgebung in Krankenhäusern, da in allen Systemen die Hauptbelastung an Keimen von den Menschen selbst stamm. Infektionsrisiko besteht hauptsächlich bei immungeschwächten Patienten sowie älteren Menschen und Kindern. Auf der ISS und Concordia Station kann das Immunsystem aufgrund von Schwerelosigkeit (ISS) und Stress (ISS, Concordia) geschwächt sein.

In dieser Arbeit wurden 116 ISS und Concordia Isolate, die den Gattungen *Staphylococcus*, *Enterococcus* und *Bacillus* angehören, auf ihren Plasmidgehalt,

Biofilmbildung, Resistenzdeterminanten sowie Transfergene aus Plasmiden G+ Bakterien untersucht. Mit Hilfe der erhaltenen Ergebnisse sollen für die Besatzung entstehende Infektionsrisiken abgeschätzt und gezielt reduziert werden, da Infektionen hervorgerufen durch Staphylokokken und Enterokokken immer schwerer mit Antibiotika zu behandeln sind. Durch das Vorhandensein mobiler genetischer Elemente und den damit verbundenen Gentransfer können multiresistente Krankheitserreger entstehen, die kaum therapierbar sind.

### 4.1.1 Antibiotikaresistenzen und Resistenzdeterminanten

Antibiotika resistente Krankheitserreger stellen ein steigendes und weltweites Problem in Krankenhäusern und in der Bevölkerung dar. Diese pathogenen Bakterien sind verantwortlich für höhere Sterberaten, längere Aufenthalte in Krankenhäusern und steigende Kosten im Gesundheitswesen. Zu den wichtigsten G+ nosokomialen Pathogenen gehören der klinisch bedeutsamste Koagulase-positive *S. aureus*, die Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) sowie Enterokokken.

*S. aureus* ist ein kommensales Bakterium, das die oberen Atemwege und die Haut besiedeln kann, bevorzugt jedoch die Nasenschleimhäute. Bis zu 30% der gesunden Bevölkerung sind Träger von *S. aureus*, so dass sie ein erhöhtes Risiko für endogene Infektionen besitzen. Die Infektionen können u. a. die Haut, Weichteile, Knochen und Atemwege betreffen. Multiresistente Stämme von *S. aureus*, wie HA-MRSA und CA-MRSA haben weltweit epidemische Ausmaße erreicht und sind die Hauptursache von schwer behandelbaren Haut- und Weichteilinfektionen (Boucher *et al*., 2010; Chambers and DeLeo, 2009; Witte *et al*., 2008). KNS sind natürliche Bewohner der menschlichen Haut und kommen auch in fermentierten Lebensmitteln, Luft, Boden sowie Tieren vor. Zu den KNS zählen u. a. *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis* und *S. saprophyticus*, die auch die häufigste Ursache von Blut- und Fremdkörper-assoziierter (Katheter, Implantate) Infektionen sind (Garza-González *et al*., 2010; Faria *et al*., 2009).

Viele Jahre glaubte man, dass Enterokokken harmlose kommensale Magen-Darm Bakterien sind. In den letzten 30 Jahren entwickelten sich Enterokokken zu den wichtigsten nosokomialen Krankheitserregern. Vor allem *E. faecalis* und *E. faecium* gehören zu den Spezies, die am häufigsten mit im Krankenhaus erworbenen Infektionen assoziiert werden, und mittlerweile sogar Resistenzen gegen das Reserveantibiotikum Vancomycin erworben haben. Enterokokken rufen komplizierte Harnwegsinfektionen,

postoperative und Katheter-assoziierte Infektionen hervor und können sogar lebensbedrohliche Septikämien auslösen. Die meisten Infektionen mit Enterokokken sind endogen, das bedeutet der Erreger gehört zur normalen Darmflora des Patienten. Enterokokken werden aufgrund von Bakteriocin-Produktion in der Lebensmittelindustrie als Schutz vor unerwünschten Keimen, wie Listerien, Clostridien und *S. aureus*, verwendet. Sie dienen auch als Starterkulturen für Käse und Wurstherstellung. Einige der Enterokokken, meist *E. faecium*, werden auch als Probiotika eingesetzt (Palmer *et al*., 2010; Fisher and Phillips, 2009; Witte *et al*., 2008).

Zu der *Bacillus cereus* Gruppe gehören u. a. *B. cereus sensu stricto* (s.s.), *B. anthracis* und *B. thuringiensis*. *Bacillus* Spezies sind Sporenbildner, so dass diese Hitzebehandlungen mit hohen Temperaturen überleben und bei niedrigen Temperaturen sich vermehren können. *B. cereus* kann u. a. Lebensmittelvergiftungen hervorrufen, die durch das hitze- und säurestabile Toxin Cereulid (Emetin-Syndrom) oder durch Enterotoxine (Diarrhoe-Syndrom) ausgelöst werden. Um die Qualität und Sicherheit von Nahrungsmitteln in der Lebensmittelindustrie zu gewährleisten, müssen die vegetativen Zellen sowie die Sporen von *B. cereus* durch Reinigung und Desinfektion abgetötet werden. *B. thuringiensis* wird als Biopestizid verwendet und *B. anthracis* verursacht Anthrax (Milzbrand) (Stenfors Arnesen *et al*., 2008).

Die Antibiotikaresistenzen in den ISS und Concordia Stämmen, die *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* und *Paenibacillus* Spezies umfassen, wurden mittels Agardiffusionstests bestimmt. Der Agardiffusionstest sollte den Resistenz-Phänotyp der Stämme bestimmen und Aufschluss darüber geben, bei welcher Antibiotikakonzentration die Stämme wachsen können oder gehemmt werden. Diese Ergebnisse wurden dann für die Kreuzungsexperimente verwendet, um die Donoren sowie Rezipienten selektieren zu können. Stämme, die bei dem Antibiotikaresistenztest einen Hemmhofdurchmesser von ≤15 mm hatten, wurden mit PCR auf die Anwesenheit der entsprechenden Resistenzgene untersucht.

Mit Hilfe des Agardiffusionstests konnten Resistenzen in 70 (61,9%) Stämmen detektiert werden, davon waren 25 (22,1%) Stämme gegen zwei Antibiotika resistent und 21 (18,6%) Stämme resistent gegen drei oder mehrere (bis zu sieben) Antibiotika. In 37 (32,7%) Stämmen konnte Erythromycinresistenz nachgewiesen werden. Erythromycin gehört zu der Gruppe der Makrolid-Antibiotika. Die Makrolid-Antibiotika-Resistenz wird in Bakterien mittels posttranskriptioneller Methylierung der 23S rRNA

durch Methyltransferasen erreicht. Die Methylierung der rRNA behindert die Bindung der Makrolidmoleküle an das Ribosom. Diese Methyltransferasen werden durch *erm* (*erythromycin ribosome methylation*) Gene kodiert. Bis jetzt sind 33 *erm* Gene bekannt. ErmB-Methylasen kommen u. a. in *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus* und *Lactobacillus* Spezies vor, ErmC Methylasen u. a. in *Bacillus* Spezies, Staphylokokken und Enterokokken sowie ErmD und ErmG Methylasen in *Bacillus* Spezies. ErmG Methylasen wurden auch in *Lactobacillus* und *Staphylococcus* Stämmen detektiert (Roberts, 2008; Roberts *et al.*, 1999; http://faculty.washington.edu/marilynr/). In 25 von 35 Erythromycin resistenten Stämmen konnten die Gene für die ErmB (6), ErmC (16), ErmD (6) und ErmG (4) Methylasen detektiert werden, wobei sieben Stämme jeweils zwei Erythromycin-Resistenzgene besitzen. In den restlichen 10 Stämmen ist die Erythromycinresistenz wahrscheinlich durch andere Resistenzdeterminanten kodiert, auf die in dieser Arbeit nicht getestet wurde. In den *Staphylococcus* Spezies ist häufig das Gen *erm*A auf dem Tn*554* Transposon kodiert. Das *erm*A Gen ist chromosomal lokalisiert und häufig SCC*mec* assoziiert (Jensen and Lyon, 2009). Eine weitere Resistenzdeterminante, die Resistenz gegenüber Erythromycin vermittelt und in *Staphylococcus* Spezies vertreten ist, ist *msr*A. Das Gen *msr*A kodiert für eine aktive Efflux-Pumpe, die das Antibiotikum aus der Zelle transportiert (Roberts, 2008).

In 31 (27,4%) Stämmen wurde Tetracyclinresistenz detektiert. Davon sind 23 Stämme zusätzlich Erythromycin- und 14 Kanamycin resistent. Die Tetracycline sind Breitspektrumantibiotika, die gegen eine Vielzahl von G+ und G- Bakterien und u. a. Chlamydien und Mycoplasmen wirken. Sie haben kaum Nebenwirkungen und sind wichtig in der Prophylaxe und Behandlung von *Bacillus anthracis* (Anthrax), *Francisella tularensis* (Tularämie) und *Yersinia pestis* (Pest), die als potentielle biologische Waffen gelten. Die vorteilhaften antimikrobiellen Eigenschaften dieser Antibiotika führten zu massivem Gebrauch in der Human- sowie Veterinärmedizin und als Wachstumsfördermittel in der Tierhaltung. Dies alles führte letztendlich zur Selektion resistenter Bakterien (Roberts, 2005). Mittlerweile gibt es eine dritte Generation von Tetracyclinen, die sogenannten Glycylcycline. Das Tigecyclin ist die erste Substanz dieser neuen Generation, die 2006 in der EU für die Behandlung komplizierter Infektionen zugelassen wurde. Dieses Antibiotikum umgeht aufgrund seiner Struktur, zwei Resistenzmechanismen gegenüber Tetracyclinen, die Efflux-Pumpen und die

Ribosomalen Schutzproteine. Die Wirkung erstreckt sich auf G+ Kokken einschließlich MRSA, MRSE, VRE sowie G- Bakterien (Stein and Craig, 2006).

Bis heute sind 43 *tet* Gene bekannt, die u. a. für Energieabhängige Efflux-Pumpen und für Ribosomale Schutzproteine kodieren (http://faculty.washington.edu/marilynr/). Die Resistenzgene *tet*M, *tet*O und *tet*S gehören zu den ribosomalen Schutzproteinen und *tet*K zu den Efflux-Pumpen, die die Tetracycline aus der Zelle transportieren. Diese Gene sind u. a. in *Enterococcus*, *Staphylococcus* und *Bacillus* Spezies zu finden. Das *tet*K Gen ist überwiegend auf kleinen Plasmiden der pT181-Familie kodiert. Diese können alleine, in das Chromosom (SCC*mec* Elemente) oder andere Plasmide (pJ3358, *S. aureus*) integriert, vorkommen. Die pT181-Familie kann außer *tet*K noch *tet*L oder andere *tet* Resistenzgene tragen (Dorsch, 2007; Chopra and Roberts, 2001). Das Resistenzgen *tet*M, *erm*B und *aph3-III* werden oft auf Transposons der Tn*916*-Tn*1545* Familie gefunden. Die Gene *tet*S und *tet*O kommen in konjugativen Plasmiden (in dieser Form selbst übertragbar) oder im Chromosom vor, aus dem sie nicht selbst übertragbar sind (Soge *et al*. 2008; Chopra and Roberts, 2001; Rice 1998). In 21 Stämmen wurden die Resistenzgene *tet*M, *tet*K und *tet*O detektiert. In zehn *E. faecalis* Stämmen wurde das *tet*M Gen neben $cat_{pIP501}$ detektiert, und in einem sogar zusätzlich das Gen *tet*O (*E. faecalis* 79). Einige Stämme tragen zusätzlich noch die Resistenzgene *erm*B und/oder *aph3-III*. In den *Staphylococcus* Stämmen wurde überwiegend *tet*K detektiert, in *S. epidermidis* 55 wurden *tet*K und *tet*M nachgewiesen. In zehn Stämmen sind keine der genannten Tetracyclin-Resistenzgene detektiert worden. Bei der Vielfalt an unterschiedlichen Genen ist es wahrscheinlicher, dass diese Stämme andere Resistenzdeterminanten besitzen, auf die hier nicht getestet wurde. In *Staphylococcus* verbreitet sind u. a. noch die Gene *tet*L, *tet*S, *tet*U und *tet*W. In *Bacillus* Spezies findet man u. a. die Gene *tet*K, *tet*L, *tet*M und *tet*W aber nicht *tet*S und *tet*O (Roberts, 2008; Chopra and Roberts, 2001).

In 22 (19,5%) Stämmen wurde Chloramphenicolresistenz nachgewiesen. Das Antibiotikum Chloramphenicol wurde 1947 aus *Streptomyces venezuelae* isoliert und besitzt einen breiten Wirkbereich. Seit 1960 sind bei einigen Menschen schwere Nebenwirkungen aufgetreten, so dass die Verabreichung dieses Antibiotikums auf Ausnahmefälle, wie z. B. lebensbedrohliche Infektionen (Meningitis) bei Penicillin-Allergien, beschränkt ist. In Entwicklungsländern wird Chloramphenicol aber weiterhin als Standard-Therapie bei Meningokokken-Meningitis verabreicht. Bakterielle Resistenz

gegen Chloramphenicol wird durch enzymatische Inaktivierung (Acetylierung) des Antibiotikums mittels Chloramphenicol Acetyltransferasen (*cat*) gesteuert. Die *cat* Gene, die im Allgemeinen in *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Enterococcus,* sowie *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* und *L. reuteri* gefunden wurden, repräsentieren die drei Gruppen der *cat* Gene A7 bis A9. Die Prototyp-Plasmide dieser Gruppen sind pC221 ($cat_{pIP501}$; A7), pSCS7 ($cat_{LM}$; A8) und pC194 ($cat_{pC194}$; A9). Die *cat* Gene der Gruppen A7 bis A9 sind überwiegend auf kleinen Multicopy-Plasmiden zu finden, die das *cat* Gen alleine oder in Verbindung mit Streptomycin oder Makrolid-Resistenzgenen tragen. In wenigen Fällen wurden die *cat* Gene auf Multiresistenz-Plasmiden (pIP501 und pRE25; A7) oder konjugativen Transposons (Tn*1311*, Tn*Ss1*; A9) gefunden (Jensen and Lyon, 2009; Schwarz *et al*., 2004). In 29 Stämmen konnten die Resistenzdeterminanten $cat_{pIP501}$, $cat_{LM}$, $cat_{pC194}$ nachgewiesen werden, davon tragen 18 Stämme $cat_{pIP501}$, acht Stämme $cat_{pC194}$ und vier Stämme $cat_{LM}$. In 19 Stämmen konnten neben den *cat* Genen noch andere Resistenzgene, wie *aph3-III*, *erm*B, *erm*C, *erm*D, *erm*G, *aac6-aph2a*, *mec*A, *tet*K und *tet*M detektiert werden.

In 16 (14,2%) Stämmen wurde Oxacillinresistenz festgestellt, neun Stämme davon sind auch resistent gegenüber Ampicillin. Methicillin wurde durch Oxacillin ersetzt, da es stabiler und verträglicher ist. Beim Agardiffusionstest wird mittlerweile das Antibiotikum Cefoxitin empfohlen, da es ein besserer Induktor des *mec*A Gens und sensitiver sowie spezifischer als Oxacillin ist. Für die Methicillinresistenz ist das *mecA* Gen verantwortlich und gehört zum mobilen genetischen Element, das in allen MRSA Stämmen im Chromosom zu finden ist, der genomischen Insel SCC*mec*. Es werden mittlerweile neun Hauptgruppen und mehrere Untergruppen der SCC*mec* Elemente unterschieden (David and Daum, 2010; Queck *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2009). Nur in *S. capitis* subsp*. capitis* 61 wurde das Gen für *mec*A neben den Genen für die pT181- und $Pre_{pSK41}$-Relaxasen, *erm*C, und $cat_{LM}$ detektiert. In einigen SCC*mec* Elementen der Gruppe II und III sind die Gene *mec*A, *erm*A sowie die Plasmide pT181 (Relaxase, *tet*K) und pUB110 ($Pre_{pSK41}$-Relaxase, *aadD*, *ble*) integriert. In diesem Fall sollten weitere Primer entwickelt werden, um das SCC*mec* Element und die Plasmide in *S. capitis* subsp*. capitis* 61 näher zu charakterisieren, da aus diesem Stamm ein großes Plasmid (ca. 38 kb) und mehrere kleine Plasmide (<20 kb) isoliert wurden (Abb. 3.6). Dieser Stamm ist auch Ampicillin resistent, so dass auf das Gen *blaZ* getestet werden sollte, da dieses Gen auf dem Tn*552* Transposon kodiert ist, das im Chromosom und auf *Staphylococcus*

Multiresistenz Plasmiden, wie pSK4 (35 kb), pI524 (32 kb) und pI258 (28 kb) vorkommen kann (Jensen and Lyon, 2009; Firth and Skurray, 2006). *S. capitis* gehört zu den Koagulase-negativen *Staphylococcus* Spezies und ist ein natürlicher Bewohner der menschlichen Haut, hauptsächlich Kopfhaut und Stirn. In einigen klinischen *S. capitis* Isolaten konnte das *mec*A Gen nachgewiesen und der SCC*mec* Typ bestimmt werden (Garza-González *et al*., 2010).

In allen anderen Stämmen konnte das *mec*A Gen nicht detektiert werden. Mittlerweile sind auch Methicillin resistente *S. aureus* Stämme bekannt, die das *mec*A Gen nicht besitzen. Die Resistenz wird mit Überproduktion von β-Laktamase Enzymen erklärt, die eine geänderte Bindekapazität aufweisen. Ob diese klinisch relevant sind, ist nicht näher erforscht (Forbes, 2009).

In 13 (11,5%) Stämmen konnte Vancomycinresistenz nachgewiesen werden. Vancomycin wird bei Infektionen im Falle einer Resistenz oder Allergie gegenüber anderen Antibiotika verabreicht, die durch Enterokokken und Staphylokokken verursacht wurden. Erworbene Vancomycinresistenz wird genotypisch und phänotypisch in verschiedene Arten unterteilt. In Enterokokken sind VanA-, VanB-, VanC-, VanD-, und VanE-Resistenztypen bekannt. Klinisch relevant sind nur der VanA- und in geringerem Umfang der VanB-Resistenztyp. VRE (Vancomycin resistente Enterokokken) vom VanA-Typ zeichnen sich durch „*high level*" Resistenz (minimale Hemmkonzentration; MHK 16-1000 $\mu g \cdot mL^{-1}$) gegenüber Vancomycin und Teicoplanin aus, VRE vom VanB-Typ sind sensitiv gegenüber Teicoplanin und variabel in ihrer Resistenz gegenüber Vancomycin (MHK 4-32 $\mu g \cdot mL^{-1}$). *E. gallinarum* (*van*C1) und *E. casseliflavus* (*van*C2) sind natürlich Vancomycin resistent und werden als VanC-Resistenztyp bezeichnet (MHK 2-32 $\mu g \cdot mL^{-1}$) (Werner *et al*., 2011, 2008). In Staphylokokken ist bis jetzt nur der VanA-Resistenztyp nachgewiesen worden (Courvalin, 2006; Périchon and Courvalin, 2009). Ein Beispiel hierfür ist das pLW1043 Plasmid aus *S. aureus*, das neben *van*A (Tn*1546*) auch *aac6-aph2a* und andere Resistenzgene trägt (Weigel *et al*., 2003). Mittels Southern Hybridisierung konnte in drei *Staphylococcus* Spezies das *van*B Gen detektiert werden, in *S. hominis hominis*/*novobiosepticus* 114 und *S. hominis* subsp. *hominis* 124 und 137 (Concordia). Das *van*B Gen ist auf Transposons (Tn*1547*, Tn*1549*, Tn*5382*-ähnlich und Tn*vamp*) kodiert und konnte in *Enterococcus* und *Streptococcus* Spezies sowie anaeroben G+ Bakterien (*Clostridium* sp., *Eggerthella lenta* und *Ruminococcus* sp.) nachgewiesen

werden (Werner *et al*., 2011, 2008; Ballard *et al*., 2005). In den zehn anderen Vancomycin resistenten Stämmen konnten die Vancomycin-Resistenzgene *van*A, *van*B und *van*C1/2 nicht nachgewiesen werden.

In 17 (15%) Stämmen wurde Kanamycinresistenz detektiert. Das *aph3-III* Resistenzgen vermittelt Resistenzen gegenüber Kanamycin und Neomycin und kommt u. a. in Staphylokokken und Enterokokken vor. Dieses Gen ist auf Transposons und Insertionselementen kodiert und kann im Chromosom oder Plasmiden vorkommen. Das *aph3-III* Resistenzgen ist häufig mit anderen Aminoglykosid-Resistenzgenen (*aadE*) assoziiert, oder mit anderen Antibiotika-Resistenzgenen auf Transposons kodiert (Bsp.: Tn*1311*, zusätzliche Gene *erm*B, $cat_{pC194}$). Ein weiteres Aminoglykosid-Resistenzgen ist das *aadD*, das Resistenzen gegenüber Kanamycin, Amikacin, Tobramycin, Dibekacin und Isepamicin vermittelt. Dieses Gen ist Plasmid kodiert (pUB110) und häufig in große Plasmide wie auch SCC*mec* Elemente integriert (Jensen and Lyon, 2009; Vakulenko and Mobashery, 2003). In allen *E. faecalis* Stämmen, *S. epidermidis* 66 und *B. firmus* 27 konnte das *aph3-III* Resistenzgen detektiert werden. Das *aadD* Gen wurde in nur einem Stamm detektiert, *S. aureus* 47.

Das „*high-level*" Gentamycin-Resistenzgen (*aac6-aph2a*) ist verantwortlich für Resistenzen gegenüber allen Aminoglykosid-Antibiotika außer Streptomycin. Dieses Gen ist in den meisten Gentamycin resistenten Enterokokken, Streptokokken und Staphylokokken Plasmid kodiert und neben transponierbaren Elementen auf Plasmiden (u. a. pSK41, pGO1, pLW1043, pSK1, pTEF1) lokalisiert, die strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Transposon Tn*4001* haben, das ursprünglich in *S. aureus* gefunden wurde (Casetta *et al*., 1998). In zwei *S. epidermidis* Stämmen (49, ISS; 124, Concordia) wurde das *aac6-aph2a* Resistenzgen detektiert. In *S. epidermidis* 124 konnten zusätzlich die Resistenzgene $cat_{pC194}$ und *erm*D und in *S. epidermidis* 49 das Resistenzgen $cat_{pIP501}$ detektiert werden.

In Anbetracht der großen Anzahl an Resistenzgenen, die in der Literatur für G+ Bakterien bis jetzt beschrieben wurden, konnte in dieser Arbeit nur ein gewisser Anteil berücksichtigt werden. Insgesamt wurden 15 unterschiedliche Resistenzgene aus sechs Antibiotikaklassen in den Isolaten nachgewiesen. Die wenigsten Resistenzgene konnten in den *Bacillus* und *Paenibacillus* Isolaten detektiert werden, da die Primer zur Detektion von Antibiotika-Resistenzgenen auf der Basis von Genen, die hauptsächlich in Staphylokokken und Enterokokken vorhanden sind, entwickelt wurden. Diese beiden

Gattungen waren zu 75,2% in den ISS und Concordia Isolaten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, vertreten, und unterteilen sich in 64,6% Staphylokokken und 10,6% Enterokokken.

### 4.1.2 Plasmide und Transfergene in den ISS und Concordia Isolaten

Plasmide gehören zu den mobilen genetischen Elementen, auf denen sehr häufig Antibiotika-Resistenzgene, Toxingene, Schlüsselgene für den Gentransfer, Virulenzfaktoren sowie Gene für besondere Stoffwechselwege und Abbaureaktionen kodiert sind. Diese Gene verschaffen den Bakterien Selektionsvorteile oder die Möglichkeit besondere Habitate zu besiedeln.

Aus 84 Stämmen konnten erfolgreich Plasmide isoliert werden. In 46 (40,7%) Stämmen konnten Plasmide detektiert werden, die größer als 20 kb sind. Bei der Plasmidisolierung spielt die vollständige Lyse der Zellen eine große Rolle. *S. aureus* Stämme sind resistent gegenüber Lysozym, so dass dieses Enzym das Peptidoglykan nicht spalten kann und deshalb Lysostaphin eingesetzt werden sollte (Bera *et al*., 2007). Unzureichende enzymatische Lyse kann durch zu viel eingesetztes Zellmaterial oder zu niedrig dosiertes Lysostaphin entstehen, da für die Lyse von Koagulase-negativen *Staphylococcus* Spezies höhere Konzentrationen an Lysostaphin benötigt werden, als für *S. aureus* (Bastos *et al*., 2010). In weiteren Versuchen sollte die Plasmidisolierung für die restlichen 35 Stämme noch einmal wiederholt und die Konzentration an Lysostaphin erhöht werden. Bei großen Plasmiden (>20 kb) handelt es sich meistens um *low-copy* Plasmide, die häufig in kleinen Kulturvolumina nicht detektiert werden können, so dass ein größerer Ansatz als 5 mL Kultur erforderlich ist. Aus den Stämmen 131, 132, 134, 135, 136 und 137 konnten auch nach mehrmaligen Wiederholungen keine Plasmide isoliert werden. In diesen Stämmen wurden nur wenige Antibiotikaresistenz- und Transfergene detektiert. Es konnte in den Stämmen 134 und 135 das Gen für die $Nes_{pSK41}$-Relaxase nachgewiesen werden, in Stamm 131 das Transfergen *orf10* sowie in Stamm 137 die Gene für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase und *van*B. Das Vancomycin-Resistenzgen *van*B kann auch im Chromosom über Transposons integriert vorkommen, so dass wahrscheinlich keine Plasmide in diesem Stamm vorhanden sind.

Durch das Vorhandensein bestimmter Transfergene und Resistenzdeterminanten kann man Rückschlüsse auf die vorhandenen mobilen genetischen Elemente ziehen. In den

ISS und Concordia Isolaten wurden hauptsächlich pSK41/pGO1 orthologe Transfergene detektiert. In den Concordia Stämmen *S. epidermidis* 55 und *Staphylococcus* sp. 98 wurden zwei dieser Gene detektiert (Pre$_{pSK41}$-Relaxase und *traK* sowie *traE*), in den ISS Stämmen *S. epidermidis* 58, *S. saprophyticus* 99, *S. lugdunensis* 100 und 101, *S. haemolyticus* 103 sowie *S. hominis* subsp. *hominis* 110 wurden vier bis sieben Transfergene nachgewiesen. In diesen Stämmen, außer 100 und 101, konnten Plasmide isoliert werden, die größer als 20 kb sind, so dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Derivate der konjugativen Plasmide aus der pSK41/pGO1 Familie handelt. Zu der pSK41/pGO1 Familie gehören zusätzlich die Plasmide pUSA03, das aus CA-MRSA stammt, pV030-8 (MRSA), pLW1043 (VRSA), pPR9 (MRSA), pGO400, pJE1 und pUW3626. Diese Plasmide verfügen über ein gemeinsames genetisches Rückgrat, unterscheiden sich aber erheblich in ihren Resistenzgenen. Diese Resistenzgene sind im Allgemeinen von mehreren Kopien der Insertionssequenz IS*257* flankiert, die eine Schlüsselrolle bei der Evolution der pSK41/pGO1 Plasmidfamilie spielt. Die Plasmide pSK41, pGO1, pJE1 und pUW3626 besitzen gemeinsam das integrierte Plasmid pUB110 (Pre-Relaxase, *aadD*, *ble*) das Tn*4001*-IS*257* Hybrid (*aac6-aph2a*), *qacC* und die Transferregion *tra*. Die Plasmide pGO1 und pJE1 besitzen zusätzlich das an unterschiedlichen Stellen integrierte Transposon Tn*4003* (*dfrA*) und pUW3626 zusätzlich das Tn*552*-ähnliche Transposon, das *blaZ* kodiert. Auf dem Plasmid pLW1043 sind Tn*4001* (*aac6-aph2a*), Tn*4003* (*dfrA*), Tn*552* (*blaZ*), *qacC* sowie Tn*1546* (*van*A) kodiert. Die Plasmide pUSA03, pV030-8, pPR9 und pGO400 kodieren zusätzlich zu der Transferregion das Resistenzgen *ileS2* („*high-level*" Mupirocinresistenz). In pUSA03 ist außerdem noch *erm*C und in pPR9 das *blaZ* Gen (Tn*552*) kodiert. Den *ileS2*-tragenden Plasmiden fehlen das integrierte Plasmid pUB110, Tn*4003*, Tn*4001* und *qacC* (Pérez-Roth *et al*., 2010; Caryl and O´Neill, 2009; Firth and Skurray, 2006; Weigel *et al*., 2003; Berg *et al*., 1998). Um die Plasmide in den ISS und Concordia Isolaten zuordnen zu können, sollten diese auf das Vorhandensein weiterer Resistenzdeterminanten wie *ble*, *blaZ*, *ileS2*, *dfrA*, sowie *qacC* getestet werden. In *S. hominis* subsp. *hominis* 110 konnten zusätzlich zu den pSK41/pGO1 orthologen Transfergenen (nes$_{pSK41}$, *traE*, *traG*, *traK*, *traM*, *traL*) die Gene für die pT181 Relaxase, das *tet*K Gen, sowie *erm*C, *erm*G und *cat*$_{pC194}$ detektiert werden. Die Gene für die pT181-Relaxase und *tet*K sind häufig auf kleinen Plasmiden wie pT181, pUSA02, pSK101 kodiert. Das Plasmid pT181 kann auch über IS*257* in Plasmiden integriert vorkommen. Beispiele hierfür sind die Plasmide pSK818

(13 kb, *dfrA*), pSTS21, pSTS22 sowie pWBG753 und SAP103A, die zusätzlich die Resistenzgene *blaZ* und *cadA* (Cadmiumresistenz) tragen. Die beiden Resistenzdeterminanten *blaZ* und *cadA* kommen sehr häufig in Multiresistenz-vermittelnden *Staphylococcus* Plasmiden vor (pI258, pSK23), die Resistenzen gegenüber β-Laktamasen (*blaZ*) und Schwermetallen (Cadmium, Kupfer, Arsen) vermitteln (Firth and Skurray, 2006). Ein weiteres Beispiel für pT181 Integration ist das Plasmid SAP014A. Dieses Plasmid besitzt neben der pSK41/pGO1 ähnlichen Transferregion die integrierten Plasmide pUB110 und pT181 sowie Tn*4001*. In *S. hominis* subsp. *hominis* 110 könnten pT181-ähnliche Plasmide vorkommen. Es kann sich hier aber nicht um ein pUSA03-pT181 Derivat handeln, aufgrund des vorhandenen *erm*C Gens in Stamm 110, da im biparentalen Mating nur das pT181-Relaxasegen übertragen wurde und nicht die Resistenzgene *erm*C und *erm*G.

In 61 (54%) Stämmen konnten Relaxasegene nachgewiesen werden, die hauptsächlich in *Staphylococcus* Plasmiden vorkommen, dabei enthalten 43 Stämme (70,5%) davon noch zusätzliche Relaxasegene und/oder Resistenzdeterminanten. Diese Stämme enthalten potentiell mobilisierbare Plasmide, die durch andere Bakterien, die zur Konjugation befähig sind mobilisiert und in der mikrobiellen Gemeinschaft weitergegeben werden können. Dies führt letztendlich zu neu erworbenen Resistenzen und zur Entstehung multiresistenter Keime.

Multiresistenzen in MRSA Stämmen (HA-MRSA) sind Folge des Erwerbs von zusätzlichen Resistenzdeterminanten innerhalb der *mec* Genkassette. In einigen SCC*mec* Elementen konnten die integrierten Plasmide pUB110 (SCC*mec* Typ II) und pT181 (SCC*mec* Typ III) sowie Tn*554*, das *erm*A kodiert (SCC*mec* Typ II und III) nachgewiesen werden. Diese integrierten Elemente vermitteln zusätzliche Resistenzen gegenüber Kanamycin, Tobramycin, Bleomycin (pUB110), Tetracyclin (pT181) und MLS-Antibiotika (*erm*A). Zusätzliche Resistenzen können durch Erwerb von Resistenzplasmiden entstehen, die selbst mehrere Resistenzgene tragen. Außerhalb des Krankenhauses erworbene MRSA Stämme (CA-MRSA) waren zunächst sensitiv gegenüber nicht β-Laktam-Antibiotika. Das SCC*mec* Typ IV Element enthielt keine zusätzlichen Resistenzdeterminanten außer *mec*A. Der in USA bekannteste CA-MRSA Stamm ist USA300 (klonale Linie ST08). In den letzten sechs Jahren konnten einige Isolate dieser klonalen Linie zusätzliche Resistenzdeterminanten wie *erm*A, *erm*C (Erythromycinresistenz), *ileS2* (Mupirocinresistenz), *tet*K und *tet*M

(Tetracyclinresistenz) erwerben. Einige dieser Resistenzgene sind auf Plasmiden, u. a. pUSA03 und pUSA02, kodiert (McDougal *et al*., 2010; Strahilevitz and Hooper, 2009; Tenover and Goering, 2009).

Die Kombinationsvielfalt der Plasmide in Staphylokokken ist enorm und durch die Mobilität von Resistenzdeterminanten, die durch Transposons, Insertionssequenzen, konjugativen Transposons sowie integrativen konjugativen Elementen (ICEs) stattfindet, werden diese Plasmide wieder neu kombiniert. Bei den Plasmiden, die in den ISS und Concordia Stämmen detektiert worden sind, könnte es sich um Derivate der pSK41/pGO1 Plasmidfamilie handeln, die sich möglicherweise durch Rekombinationsereignisse in der Zusammenstellung der Resistenzdeterminanten von den bis jetzt bekannten Plasmiden aus klinischen *S. aureus* Stämmen unterscheiden. In *S. epidermidis* 58 und *S. saprophyticus* 99 konnten Transfergene aber keine Resistenzgene nachgewiesen werden. Der Agardiffusionstest war für die neun getesteten Antibiotika negativ.

Die pIP501/pRE25 orthologen Transfergene konnten in nur vier Isolaten detektiert werden. In *E. faecalis* 77 (ISS) wurden die Gene *orf7* und *orf10*, in *E. faecalis* 80 (ISS) nur das Gen *orf7*, in *S. hominis* subsp. *hominis* 121 (Concordia) die Gene *orf1* und *orf5* und in *S. hominis* subsp. *hominis* 131 (Concordia) das Gen *orf10* nachgewiesen. Es konnten keine weiteren Transfergene mittels PCR detektiert werden. In beiden *E. faecalis* Stämmen konnten noch folgende Resistenzgene nachgewiesen werden, *aph3-III*, *erm*B, *tet*M und $cat_{pIP501}$. Die Resistenzgene *erm*B und $cat_{pIP501}$ sind auch auf den Inc18 Pheromon-unabhängigen Plasmiden pIP501 (30,6 kb) und die Resistenzgene *aph3-III*, *erm*B und $cat_{pIP501}$ auf pRE25 (50,2 kb) kodiert (Abajy *et al*., 2007; Grohmann *et al*, 2003; Schwarz *et al*., 2001). Das *tet*M Gen in *E. faecalis* RE25 (pRE25) ist auf dem Chromosom kodiert. Die detektierten Gene in den *E. faecalis* Stämmen deuten auf eine Ähnlichkeit mit pRE25 hin, es konnten aber die Gene für die Relaxase und das *virB4* homologe *orf5* nicht detektiert werden, weiterhin unterscheiden sich die Größen der Plasmide voneinander, da pRE25 50,2 kb und die nachgewiesenen Plasmide in *E. faecalis* 77 und 80 ca. 130 kb groß sind. Die Inc18-ähnlichen *van*A Plasmide pWZ909 (42,6 kb), pWZ1668 (48,4 kb) und pWZ7140 (47,3 kb) aus *E. faecalis* enthalten die komplette pIP501 Transferregion sowie das Tn*1546 van*A Transposon (Zhu *et al*., 2010). In den *E. faecalis* Isolaten 77 und 80 konnten keine *van* Gene mittels PCR detektiert werden. Lim *et al*. (2006) isolierten aus *E. faecalis* Stämmen konjugative Pheromonplasmide (pSL1

und pSL2) der Größe von 128,1 kb. Diese Plasmide tragen *ant(6)-Ia*, *aph3-III*, *erm*B, *aac6-aph2a* und *van*A Resistenzgene, die Resistenzen gegen Streptomycin, Kanamycin, Erythromycin, Gentamycin und Vancomycin kodieren. Die Transferregion dieser Plasmide wurde nicht sequenziert. Die Plasmide der *E. faecalis* Isolate sollten in weiteren Experimenten auf Virulenz- sowie Transfergene pheromonabhängiger Plasmide untersucht werden. Da der Fokus dieser Arbeit auf dem konjugativen *broad host range* Plasmid pIP501 lag, wurden diese nicht berücksichtigt. Einige Vertreter konjugativer Pheromonplasmide sind pAD1 (59,6 kb), pCF10 (67,6 kb), pTEF1 (66,3 kb; *aac6-aph2a*, *erm*B) und pTEF2 (57,6 kb) (Hirt *et al*., 2005; Paulsen *et al*., 2003; Francia *et al*., 2001). Zheng *et al*. (2009) konnten aus klinischen *E. faecalis* Stämmen konjugative Plasmide isolieren (pMG2200, 106 kb; pMG2201, 65,7 kb), die Ähnlichkeiten mit den aufgeführten Pheromonplasmiden haben. Das Plasmid pMG2200 wurde vollständig sequenziert und kodiert das *van*B Resistenzgen.

Weitere Untersuchungen der *E. faecalis* Isolate sollten durchgeführt werden, da diese Stämme Isolate aus einer Probenplatte sind und einige davon ähnlich große Plasmide besitzen, so dass es sich um möglicherweise gleiche Stämme handelt. Die Stämme unterscheiden sich nur in einigen in dieser Arbeit detektierten Resistenzdeterminanten voneinander. Ein möglicher Grund für die Unterschiede könnten die in der PCR verwendeten Lysate sein. Die mit den Zelllysaten von *E. faecalis* 77 und 80 durchgeführten PCRs auf die Transfergene *orf7* und *orf10* waren zuerst negativ, erst als diese PCRs mit den isolierten Plasmiden wiederholt wurden, konnten in *E. faecalis* 77 *orf7* und *orf10* und in *E. faecalis* 80 *orf7* detektiert werden. Eine Restriktionsanalyse der Plasmide aller *E. faecalis* Stämme könnte zeigen, ob es sich bei den Plasmiden aus einigen Stämmen um das gleiche Plasmid handelt. Weiterhin kann das Gen für die pIP501 Relaxase in den Inc18 *van*A Plasmiden nicht mit den verwendeten Primern detektiert werden, da im *reverse* Primer 10 von 20 Basen nicht mit deren Sequenz übereinstimmen. Die Relaxase aus pWZ909 stimmt in der Aminosäuresequenz zu 98% mit der pIP501 Relaxase überein. Hier sollte ein neuer *reverse* Primer anhand der Inc18 *van*A Plasmide erstellt werden, um einen größeren Bereich an Plasmiden abdecken zu können. Zu dem Zeitpunkt, als die pIP501-Typ Relaxase Primer entwickelt wurden, waren die Sequenzen dieser Inc18 *van*A Plasmide nicht bekannt.

### 4.1.3 Konjugation und Mobilisierung von Plasmiden aus ISS und Concordia Isolaten

Untersuchungen haben gezeigt, dass Mikroorganismen unter Raumfahrtbedingungen ein erhöhtes Wachstum, erhöhte Gentransfereffizienz und erhöhte Produktion von Sekundärstoffen zeigen. Weitere Untersuchungen befassten sich mit der Antibiotikawirkung auf Mikroorganismen in Raumstationen, die deutlich reduziert war. Die Mikrogravitation, Entwicklung von Kondenswasser und Akkumulation biologischer Substanzen können das Wachstum von Bakterien fördern und das Infektionsrisiko der Crew erhöhen (Horneck *et al*., 2010; Guéguinou *et al*., 2009; Matin *et al*., 2006). Die Concordia Station wurde als Modellsystem für langfristige Weltraumflüge genutzt, um die Adaption der Crewmitglieder auf Isolation und die Dynamik der Luftkeime zu untersuchen. De Boever *et al*. (2007) konnten ein Mobilisierungsexperiment unter Weltraumbedingungen auf der ISS während der Soyuz Mission 8S im April 2004 durchführen. Das erste triparentale Experiment erfolgte mit *B. thuringiensis* AND931 und dem konjugativen Plasmid pXO16 als Donor I, *B. thuringiensis* 4Q7 mit dem mobilisierbaren Plasmid pC194 als Donor II und dem Rezipienten *B. thuringiensis* GBJ002. Das zweite Experiment wurde mit *E. coli* CM140 und dem konjugativen Plasmid RP4 als Donor I, *E. coli* CM1962 mit dem mobilisierbaren Plasmid pMOL222 als Donor II und als Rezipienten *Cupriavidus metallidurans* AE815 durchgeführt. Derselbe experimentelle Aufbau verblieb als Kontrolle auf der Erde. Beim Versuchstart wurden die beiden Donoren miteinander vermischt und für 18 Stunden inkubiert. Diese wurden anschließend dem Rezipienten zugeführt und für weitere 14 Stunden inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 28°C. Die Mobilisierungsrate von pC194 in den Rezipienten lag bei $10^{-3}$, die der Kontrolle konnte nicht ermittelt werden, da keine Transkonjuganten nachgewiesen wurden, obwohl die Mobilisierung unter Laborbedingungen stattgefunden hat. Der konjugative Transfer von pXO16 in den Donor II erfolgte mit einer Transferrate von 1.0 im Vergleich zur Kontrolle, die bei $10^{-2}$ lag. Bei G- Bakterien konnte kein signifikanter Unterschied in den Transferraten zwischen dem Mating Experiment während des Weltraumfluges und dem auf der Erde verbliebenen Kontrollexperiment beobachtet werden. Ein anderer Versuch wurde mit *B. thuringiensis* GBJ002 (pAW63, pUB110) mit einem konjugativen (pAW63) und mobilisierbaren Plasmid (pUB110) als Donor und *B. thuringiensis* GBJ001 als Rezipient unter simulierter Mikrogravitation in drei unterschiedlichen Simulatoren durchgeführt. Es konnten keine

signifikanten Unterschiede in den Transfer- und Mobilisierungsraten zwischen den drei Versuchen und den Laborbedingungen festgestellt werden. Auch wenn keine Stimulation des Plasmidtransfers in der simulierten Schwerelosigkeit beobachtet werden konnte, so wurde der Plasmidtransfer auch nicht gehemmt. Weitere Untersuchungen sind notwendig um diese Beobachtungen auch unter Weltraumbedingungen nachweisen zu können (Beuls *et al.*, 2009).

Die in den ISS und Concordia Isolaten detektierten Transfergene und Resistenzdeterminanten haben eine große Ähnlichkeit mit denen auf Plasmiden der pSK41/pGO1 Familie, sowie kleineren Plasmiden aus Staphylokokken, wie pT181, pC221, pUSA02, pE194, pC194, pUB110 und pC223, die unterschiedliche Resistenzgene kodieren und *mob* Gene tragen können. Konjugativer Transfer der pSK41/pGO1 Plasmide erfolgt in der Regel mit einer Transferfrequenz von $10^{-5}$ bis $10^{-7}$ Transkonjuganten pro Donorzelle. Das Plasmid pPR9, das das Gen für die „*high-level*" Mupirocinresistenz trägt, konnte mit einer Transfereffizienz von $5\times10^{-6}$ bis $1\times10^{-7}$ pro Donorzelle übertragen werden (Pérez-Roth *et al.*, 2010; Firth and Skurray, 2006). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Transferversuchen wurde die Transferfrequenz als Anzahl der Transkonjuganten pro Rezipientenzelle ermittelt.

Die Gentransferversuche mit *S. aureus* 45 und *S. saprophyticus* 99 als Donor I, *E. faecalis* OG1X mit dem mobilisierbaren Plasmiden pMSP-*orf1*-GFP und pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP sowie *E. faecalis* JH2-2 als Rezipient wurden durchgeführt, um konjugative Elemente in diesen Stämmen nachweisen zu können. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Isolate *S. aureus* 45 und *S. saprophyticus* 99 konjugative Elemente beinhalten. Die Mobilisierungsraten von pMSP-*orf1*-GFP und pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP nach *E. faecalis* JH2-2 lagen im $10^{-8}$ Bereich. In *S. aureus* 45 konnten keine pSK41 und pIP501 orthologen Transfergene detektiert werden, so dass bis jetzt das konjugative Element nicht bekannt ist. Es konnten weiterhin keine Resistenzgene detektiert werden, die Aufschluss über das Vorhandensein eines Plasmids geben könnten. Die Mobilisierungsraten liegen in einem sehr niedrigen Bereich. Ein Grund hierfür könnten nicht optimale Mobilisierungsbedingungen sein, da Temperatur, Medium, pH-Wert, Wachstumstadium der Matingpartner sich auf das Ergebnis auswirken können. Das Zusammenspiel des Couplingprotein des konjugativen Elements mit dem Relaxosom des mobilisierbaren Plasmids ist dabei auch entscheidend. Die Plasmide pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP und pMSP-*orf1*-GFP beinhalten das pIP501 *orf1* Gen, das für die $oriT_{pIP501}$ sequenzspezifische Relaxase

(TraA) codiert und den Transferursprung *oriT*$_{pIP501}$. *S. aureus* 45 beinhaltet ein unbekanntes konjugatives Element, und *S. saprophyticus* 99 ein pSK41 ähnliches Plasmid, auf dem die Gene für die Nes$_{pSK41}$-Relaxase sowie *traE*, *traG*, *traK*, *traM* und *traL* kodiert sind. Die Relaxasen der Plasmide pSK41 (Nes) und pIP501 (TraA) gehören der MOB$_Q$ Familie an. Die Schnittstellen der Relaxasen (*nic-site*) am *oriT* liegen zwar an verschiedenen Stellen (Abb. 4.1), die Sequenzen der beiden *oriTs* unterscheiden sich aber nur in drei Basen, so dass der *oriT*$_{pIP501}$ wahrscheinlich von der Nes$_{pSK41}$-Relaxase erkannt und geschnitten wird (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009; Francia *et al.*, 2004; Grohmann *et al.*, 2003). Da beide Relaxasen im Matingexperiment zur Verfügung standen, führte dies möglicherweise zur Konkurrenz um den *oriT*$_{pIP501}$ und somit zu den niedrigen Mobilisierungsraten.

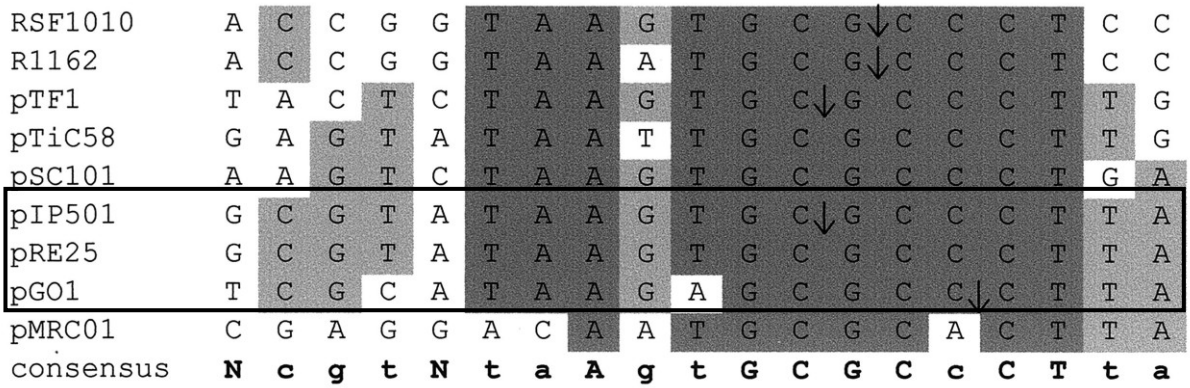



**Abb. 4.1: Alignment der *oriT nick* Regionen der RSF1010 *oriT* Familie nach Grohmann *et al.* (2003)**
Dunkelgrau unterlegt sind die konservierten Nukleotide aus acht von neun Plasmiden der RSF1010 *oriT* Familie. Nukleotide, die in fünf der neun Plasmide konserviert sind, sind hellgrau unterlegt. Die experimentell bestätigten Schnittstellen der Relaxasen sind mit Pfeilen markiert. Schwarz umrandet sind die *oriT* Regionen von pIP501, pRE25 und pGO1.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass einige Resistenzdeterminanten übertragbar sind. *S. epidermidis* 55 (pT181-, Pre$_{pSK41}$-Relaxase, *traK*, *erm*C, *tet*M, *tet*K, *cat*$_{LM}$) konnte das *erm*C Gen mit einer Transferrate von $5{,}2\times10^{-7}$ auf *E. faecalis* OG1X übertragen. In den Transkonjuganten konnte die pT181-Relaxase nicht detektiert werden, somit sind *erm*C und das Gen für die pT181-Relaxase nicht auf einem mobilen genetischen Element kodiert. Plasmid-DNA konnte aus den Transkonjuganten nicht isoliert werden. Die Transkonjuganten wuchsen nach dem Übertragen auf neue Antibiotika-haltige Platten sehr langsam. Nach drei Tagen Inkubation war sehr wenig Zellmaterial vorhanden, so dass dies wahrscheinlich der limitierende Faktor für die Plasmidisolierung war. Es konnten keine Transkonjuganten auf Tetracyclin-Platten selektiert werden. Das Tetracyclin-Resistenzgen *tet*K sowie das Gen für die pT181-

Relaxase sind wahrscheinlich auf einem mobilisierbaren Plasmid kodiert, das von dem konjugativen Element nicht mobilisiert werden kann. Ein weiter führender Versuch sollte als triparentales Mating durchgeführt werden, und *S. aureus* SK5428 (pSK41) als Helferstamm eingesetzt werden, um das pT181-ähnliche Plasmid mobilisieren zu können. Ein ähnlicher Versuch wurde mit den Stämmen *S. aureus* SK5428 (pSK41) als Donor I, *S. hominis hominis*/*novobiosepticus* 113 als Donor II und *S. aureus* RN4220RF als Rezipient durchgeführt. In Stamm 113 sind die Gene für drei Relaxasen kodiert (pT181, $Pre_{pSK41}$ und $Nes_{pSK41}$) sowie die Resistenzgene *erm*C und *tet*K. In diesem Fall konnten die Gene für die pT181-Relaxase und *tetK* in den Transkonjuganten nachgewiesen werden. Die Mobilisierungsrate betrug $4{,}7\times10^{-7}$. Die Selektion auf Erythromycin-haltigen Platten war nicht erfolgreich, somit konnte das „*erm*C-Plasmid" nicht übertragen werden. Stamm 113 sollte in biparentalen Matings eingesetzt werden, um überprüfen zu können, ob dieser Stamm tatsächlich keine konjugativen Elemente besitzt oder ob das *erm*C Gen durch ein anderes konjugatives Element übertragen werden kann, wie es bei *S. epidermidis* 55 der Fall war. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das *erm*C Gen nicht übertragbar ist (d. h. chromosomal kodiert ist). Projan und Archer (1989) konnten zeigen, dass pGO1 die Plasmide pE194 (*erm*C) und pT181 (*tet*K) nicht mobilisieren konnte. In dieser Arbeit konnte pSK41 das pT181-ähnliche Plasmid mobilisieren, nicht aber das „*erm*C-Plasmid".

Der ISS Stamm *S. haemolyticus* 103 (*traE*, *traG*, *traK*, *traM*, *erm*C und *tet*K) konnte im biparentalen Mating das „*erm*C-Plasmid" auch auf *E. faecalis* OG1X mit einer Transferrate von $3{,}4\times10^{-7}$ übertragen, obwohl keine Relaxase in diesem Stamm detektiert wurde. Relaxasen sind essentiell, da diese den konjugativen DNA Prozess initiieren und beenden (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). Wahrscheinlich besitzt dieser Stamm eine Relaxase, die nicht mit den in dieser Arbeit verwendeten Primern detektiert werden konnte. Das *erm*C Gen und das *tra*M Gen konnten nicht in allen Transkonjuganten mittels PCR nachgewiesen werden. Wahrscheinlich waren die Zellen in den Lysaten nicht vollständig aufgeschlossen, oder zu viel Zellmaterial wurde verwendet, das sich auf die PCR inhibierend auswirkte. Dieses Phänomen konnte bei einigen Lysaten beobachtet werden und bei Wiederholung mit Plasmid-DNA oder isolierter Gesamt-DNA umgangen werden. Dies erfolgte aber nicht für alle Stämme. Bei diesem Versuch wurde keine Plasmidisolierung aus den Transkonjuganten durchgeführt. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass *traM* auf einem konjugativen

Plasmid kodiert ist, und dieses nicht in alle Transkonjuganten mit übertragen wurde, sondern in dem Fall nur das voraussichtlich mobilisierbare „*erm*C-Plasmid“. In weiteren Versuchen sollte überprüft werden, ob das *tet*K Gen durch Konjugation oder Mobilisierung übertragen werden kann.

Im biparentalen Mating mit *S. hominis* subsp. *hominis* 110 und *E. faecalis* OG1X konnten Transkonjuganten auf Erythromycin selektiert werden, die *erm*C und *erm*G Resistenzdeterminanten wurden aber in diesen Transkonjuganten nicht nachgewiesen. Die PCR auf das pT181-Relaxasegen war aber positiv. Die Transferrate betrug $1{,}1\times10^{-7}$. In diesem Fall sollte der Stamm 110 auf andere Erythromycin-Resistenzgene überprüft werden. Mögliche in Staphylokokken vorkommende Gene, die Erythromycinresistenz vermitteln, sind die Gene *erm*A, *erm*33, *msr*A und *vga*A. Auch in diesem Stamm ist das pT181-Relaxasegen nicht gemeinsam mit *erm*C oder *erm*G auf einem konjugativen Element enthalten. *S. epidermidis* 55 konnte das *erm*C Gen auf *E. faecalis* OG1X übertragen, nicht aber das Gen für die pT181-Relaxase.

Die beiden Plasmide pSK41 und pGO1 konnten erfolgreich in die Stämme *S. aureus* 41 (ISS) und *S. epidermidis* 53 (Concordia) übertragen werden. Aus *S. aureus* 41 konnten keine Plasmide isoliert werden, so dass dieser Stamm als plasmidfreier Rezipienten Stamm verwendet wurde. In *S. epidermidis* 53 konnte in weiteren Versuchen ein Plasmid um 38 kb nachgewiesen und in beiden Stämmen das Gen für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase detektiert werden. Diese Relaxase ist auf pSK41, pGO1, pUB110 und anderen kleineren Plasmiden sowie in SCC*mec* Elementen durch Integration von pUB110 kodiert sowie in *Streptococcus* Spezies im Genom zu finden. Da in *S. aureus* 41 keine Plasmide und auch das *mec*A Gen nicht nachgewiesen wurden, könnte es sich entweder um *low-copy* Plasmide handeln, die auf dem Agarosegel nach Plasmid-DNA Isolierung aus 5 mL Kulturvolumen nicht erkennbar waren oder um ein ins Chromosom eingebautes Gen für die $Pre_{pSK41}$-Relaxase, das nicht mit SCC*mec* assoziiert ist. In *S. epidermidis* 53 kann es sich, obwohl die $Pre_{pSK41}$-Relaxase nachgewiesen wurde und ein großes Plasmid vorhanden ist, nicht um ein Plasmid der pSK41/pGO1 Familie handeln, da pGO1 und pSK41 erfolgreich in diesen Stamm übertragen wurden. Die Stämme *S. aureus* 41 und *S. epidermidis* 53 aus der ISS und Concordia können in weiteren Versuchen auch als Rezipienten dienen.

Unter Laborbedingungen konnte gezeigt werden, dass die Stämme *S. epidermidis* 55 (Concordia) und *S. haemolyticus* 103 (ISS) das *erm*C Resistenzgen sowie *S. hominis*

subsp. *hominis* 110 (ISS) das Gen für die pT181-Relaxase durch konjugativen Gentransfer auf *E. faecalis* OG1X übertragen können. Das pT181-ähnliche Plasmid (pT181-Relaxase, *tet*K) aus *S. hominis*/*hominis novobiosepticus* 113 konnte mit Hilfe des konjugativen Plasmids pSK41 in *S. aureus* RN4220RF mobilisiert werden. *S. aureus* 45 konnte das Plasmid pMSP-*orf1*-GFP und *S. saprophyticus* 99 das Plasmid pMSP-*orf*-$P_{nisA}$-GFP in *E. faecalis* JH2-2 mobilisieren. Die Transferfrequenzen lagen im Bereich von $10^{-7}$ bis $10^{-8}$. Dabei sollte beachtet werden, dass die Transferfrequenz in der ISS und Concordia Umgebung höher sein könnte. Wilson *et al*. (2007) untersuchten die Auswirkungen eines Weltraumfluges auf die Virulenz von *Salmonella typhimurium*. Sie stellten fest, dass die Virulenz unter Raumfahrtbedingungen sich erhöht hatte. Rosado *et al*. (2010) untersuchten die Auswirkungen simulierter Schwerelosigkeit auf das Wachstum und die Virulenz von klinischen Methicillin sensitiven *S. aureus* (MSSA) Isolaten, da unter Raumfahrtbedingungen selbst für gesunde Menschen harmlose Krankheitserreger schwere Infektionen hervorrufen können. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Expression von Virulenzfaktoren reduziert war, im Gegensatz zu den Untersuchungen von Wilson *et al*. (2007). In diesem Experiment wurde jedoch nur der Einfluss der Schwerelosigkeit untersucht und keine weiteren Faktoren, die bei einem Weltraumflug auftreten können, wie kosmische Strahlung. Diese Ergebnisse erfordern weitere Untersuchungen, um den Einfluss der Schwerelosigkeit auf die Virulenz und die Expression von Virulenzgenen pathogener Mikroorganismen zu erforschen.

## 4.2 Biofilme

Als Biofilme werden mikrobielle Aggregate wie Beläge und Flocken bezeichnet, die in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind. Sie können an allen Grenzflächen, die ausreichend Wasser enthalten, vorkommen. Die EPS bildet das Gerüst der dreidimensionalen Anordnung des Biofilms, ist für die Anheftung an Oberflächen sowie den Zusammenhalt in Biofilmen verantwortlich und erlaubt Zell-Zell-Kommunikation sowie die Entwicklung synergistischer Gemeinschaften („Mikrokonsortien“). Außerdem dient die Matrix als „Recycling-Center“, da alle Komponenten der lysierten Zellen von dieser zurückgehalten werden. Das beinhaltet auch die DNA, die ein Reservoir an Genen für den horizontalen Gentransfer darstellt. Der HGT wird durch die unmittelbare Nähe der Mikroorganismen zueinander, die hohe Zelldichte und metabolische Aktivität begünstigt, so dass Biofilme als „*hot spots*“ für den

HGT angesehen werden. Biofilme stellen komplexe und strukturierte Lebensgemeinschaften aus verschiedenen Arten von Mikroorganismen dar und als Reaktion auf unterschiedliche Umweltbedingungen weisen sie spezifische Zusammensetzungen und Aktivitäten auf (Flemming and Wingender, 2010, 2001; Sørensen *et al*., 2005). Einerseits sind Biofilme an wichtigen Stoffumwandlungen und Stoffkreisläufen in der Umwelt beteiligt, werden in diversen Reaktoren in biotechnologischen Verfahren, in Kläranlagen zur Abwasserreinigung und in der biologischen Altlastensanierung eingesetzt (Singh *et al*., 2006; Davey and O´Toole, 2000) und andererseits verursachen sie in der Industrie Verschmutzung und Korrosion, Verringern die Effizienz von Kühlkreisläufen, führen in Trinkwassersystemen und –leitungen zu Kontaminationen und stellen damit ein erhebliches gesundheitliches Risiko dar (de Carvalho, 2007; Simões *et al*., 2007; Szewzyk *et al*., 2000). Im klinischen Bereich verursachen Biofilme schwer zu behandelnde chronische Infektionen, da sie gegenüber Antibiotikabehandlung und den humoralen sowie zellulären Immunabwehrmechanismen resistenter sind, als die Mikroorganismen in der planktonischen Phase. Humane Leukozyten können in den Biofilm eindringen, sind aber nicht in der Lage, die Bakterienzellen zu phagozytieren und die Antibiotikabehandlung kann durch das Vorhandensein unterschiedlicher Wachstumsstadien der Bakterien im Biofilm wirkungslos sein, da viele Antibiotika (Penicilline, Aminoglykoside und Quinolone) in ihrer Wirkung auf wachsende Zellen angewiesen sind. Antibiotika können auch die Bildung der EPS Matrix verstärken, so dass das Eindringen ins Innere des Biofilms erschwert wird. Durch die Reduzierung der Stoffwechselaktivität der Bakterien, die durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel in den tieferen Schichten des Biofilms verursacht wird, sind diese somit vor Antibiotika geschützt (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Anderson and O´Toole, 2008). Bakterielle Biofilme findet man auch in Raumstationen. Sie verursachen starke Korrosionen an den Geräten und verstopfen die Wasseraufbereitungssysteme. Dabei ist die Schwerelosigkeit ein Stressfaktor, der zur Biofilmbildung und erhöhter Pathogenität führen kann. Die vorherrschende Mikroflora in der Raumstation steigert das Infektionsrisiko der Besatzung, da Weltraumflüge das Immunsystem der Crew schwächen und bereits kleinste Verletzungen aufgrund herabgesetzter Blutgerinnungsneigung zu schwer heilenden Wunden führen können (Rosenzweig *et al*., 2010; Ziegler, 2009; Lynch *et al*., 2006).

Die ISS und Concordia Isolate wurden mittels Mikrotiterplatten-Test auf die Fähigkeit sich an Polystyrol anzuheften, getestet. Diese Methode ist eine Standard-Methode, die zur phänotypischen Bestimmung der Biofilmbildung dient. Dabei bindet Kristallviolett an negativ geladene Oberflächenproteine und Polysaccharide in der EPS (Oliveira and Cunha, 2010; Peeters *et al*., 2008). Die Absorptionswerte der Bakterien können folgendermaßen eingeteilt werden: $OD_{570}$<0,120, keine Biofilmproduzenten; 0,120<$OD_{570}$<0,240, schwache Biofilmproduzenten; $OD_{570}$>0,240, starke Biofilmproduzenten (Di Rosa *et al*., 2006; Christensen *et al*., 1985). Nach dieser Einteilung sind 13 (11,5%) Isolate keine Biofilmproduzenten, 62 (54,9%) sind schwache Biofilmproduzenten und 36 (31,9%) sind starke Biofilmproduzenten. Für die Biofilmreaktoren wurden nicht die Stämme mit dem höchsten Absorptionswerten (>1,0) ausgewählt, da diese im Biofilmreaktor keine Biofilmbildung gezeigt hatten. Aufgrund der unterschiedlichen Aufwuchsmaterialien der Mikrotiterplatte und der Glaskugeln im Biofimreaktor konnten die Daten des MT-Plattentests nicht vollständig auf den Biofilmreaktor übertragen werden. Es wurden dann die Stämme ausgewählt, die zu den schwachen Biofilmproduzenten gezählt werden können (*S. hominis* subsp*. hominis* 110 und 137) sowie Stämme, die zu den starken Biofilmproduzenten zählen, aber im Absorptionsbereich $OD_{570}$ 0,250-0,700 liegen (*B. cereus s.l.* 1, *S. aureus* 45, *S. epidermidis* 55, *S. aureus* 67 und *S. saprophyticus* 99).

Einige der *Staphylococcus* Spezies (*S. epidermidis* 55, *S. aureus* 67, *S. saprophyticus* 99, *S. hominis* subsp*. hominis* 110) bildeten einen schleimigen und dichten Biofilm im Biofilmreaktor. Das Lektin-Bindungs Assay konnte auch zeigen, dass Poly-*N*-Acetylglukosamin (PNAG) ein Bestandteil der EPS Matrix dieser Stämme ist. Nicht in allen *S. aureus* und *S. epidermidis* Stämmen ist PNAG essentiell für die Biofilmbildung, in einigen Stämmen wird Biofilmproduktion durch spezifische Oberflächenproteine wie Bap/Bhp (*biofilm associated protein*, Bap *homologue protein*) und Aap (*accumulation associated protein*) vermittelt (Otto, 2009; Otto 2008). PNAG Produktion wird durch den *icaADBC* Locus kodiert. Homologe Gene wurden auch in *S. cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. pasteuri* und *S. saprophyticus* nachgewiesen. PNAG konnte aber in diesen Spezies nicht direkt nachgewiesen werden (Izano *et al*., 2008). Eine weitere wichtige Biofilmkomponente in *S. aureus* und *S. epidermidis* Biofilmen ist die extrazelluläre DNA (eDNA), die den Biofilm festigt und als Adhäsionsfaktor die Anheftung an Oberflächen ermöglicht (Das *et al*., 2010; Boles *et al*., 2010).

Die meisten Biofilme in der Umwelt und im klinischen Bereich bestehen aus Verbänden mehrerer Bakterienarten. Diese Verbände bieten die Vorteile des horizontalen Gentransfers sowie des Co-Metabolismus und können sich somit synergistisch als auch antagonistisch beeinflussen (Burmølle *et al*., 2010, 2006; Jefferson, 2004).

Für den Multispezies Biofilmreaktor wurden drei Stämme ausgewählt, die in Monospezies Biofilmreaktoren dichten Biofilm produzierten (*B. cereus* s.l. 1, *S. aureus* 45, *S. aureus* 67) und zwei, die Bakterienaggregate ausgebildet haben, die nicht an den Glaskugeln anhafteten (*B. psychrodurans* 24 und *E. faecalis* 77), da Andersson *et al*. (2008) in ihren Ansätzen zeigen konnten, dass Biofilmbildung am stärksten war, wenn gute und weniger gute Biofilmbildner zusammen inkubiert wurden. Nach 10 Tagen Reaktorlauf konnte dichte Biofilmbildung beobachtet werden. Als einziger Stamm, konnte *B. psychrodurans* 24 mittels Antibiotika-Selektion nicht nachgewiesen werden, da für diesen Stamm keine Antibiotikaresistenz mit dem Agardiffusionstest ermittelt worden war. Es besteht die Möglichkeit, dass dieser auf den Platten ohne Antibiotikum gewachsen ist, aber von dem *B. cereus s.l.* 1 überlagert wurde, da dieser sehr große Kolonien auf den Platten bildet im Gegensatz zu *Staphylococcus* und *Enterococcus* Spezies. Mikroskopisch konnte dieser Stamm am Ende des Reaktorlaufs auch nicht detektiert werden. Entweder wurde dieser Stamm während des Reaktorversuchs verdrängt oder er war am Ende in einer so geringen Anzahl vorhanden, dass es unmöglich war ihn unter dem Mikroskop zu erkennen.

Bakterien in Biofilmen sind in die EPS eingebettet und können dadurch in einer engen räumlichen Nachbarschaft sein, die den Gentransfer innerhalb des Biofilms begünstigen kann. Der Gentransfer ist für die Evolution und die genetische Diversität natürlicher mikrobieller Gemeinschaften sehr wichtig.

Die besten Ergebnisse im Gentransfer Versuch wurden erreicht, wenn die Reaktoren mit allen drei Kreuzungspartnern (*E. faecalis* T9, *E. faecalis* OG1X pMSP-*orf1*-GFP, *E. faecalis* JH2-2) beimpft und für 10 Tage inkubiert wurden. Die Transferrate lag bei $7{,}2\times10^{-7}$ in der Flüssigphase und bei $2{,}6\times10^{-6}$ an den Glaskugeln. Dieses Ergebnis konnte im „*long term*“ Versuch nicht mehr erreicht werden ($4\times10^{-8}$ und $7\times10^{-8}$). Die einzigen Unterschiede zu dem vorherigen Versuch waren, dass als mobilisierbares Plasmid pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP anstatt pMSP-*orf1*-GFP verwendet wurde und der Reaktor 26 Tage lang betrieben wurde. Ein Grund dafür könnte der Verlust des Plasmids pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP sein, da der *E. faecalis* OG1X mit pMSP-*orf1*-$P_{nisA}$-GFP bei jeder Probenahme in

geringerer Anzahl detektierbar war. Auch wenn das Plasmid in den Rezipienten mobilisiert werden konnte, so könnten auch die Transkonjuganten das Plasmid ohne Selektionsdruck verloren haben. Einige Studien zeigen, dass die direkte Visualisierung (Fluoreszenzmikroskopie) GFP-markierter Plasmide in den Transkonjuganten eine deutlich höhere Transferrate ergibt als die Zellzahlbestimmung mittels Kultivierung. Viele Transkonjuganten können das Plasmid während der Zellteilung verlieren, da kein Selektionsdruck vorliegt. Bakterien in Biofilmen befinden sich in unterschiedlichen physiologischen Stadien. In tiefer liegenden Schichten herrscht meist Nährstoff- und Sauerstoffmangel, der dazu führt, dass die Zellen eine geringere physiologische Aktivität aufweisen, oder vollkommen inaktiv sein können und deshalb schwerer oder gar nicht kultivierbar sind. Rani *et al*. (2007) haben nachgewiesen, dass *S. epidermidis* und *S. aureus* Zellen sich innerhalb eines Biofilms in bis zu vier unterschiedlichen physiologischen Stadien befinden können; aerobes und anaerobes Wachstum, metabolisch inaktive und tote Zellen. In einigen Gentransferversuchen in Biofilmen konnten Transkonjuganten nur an der Oberfläche des Biofilms detektiert werden, nicht aber im Inneren (Stewart and Franklin, 2008; Sørensen *et al*., 2005; Molin and Tolker-Nielsen, 2003).

Die Gentransfer Experimente in Biofilmen sollten noch weiter optimiert werden. Die Sauerstoffsättigung müsste erhöht werden. Das Problem ist, dass je dicker der Biofilm, desto weniger kann der Sauerstoff in die tiefen Schichten des Biofilms eindringen, da der Sauerstoff von den Bakterien in den oberen Schichten sofort verbraucht wird. Dadurch entsteht ein Sauerstoffgradient im Biofilm. Die Bakterien im Inneren des Biofilms überleben nur durch anaeroben Stoffwechsel (Karatan and Watnick, 2009). Die Stabilität des Plasmids in der Zelle müsste erhöht werden. Eine Möglichkeit wäre, subinhibitorische Konzentrationen des jeweiligen Antibiotikums zuzugeben.

Die Mobilisierungsraten können mit den in der Literatur angegebenen Daten nicht verglichen werden, da die Biofilmbildung und der Gentransfer in den meisten Fällen in Falcon Tubes, auf Filtern oder in Durchflusszellen erfolgt, die nur wenige Stunden bis zu drei Tage betrieben werden und nicht in einen kontinuierlich betriebenen Biofilmreaktor über 10 oder 26 Tage (Ong *et al*., 2009; Kajiura *et al*., 2006; Maeda *et al*., 2006;).

Angles *et al*. (1993) hatten einen ähnlichen Aufbau eines Biofilmreaktors. Der Reaktor wurde aber nur zur Hälfte mit Medium gefüllt und beinhaltete 25 Glaskugeln, im

Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten Reaktor, der fast vollständig mit Glaskugeln gefüllt war. Die Versorgung des Reaktors bei Angles *et al*. erfolgte mit Minimalmedium bei einer Geschwindigkeit von 10,5 mL/h und zusätzlichen Lufteinstrom sowie einer Raumtemperatur von 25°-27°C für 3 bis 7 Tage, damit der Rezipient Biofilm ausbilden kann, danach wurde das Medium aus dem Reaktor entnommen und mit dem Donor für 24h beimpft, ohne den Reaktor weiter mit dem Medium zu versorgen. In dieser Arbeit wurde Vollmedium verwendet, das mit 11-12 mL/h reingepumpt wurde. Der Reaktor wurde für 10 Tage mit allen Kreuzungspartnern bei einer Raumtemperatur von 25°-27°C betrieben. Angels *et al*. konnten je nach Inkubationszeit und unterschiedlich behandelten Glaskugeln (hydrophil und hydrophob) Transferraten von $10^{-1}$ bis $10^{-3}$ mit Hilfe eines biparentalen Matings erreichen. Dabei war die Transferrate an den Glaskugeln, also im Biofilm um eine Zehnerpotenz höher als in der Flüssigphase und insgesamt um eine Zehnerpotenz höher als im Filtermating (Angles *et al*., 1993). Die in dieser Arbeit erreichten Transferraten, sind Mobilisierungsraten eines triparentalen Matings und im Vergleich zu den im Filtermating ($10^{-8}$) erreichten Frequenzen waren diese in der Flüssigphase um eine Zehnerpotenz höher ($10^{-7}$), im Biofilm erreichten diese sogar $10^{-6}$.

## 4.3 Milchsäurebakterien

Der übermäßige Gebrauch von Antibiotika bei Mensch und Tier führte zur Ausbreitung von Antibiotika resistenten Bakterien, die mittlerweile ein weltweites Problem darstellen. Die Forschungen beschränken sich nicht mehr auf klinische Bakterien sondern auch auf kommensale und in der Umwelt vorkommende Bakterien, da diese ein Reservoir an Antibiotikaresistenzen besitzen, die auf Menschen, Tiere und Krankheitserreger übertragbar sind. Die Nahrungskette wird als eine der Hauptursachen für die Übertragung von Antibiotika resistenten Bakterien zwischen Tier und dem Menschen angesehen. Fermentierte Milch- und Fleischprodukte, die vor dem Verzehr nicht hitzebehandelt wurden, bieten den Antibiotika resistenten Bakterien einen Übertragungsweg vom Tier auf den Menschen. In *Lactococcus*, *Enterococcus* und *Lactobacillus* Spezies, die aus fermentierten Fleisch- und Milchprodukten isoliert wurden, konnten Tetracyclin-, Erythromycin und Vancomycin-Resistenzgene nachgewiesen werden. Erworbene Antibiotikaresistenzen können mittels Konjugation, Transformation und Transduktion übertragen werden. Dabei ist Konjugation der Hauptübertragungsweg von Resistenzgenen in der Umwelt, die auf mobilen genetischen Elementen, wie Insertionssequenzen (IS), Transposons, Phagen, Plasmiden und Pathogenitätsinseln kodiert sind. Diese DNA Segmente tragen zusätzlich Virulenzdeterminanten sowie Enzyme, die den eigenen Transfer und Integration in die Wirts-DNA vorantreiben (Rodríguez-Alonso *et al*., 2009; Toomey *et al*., 2009; Ammor *et al*., 2008).

Es wurden 100 Antibiotika resistente LAB Stämme, die aus traditionell hergestellten Milch- und Fleischprodukten isoliert wurden, auf die Anwesenheit von Plasmiden, Resistenzdeterminanten und Transfergenen untersucht. Die 16S rDNA Sequenzierung gab Aufschluss über die phylogenetische Einordnung von 33 LAB Stämmen. Diese LAB-Stämme gehören den Gattungen *Pediococcus* (19), *Lactobacillus* (13) und *Enterococcus* (1) an.

### 4.3.1 *Pediococcus* und *Enterococcus* Spezies

Die 19 *Pediococcus* Spezies unterteilen sich in *P. acidilactici* (15) und *P. pentosaceus* (4), die zusammen mit *P. halophilus* hauptsächlich in fermentierten Lebensmitteln vorkommen. *P. acidilactici* und *P. pentosaceus* sind als natürliche Mikroflora in

Fermentationsprozessen von Lebensmitteln zu finden und werden auch als Starterkulturen in natürlichen und kontrollierten Fermentationen von Gemüse und Wurstwaren verwendet (Papagianni and Anastasiadou, 2009).

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen *Pediococcus* Spezies stammen hauptsächlich aus Wurstwaren, sieben *P. acidilactici* Stämme wurden aus Käse isoliert (LAB82, LAB85-87, LAB92, LAB93 und LAB95). *P. acidilactici* und *P. pentosaceus* sind fähig antimikrobielle Peptide, die Pediocine (Bacteriocine) zu produzieren, so dass beide Spezies und deren Produkte auch als biologische Konservierungsstoffe dienen. Diese Bacteriocine können Listerien, *Clostridium* und *Enterococcus* Spezies inhibieren. Einige *P. acidilactici* und *P. pentosaceus* Stämme können u. a. Septikämien und Bakteriämien verursachen. *P. pentosaceus* zählt mittlerweile zu den opportunistischen Krankheitserregern, da dieser bei immungeschwächten Patienten Infektionen auslösen kann. Alle *Pediococcus* Spezies sind intrinsisch resistent gegenüber Vancomycin (Papagianni and Anastasiadou, 2009; Heinz *et al*., 2000).

In nur einem *P. acidilactici* Stamm, LAB93, konnte keine Vancomycinresistenz detektiert werden. In zwei Stämmen, LAB21 (*P. pentosaceus*) und LAB45 (*P. acidilactici*), wurde das Vancomycin-Resistenzgen *van*C1/2 mittels Southern Hybridisierung nachgewiesen. Bis jetzt sind in der Literatur keine *Pediococcus* Spezies mit *van*C1/2 Resistenzgenen bekannt. Die Resistenzgene *van*C1 und *van*C2 sind in *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* auf dem Chromosom lokalisiert. Es ist nicht bekannt, ob diese Gene auf einem mobilen genetischen Element kodiert sind (Werner *et al*., 2008).

In *P. pentosaceus* 21 konnten zusätzlich die Gene für drei Relaxasen (pLTK13-, $Pre_{pSK41}$- und pSMA23-Relaxase) und drei Transfergene (*trsE*, *trsK* und *traE*) detektiert werden sowie der Nachweis erbracht werden, dass dieser Stamm mindestens ein konjugatives Element besitzt (Kapitel 3.3.3). Die Transfergene *trsE*, *trsK* und das Gen für die pLTK13-Relaxase deuten auf die Plasmide plca36, pLgLA39 sowie pWCFS103 hin, wobei die pLTK13-Relaxase nicht in pWCFS103 kodiert ist. Die Primer für das Transfergen *traE* können an pSK41 ähnliche Plasmide oder das *L. lactis* Plasmid pMRC01 binden. Da keine weiteren pSK41 homologen Transfergene detektiert wurden, könnte es sich um ein pMRC01 ähnliches Plasmid handeln. Die pMRC01-Relaxase wurde aber nicht detektiert. Die aus diesem Stamm isolierten Plasmide waren auf dem Agarosegel über der chromosomalen DNA sehr schwach zu erkennen, so dass man nur vermuten könnte,

dass es sich um große Plasmide (>20 kb) handelt. Die Plasmidisolierung müsste in diesem Fall wiederholt werden.

*P. acidilactici* 45 enthält noch die Gene für zwei Relaxasen (pRS01- und pSMA23-Relaxase). In weiteren Mating Versuchen sollte überprüft werden, ob das Vancomycin-Resistenzgen möglicherweise übertragbar ist.

In den restlichen *Pediococcus* Stämmen konnten keine Resistenzgene mit den verwendeten Primern detektiert werden. Diese Stämme waren aber positiv auf einige Transfergene, die in der Natur auf unterschiedlichen Plasmiden kodiert sind. Zu diesen gehören die *Lactobacillus* Plasmide pLTK13, plca36, pLgLA39 und pWCFS103 (pLTK13-Relaxase und/oder *trsE*, *trsK*), die *S. aureus* Plasmide pGO1 und pSK41 (Pre- und Nes-Relaxase, *traE*, *traG*), die *E. faecalis* Plasmide pIP501 und pRE25 (*orf5* und *orf7*), die *L. lactis* Plasmide pMRC01 (*traE*, Relaxase), pK214 und pRS01 (Relaxase) sowie die pSMA23-ähnlichen Plasmide (Relaxase).

In weiteren acht *P. acidilactici* Stämmen konnten Relaxasegene detektiert werden. Zwei *P. acidilactici* Stämme beinhalten das pSMA23-Relaxasegen und das *traG* Gen. In neun *Pediococcus* Stämmen konnten drei bis acht Transfergene nachgewiesen werden, darunter vertreten sind die Stämme *P. pentosaceus* 18 mit acht Transfergenen und *P. pentosaceus* 26 mit vier Transfergenen, die das Plasmid pVA-GFP aus *E. faecalis* OG1X in den Rezipienten *L. lactis* UW4127RF mobilisieren konnten (Kapitel 3.3.3). Hier könnte es sich um die Plasmide pLTK13, plca36, pLgLA39 oder pWCFS103 handeln. Die pLTK13-Relaxase und die pIP501-Relaxase gehören der $MOB_Q$ Familie an, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass der pIP501 *oriT* im Plasmid pVA-GFP von der pLTK13-Relaxase erkannt wurde. Die pSK41 Pre- Relaxase gehört der $MOB_V$ Relaxasefamilie an und hatte in diesem Fall wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Mobilisierung des pVA-GFP Plasmids gehabt. Die Relaxase aus pWCFS103 gehört auch der $MOB_Q$ Familie an (Smillie *et al*., 2010; Tabelle S4). Auf die pWCFS103 Relaxase wurde aber in dieser Arbeit nicht getestet. Aus beiden Stämmen konnten große (>20 kb) Plasmide isoliert werden, so dass es sich hier womöglich um konjugative Plasmide handelt.

In *P. pentosaceus* 26 konnte das *traE* Gen detektiert werden, hierbei könnte es sich auch um pMRC01 ähnliches Plasmid handeln. Das dazugehörige Relaxasegen wurde aber nicht detektiert. Um zu bestätigen, dass es sich um das pMRC01 Plasmid handelt, sollten Primer entwickelt werden, die an weitere Transfergene aus pMRC01 binden können.

Für die Plasmide pLgLA39 und pWCFS103 konnte konjugativer Plasmidtransfer innerhalb der *Lactobacillus* Spezies bestätigt werden. Das Plasmid pWCFS103 (36 kb) konnte mit einer Transferrate von $10^{-6}$ bis $10^{-7}$ pro Donorzelle nach *L. plantarum* übertragen werden. Die Übertragung von pLgLA39 nach *L. gasseri* erfolgte mit einer Transferrate von $10^{-5}$ bis $10^{-8}$ pro Donorzelle (Ito *et al*., 2009; Van Kranenburg *et al*., 2005). Der Vergleich der Transferraten kann hier nicht erfolgen, da es sich um biparentale Mating Experimente im Gegensatz zu den in dieser Arbeit durchgeführten triparentalen Mating Versuchen handelt.

Gonzalez und Kunka (1983) konnten zeigen, dass das Plasmid pIP501 aus *E. faecalis* nach *P. pentosaceus* und *P. acidilactici* mit einer Transferrate von $10^{-5}$ bis $10^{-8}$ übertragen werden kann. In weiteren Versuchen fand der Transfer von pIP501 innerhalb der Gattung *Pediococcus* mit einer Transferrate von $10^{-4}$ bis $10^{-7}$ statt. Der konjugative Transfer von pIP501 in *Pediococcus* Spezies nach *E. faecalis* erfolgte im Bereich von $10^{-8}$.

Auffallend ist, dass einige der LAB Stämme *virB1* homologe Gene (lytische Transglykosylasen) zweier Plasmide (pSK41 und pIP501) und *virB4* homologe Gene (ATPasen) der Plasmide plca36, pSK41 und pIP501 beinhalten. In *P. acidilactici* Stämmen 22 und 23 konnten die *virB4* homologen Gene *trsE*, *traE* und *orf5* detektiert werden. *P. pentosaceus* 18 enthält die *virB1* homologen Gene *traG* und *orf7* sowie die *virB4* homologen Gene *trsE* und *traE*. In *P. pentosaceus* 26 wurden die *virB4* homologen Gene *trsE* und *traE* nachgewiesen. Bis jetzt sind in der Literatur keine *Pediococcus* Stämme mit pIP501, pSK41 und plca36 ähnlichen Genen bekannt.

Die *Pediococcus* Stämme enthalten Transfergene von Plasmiden, die in unterschiedlichen Gattungen und sogar Familien vorkommen (*Lactobacillus*, *Enterococcus* und *Staphylococcus*). Drei der *P. pentosaceus* Stämme (18, 21 und 26) sind fähig andere Plasmide zu mobilisieren (Mobilisierungsrate $10^{-6}$) und wahrscheinlich auch fähig Resistenzplasmide aufzunehmen. Es besteht die Möglichkeit, dass bei dem Herstellungsprozess der Wurstwaren sowie der Käseprodukte ein Genaustausch mit anderen Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus* und *Lactococcus* Spezies, die natürlich in den Produkten vorkommen können, sowie Pathogenen (*Staphylococcus* und *Enterococcus*) stattgefunden hat. Enterokokken zählen auch zu den Milchsäurebakterien, spielen eine wesentliche Rolle bei dem Reifeprozess des Käses und kommen in rohen sowie behandelten Fleischprodukten vor, sie gehören aber neben *Staphylococcus*

Spezies zu wichtigen nosokomialen Pathogenen und könnten auch als Fäkalkontaminationen in den Herstellungsprozess eingebracht werden. Enterokokken sind ein wesentlicher Bestandteil des menschlichen und tierischen Magen-Darm-Traktes, so dass beim Schlachten der Tiere, das Fleisch mit den Enterokokken kontaminiert werden kann (Foulquié Moreno *et al*., 2006). *E. faecalis* RE25 mit dem Plasmid pRE25 wurde aus Rohwurst isoliert. Weitere Versuche konnten zeigen, dass das Plasmid pRE25 in das Chromosom von *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* integriert werden sowie das Plasmid pESP91 (5 kb) mobilisieren kann (Schwarz *et al*., 2001).

In *E. durans* 79 (Isolat aus Käse) konnte das Erythromycin-Resistenzgen *erm*B, das Resistenz gegen Antibiotika der Macrolid-Linkosamid-Streptogramin B-Gruppe vermittelt sowie das Gen für die pSMA23-Relaxase detektiert werden. Aus diesem Stamm wurden ein großes Plasmid (>20 kb) und zwei kleinere Plasmide isoliert (Tab. 3.20). Das *erm*B Resistenzgen kann auf Transposons sowie Plasmiden kodiert sein. Da keine pIP501/pRE25 orthologen Transfergene detektiert worden sind, handelt es sich bei dem großen Plasmid nicht um eines dieser Plasmide. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das *erm*B Gen auf einem kleinen Plasmid, wie pLFE1 aus *L. plantarum* kodiert ist. Das Plasmid ist 4 kb groß und kodiert neben *erm*B auch eine Relaxase, auf die in dieser Arbeit nicht getestet wurde. Das Plasmid konnte erfolgreich in *L. rhamnosus*, *L. lactis*, *Listeria innocua*, *E. faecalis* und *L. monocytogenes* übertragen werden (Feld *et al*., 2009). Die pSMA23-Relaxase ist auf vier kleinen Plasmiden (pSMA23, p141, pRS4 und pLC88) der Größe 3,5 bis 3,6 kb kodiert. Diese Plasmide sind aus *L. casei* (pSMA23), *L. plantarum* (p141), *P. pentosaceus* (pRS4) und *L. casei* (pLC88) isoliert worden. Durch Southern Hybridisierung könnte herausgefunden werden, ob das *erm*B Gen auf einem der aus *E. durans* 79 isolierten Plasmide kodiert ist. In weiteren Versuchen sollte mit Hilfe des triparentalen Matings überprüft werden, ob das *erm*B auf andere Spezies übertragbar ist. Dieser Stamm ist außerdem resistent gegenüber drei weiteren Antibiotika, Vancomycin, Ciprofloxacin (Fluorchinolon-Antibiotika) und Rifampicin. Die Vancomycin-Resistenzgene *van*A, *van*B und *van*C1/2 wurden nicht detektiert. Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin und Rifampicin beruhen auf Mutationen in bestimmten Genen. Ciprofloxacin-Resistenz entsteht durch Punktmutationen in den Genen, die für die DNA-Gyrase (*gyrA*, *gyrB*) und/oder DNA Topoisomerase IV (*parC*, *parE*) kodieren (Drlica and Zhao, 1997). Rifampicin bildet einen stabilen Komplex mit

der bakteriellen RNA-Polymerase und verhindert so die Transkription. Die Resistenz beruht auf einer Mutation im *rpo*-Gen der β-Untereinheit der RNA-Polymerase, so dass eine reduzierte Affinität für das Antibiotikum entsteht (Enne *et al*., 2004).

### 4.3.2 *Lactobacillus* Spezies

*Lactobacillus* Spezies werden als Probiotika und Starterkulturen für fermentierte Milch- und Fleischprodukte verwendet. *L. plantarum*, *L. brevis* und *L. rhamnosus* spielen auch eine große Rolle im Reifeprozess von Käse (Settanni and Moschetti, 2010; Feld *et al*., 2009).

In den untersuchten Milchsäurebakterien konnten 13 Stämme als *Lactobacillus* Spezies identifiziert werden und unterteilen sich in *L. plantarum* (8), *L. brevis* (1) und *L. rhamnosus* (4). Drei der *L. plantarum* Stämme (5, 58 und 89) wurden aus Käse- und fünf aus Wurstprodukten isoliert (14, 15, 16, 17 und 19). *L. brevis* 43 stammt aus Wurst und *L. rhamnosus* Stämme (57, 66, 72 und 77) aus Käse (Cökelek, Weiß- und Tulumkäse). In einigen dieser *Lactobacillus* Stämme konnten auch Transfergene unterschiedlicher Plasmide aus G+ Bakterien nachgewiesen werden (Tab. 3.22).

In *L. plantarum* 58 wurden das Erythromycin-Resistenzgen *erm*G, die Gene für drei Relaxasen (pLTK13-, $Pre_{pSK41}$- und pSMA23-Relaxase) sowie die Transfergene *trsE* und *trsK* nachgewiesen. Die Gene für die pLTK13-Relaxase, *trsE* und *trsK* deuten auf die Plasmide plca36 und pLgLA39 (pLTK13-Relaxase, *trsE* und *trsK*) hin. Es könnte sich auch um zwei verschiedene Plasmide handeln, nämlich pLTK13 (Relaxase, mobilisierbar) und pWCFS103 (*trsE* und *trsK*; konjugativ). Triparentale und biparentale Mating Experimente könnten Aufschluss darüber bringen, ob *L. plantarum* 58 konjugative Plasmide enthält und das Erythromycin-Resistenzgen *erm*G übertragen kann.

In *L. plantarum* 5 konnte das *tet*M Gen neben der pSMA23-Relaxase detektiert werden. Das *tet*M Gen kann auf Plasmiden, z. B. pMD5057 (10,9 kb) aus *L. plantarum* sowie auf konjugativen Transposons (Tn*916*) kodiert sein (Devirgiliis *et al*., 2009; Danielsen, 2002). Gevers *et al*. (2003) haben Tetracyclin resistente *L. plantarum*, *L. alimentarius* und *L. sakei* subsp. *sakei* Stämme aus fermentierten Würsten isoliert, die ein Plasmid kodiertes *tet*M Gen besitzen. Dieses *tet*M Gen konnte in *E. faecalis* mit einer Transferrate von $10^{-4}$ bis $10^{-6}$ pro Rezipientenzelle *in vitro* übertragen werden. Der konjugative Transfer von *tet*M nach *L. lactis* subsp. *lactis* erfolgte mit einer Transferrate von $10^{-5}$ bis

$10^{-7}$. Das *tet*M Gen konnte nicht in *S. aureus* LMG 21674 übertragen werden. Boguslawska *et al*. (2009) konnten das *tet*M Gen, das auf einem Tn*916* ähnlichen Transposon in *L. lactis* kodiert ist, *in vitro* nach *L. lactis* Spezies (Transferraten $10^{-5}$ bis $10^{-7}$) und nach *E. faecalis* mit einer Transferrate von $10^{-6}$ pro Rezipientenzelle übertragen. Der *in vivo* Transfer von *tet*M nach *E. faecalis* wurde im Magen-Darm-Trakt gnotobiotischer Ratten (keimfrei) nachgewiesen.
In drei *L. rhamnosus* Stämmen wurden das Erythromycin-Resistenzgen *erm*B und Relaxasegene detektiert. Das *erm*B Gen ist entweder Plasmid- oder Transposon kodiert und konnte u. a. in *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus* und *Lactobacillus* Spezies nachgewiesen werden (Roberts, 2008; Roberts *et al.*, 1999).
Toomey *et al*. (2009) konnten in biparentalen Mating Versuchen den Transfer von Plasmid kodierten *erm*B Gens (pAMβ1) innerhalb *L. lactis* Spezies im Bereich von $2\times10^{-2}$ nachweisen. Der Transfer von *erm*B aus *Streptococcus thermophilus* E2 in *E. faecalis* JH2-2 erfolgte im Bereich von $4\times10^{-4}$. Der *in vivo* Transfer von *erm*B konnte im Tierpansen-Model im Bereich von $10^{-6}$ bis $10^{-8}$ nachgewiesen werden. In einer anderen Studie konnten Toomey *et al*. (2009) das *erm*B Gen (Plasmid kodiert) aus *L. lactis* und *S. thermophilus* nach *L. monocytogenes* (in Lebensmitteln vorkommender Krankheitserreger) mit einer Transferrate von $10^{-4}$ und $10^{-6}$ übertragen, wobei der Transfer von *erm*B nach *S. aureus* nicht erfolgte.

In den LAB Stämmen konnten Transfergene unterschiedlicher Plasmide aus G+ Bakterien detektiert werden. Zu diesen Plasmiden gehören die *Lactobacillus* Plasmide plca36, pLgLA39, pWCFS103 und pLTK13, die *S. aureus* Plasmide pGO1 und pSK41, die *E. faecalis* Plasmide pIP501 und pRE25 sowie die *E. faecium* Plasmide pRI1 und pJS42. Einige dieser Plasmide haben einen breiten und einige einen engen Wirtsbereich, d. h. diese Plasmide können über Gattungsgrenzen hinaus oder nur innerhalb einer Gattung oder Spezies übertragen werden. Das Plasmid pIP501 hat einen breiten Wirtsbereich (*broad host range*) und konnte in alle untersuchten G+ Bakterien sowie G- *E. coli* übertragen werden (Abajy *et al*., 2007). Die Plasmide der pSK41 Familie sowie das Plasmid pWCFS103 gehören zu den *narrow host range* Plasmiden (Weaver *et al*., 2009; Van Kranenburg *et al*., 2005). Der konjugative Transfer von pLgLA39 wurde nur innerhalb der *L. gasseri* Spezies durchgeführt, so dass nicht bekannt ist, ob der Transfer auch in andere Spezies oder Gattungen möglich ist (Ito *et al*., 2009). Einige Transfergene

dieser Plasmide (pSK41, pWCFS103 und pLgLA39) konnten aber in den hier untersuchten *Pediococcus* und *Lactobacillus* Spezies nachgewiesen werden, was auf einen Gentransfer außerhalb der Speziesgrenzen schließen lässt. Drei der *Pediococcus* Stämme (LAB18, LAB21 und LAB26) enthalten konjugative Elemente und konnten das Plasmid pVA-GFP aus *E. faecalis* OG1X in *L. lactis* übertragen. Aus *P. pentosaceus* 18 und 26 konnten außerdem große Plasmide (>20 kb) isoliert werden, so dass es sich hier um konjugative Plasmide handeln könnte. In triparentalen Matings wurde ein konjugatives Element aus *Pediococcus* in *E. faecalis* übertragen und konnte von dort das Plasmid pVA-GFP in *Lactococcus* mobilisieren. Dieser Transfer erfolgte über Gattungsgrenzen hinaus. Diese Stämme könnten nach Verzehr der entsprechenden Produkte (Wurstwaren) den genetischen Austausch innerhalb und außerhalb der Speziesgrenzen (z. B. im Magen-Darm-Trakt und auch während des Herstellungsprozesses) vermitteln und so die Weitergabe oder Aufnahme von Resistenzgenen und anderen Virulenzfaktoren begünstigen.

# 5 AUSBLICK

## 5.1 ISS und Concordia Isolate

In den ISS und Concordia Stämmen wurden Plasmide, *virB1* (lytische Transglykosylase), *virB4* (ATPase) und *virD4* (ATPase, Kopplungsprotein) homologe Transfergene unterschiedlicher konjugativer Plasmide aus G+ Bakterien (pIP501, pRE25, pSK41, pGO1, pSM19035, pMRC01), Relaxasegene mehrerer Plasmide aus G+ Bakterien sowie Resistenzdeterminanten nachgewiesen. Um das Virulenzpotential und somit das Risiko für die Crew der ISS und Concordia noch weiter analysieren zu können, sollten die Charakterisierungsstudien auf weitere Virulenzfaktoren, die in *Staphylococcus* und *Enterococcus* Spezies vorkommen können, erweitert werden.

In *E. faecalis* bekannte Virulenzgene sind *esp* (*enterococcal surface protein*), *ace* (*adhesion of collagen from E. faecalis*), *ebp* (*endocarditis- and biofilm associated pili*), *efaA* (*E. faecalis antigen A*, auch *endocarditis antigen*), *cyl* (Cytolysin), *gelE* (Gelatinase), *epa* (*enterococcal polysaccharide antigen*) sowie *agg* (*aggregation substance*). Das Esp ist ein Zellwand-assoziiertes Protein, das die Adhäsion an eukaryotische Zellen und somit deren Kolonisierung erleichtert. Es spielt auch eine Rolle bei der Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz. Das Kollagen-Bindeprotein Ace ist wahrscheinlich an der Endokarditis Infektion beteiligt und gehört der MSCRAMM (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*) Familie an. Das *ebp* Operon (*ebpABC*) kodiert Gene für den Aufbau der Pili, die wiederum notwendig für die Biofilmbildung sind. Das Endokarditis-assoziierte Antigen EfaA ist ein durch Serum induzierbares Oberflächenprotein. Cytolysin ist ein bakterielles Toxin, das auf Pheromon-Plasmiden oder chromosomal kodiert ist und durch Quorum Sensing (QS) reguliert wird. Gelatinase GelE ist eine chromosomal kodierte extrazelluläre Zink-Metallopeptidase, die u. a. Hämoglobin und andere bioaktive Peptide hydrolysieren kann. Die Transkription von *gelE* wird durch QS reguliert, das vom *fsr* (*faecal streptococci regulator*) Locus kodiert ist. Die Aggregationssubstanzen sind Plasmid kodierte Pheromon-induzierbare Oberflächenproteine, u. a. AsaI, AspI und Acs10, die die Aggregation zwischen *Enterococcus* Zellen vermitteln und dadurch den Plasmidtransfer erleichtern. Außerdem fördern diese Proteine die Bindung an Epithelzellen und deren Kolonisation. Der *epa* Locus spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Pathogenität von Enterokokken, da durch

Geninaktivierung u. a. reduzierte Biofilmbildung und erniedrigte Resistenz gegenüber Phagen und Leukozyten festgestellt wurden (Sava *et al*., 2010; Fisher and Phillips, 2009; Koch *et al*., 2004).

Die für die Pathogenese von *S. aureus* wichtigen Virulenzfaktoren sind u. a. die MSCRAMMs, die die Adhäsion an eukaryotische Zellen oder extrazelluläre Matrix vermitteln und so die Kolonisierung ermöglichen. Sie sind im Allgemeinen kovalent an das Zellwand-Peptidoglykan gebunden. Diese erkennen Kollagen (Cna, *collagen-binding protein*), Fibronektin (FnBP, *fibronectin-binding proteins*) und Fibrinogen (Clf, *clumping factors*). Das Protein A (Spa, *staphylococcal protein A*) bindet an Immunoglobulin G (IgG) und den von-Willebrand-Faktor, wodurch die Aufnahme der Bakterien durch Phagozyten verhindert wird. Weitere Virulenzfaktoren sind die Superantigen-Toxine, wie das Toxische Schock Syndrom Toxin 1 (TSST-1, kodiert durch das *tst* Gen), die Exfoliatine, die das *Staphylococcal Scaled Skin Syndrom* (SSS-Syndrom) verursachen sowie weitere Enterotoxine. Andere Toxine sind die Hämolysine (α-, β-, δ- und γ-Toxin), die Zelllysis in Membranen von Wirtszellen durch Einlagerung und Poren-Bildung verursachen (DeLeo *et al*., 2009; Ferry *et al*., 2005). In *S. epidermidis* bekannte MSCRAMMs sind u. a. das Fibrinogen-Bindeprotein SdrG, das Autolysin/Adhäsin Aae, das bifunktionelle Autolysin AtlE und die Oberflächen-Proteine Ses (*S. epidermidis surface proteins*) (Fey and Olson, 2010).

Die Fähigkeit von *S. aureus* und *S. epidermidis* Biofilme auszubilden, kann als wichtiger Virulenzfaktor angesehen werden, da viele chronische Infektionen eben durch diese Biofilmbildung verursacht werden. In Biofilmbildung involvierte Virulenzfaktoren sind die eben erwähnten MSCRAMMs, das Autolysin Atl, welches homolog zu AtlE aus *S. epidermidis* ist, das PIA/PNAG (*intercellular polysaccharide adhesin*), das vom *icaADBC* Locus kodiert wird und in *S. aureus* sowie *S. epidermidis* vorkommen kann. PIA-unabhängige Biofilmbildung wird durch spezifische Oberflächenproteine wie Bap/Bhp (*biofilm associated protein*, Bap *homologue protein*) und Aap/SasG (*accumulation associated protein*, *S. aureus surface protein G*) vermittelt (Fey and Olson, 2010; Otto, 2009; Schroeder *et al*., 2009).

Da die Screenings von Transfer- und Resistenzgenen sowie Virulenzdeterminanten mittels PCR in einer großen Anzahl von Isolaten sehr zeitaufwendig sind, sollte die Entwicklung eines DNA-Microarrays (Genchip) in Betracht gezogen werden, da diese Systeme einige 1000 Gene gleichzeitig detektieren können und das Risiko für die Crew

der ISS und Concordia kann somit schneller abgeschätzt werden. Zou *et al*. (2009) nutzten die Microarray Technologie um Antibiotika-Resistenzgene in *Salmonella enterica* nachzuweisen. Dabei verwendeten Sie einen Genchip mit 775 Oligonukleotidsonden der jeweiligen Resistenzgene. Perreten *et al*. (2005) entwickelten einen Genchip, um 90 Antibiotika-Resistenzgene in G+ Bakterien detektieren zu können. Die genomische Diversität kommensaler und nosokomialer *E. faecalis* Stämme wurde von Solheim *et al*. (2011 und 2009) mit Hilfe von DNA-Microarrays untersucht. Dabei enthielt der Genchip 3219 *orfs* des Genoms von *E. faecalis* V583. Von diesen 3219 *orfs* sind 3093 chromosomal kodiert und 126 auf Plasmiden lokalisiert. Zusätzlich enthielt dieser Genchip 10 Gene der Pathogenitätsinsel aus *E. faecalis* MMH594, die dem *E. faecalis* V583 fehlt. Damit war es möglich die genetische Variabilität sowie potentielle Gene, die in Adaption und Persistenz involviert sind, zu identifizieren.

Weitere Verwendung findet die Microarray Technologie für die Bestimmung der klonalen Linien von *S. aureus* und MRSA sowie deren Vergleiche untereinander, um Gene zu finden, die hoch konserviert sind (Lindsay, 2010).

Plasmide können Resistenz- und Transfergene sowie andere Virulenzfaktoren kodieren, so dass deren Nachweis in Bakterien von großer Bedeutung ist. Um schneller bestimmte Plasmide in den bakteriellen Isolaten nachweisen zu können, sollten Replikon (Rep) spezifische Sonden oder Primer entwickelt werden, die die Plasmide bestimmten Rep-Familien zuordnen können. Jensen *et al*. (2010) haben Plasmide aus G+ Bakterien 19 Rep-Familien zuordnen können und einige Plasmide bilden eigenständige Gruppen, wie pSK1 und pUB110 aus *S. aureus*. Diese Rep-Sonden könnte man sich auch in der Microarray Technologie zusammen mit den Virulenz-, Transfer- und Resistenzgenen zunutze machen, um ein vollständiges Bild über das Gefährdungspotential der ISS und Concordia Isolate zu bekommen. Mit der Microarray Technologie können aber nur die bekannten Plasmide erfasst werden, so dass die klassische Methode der Plasmidisolierung hiermit nicht ersetzt werden kann.

Die in ISS und Concordia Isolaten nachgewiesenen MGEs sollen zusammen mit den Ergebnissen der Verbundpartner in der Datenbank ACLAME (*A CLAssification of Mobile genetic Elements*, http://aclame.ulb.ac.be) veröffentlicht werden, sodass ein vollständiges Bild des mobilen Genpools erhalten werden kann. Die MGEs werden in dieser Datenbank katalogisiert und deren Schlüsselproteine Proteinfamilien zugeordnet (Leplae *et al*., 2010). Dadurch kann ein Vergleich zwischen den in ISS und Concordia

Isolaten detektierten MGEs durchgeführt werden und so die Unterschiede dieser beiden Container Systeme analysiert werden. Die für die Besatzung entstehenden Risiken können abgeschätzt und in Folge reduziert werden.

### 5.1.1 Biofilme

Die Untersuchungen der Luft- und Oberflächenkontaminationen der Raumstationen MIR und ISS zeigten, dass Mikroorganismen Bauteile wie Glas, Metall, Plastik oder Kombinationen dessen, angreifen können. Die Entwicklung von Kondenswasser und Akkumulation biologisch aktiver Substanzen begünstigen die Kolonisation der Oberflächen, so dass Biofilme entstehen können. Diese verursachen starke Korrosionen an den Geräten und verstopfen die Luft- und Wasseraufbereitungssysteme, wie für die MIR bereits dokumentiert wurde. Diese biologische Zersetzung kann zum Ausfall der lebenswichtigen Anlagen führen und damit die Gesundheit der Crew gefährden (Novikova *et al*., 2006). Die regelmäßige Desinfektion und Behandlung von gefährdeten oder bereits mit Biofilm bewachsenen Oberflächen erfordert geeignete Methoden, um die Kontaminationen auf ein Minimum beschränken zu können.

Einige der Concordia (*B. cereus s.l.* 1, *S. aureus* 45 und 67, *S. epidermidis* 55, *S. hominis* subsp. *hominis* 137) und ISS Isolate (*S. saprophyticus* R13 und *S. hominis* subsp. *hominis* 110) bildeten im Monospezies Biofilmreaktor auf den Glaskugeln dicken und schleimigen Biofilm. Im Multispezies Biofilmreaktor konnten fünf Stämme (*B. cereus s.l.* 1, *S. aureus* 45, *S. aureus* 67, *E. faecalis* 77 und *B. psychrodurans* 24) zusammen dichten Biofilm ausbilden. Ob diese Stämme auch Biofilme auf den entsprechenden ISS und Concordia Materialien ausbilden können, sollte in den Biofilmreaktoren getestet werden. In diesem Fall würden anstatt der Glaskugeln die verwendeten Kunststoff- und metallischen Werkstoffe aus der ISS und Concordia zum Einsatz kommen.

Mögliche Strategien zur Inhibierung oder Auflösung bestehender Biofilme wären die Anwendung von Quorum Sensing Inhibitoren (QSI), Oberflächen-aktiven Substanzen mikrobiellen Ursprungs (*biosurfactants*) sowie der Beschichtung von Oberflächenmaterialien mit Nanopartikeln, die antimikrobielle Eigenschaften haben (z. B. Nanosilber).

Ein für Staphylokokken bekannter QSI ist das RNAIII-*inhibiting peptide* (RIP). Das RIP wurde in Biofilmen von *S. aureus* und *S. epidermidis* auf Implantaten im Tiermodell untersucht. Biofilmbildung wurde durch Beschichtung der Implantate mit RIP und

gleichzeitige Gabe von Antibiotika erfolgreich inhibiert. Das RIP greift in das QS System I ein, indem es mit RAP (RNAIII-*activating protein*, Autoinduktor) konkurriert, sodass das Targetmolekül von RAP, das TRAP (*target of* RAP) nicht phosphoryliert werden kann und inhibiert wird. Das TRAP kann somit die Agr (*accessory gene regulator*, *agrACDB*) Expression nicht einleiten und die Komponenten des QS Systems II werden nicht synthetisiert. Dazu gehören einige Virulenzfaktoren wie Adhäsine und Toxine. Wenn TRAP Expression inhibiert wird, bilden die Bakterien keinen Biofilm, produzieren keine Toxine und verursachen keine Infektionen (Francolini and Donelli, 2010; Balaban, 2008; Korem *et al*., 2005).

*Biosurfactants* (u. a. Glykolipide, Lipopeptide, Polysaccharid-Protein Komplexe und Phospholipide) haben einige Vorteile gegenüber synthetischen Substanzen. Sie haben eine geringere Toxizität, sind biologisch abbaubar, chemisch vielfältig und wirkungsvoll unter extremen Umweltbedingungen, wie hohen Temperaturen, pH-Werten und Ionenkonzentrationen. Sie besitzen eine starke Oberflächen-Aktivität, emulgierende, antimikrobielle und antiadhäsive Eigenschaften. *Lactobacillus fermentum* produziert eine Oberflächen-aktive Substanz, die die Adhäsion von Harnwegserregern, einschließlich *E. faecalis* inhibieren kann (Rodrigues *et al*., 2006). Kiran *et al*. (2010) isolierten ein Glykolipid aus dem Meeresbakterium *Brevibacterium casei* MSA19, das pathogene Monospezies und Multispezies Biofilme *in vitro* zerstören konnte.

In der Medizin wird Nanosilber intensiv bei Hautkrankheiten als Wundverband verwendet, um die Bakterienbesiedlung zu verhindern und um die Wundheilung zu beschleunigen. Weitere Anwendung findet die Oberflächenbeschichtung mit Nanosilber bei Kathetern und Implantaten, um die Biofilmbildung zu inhibieren. Silber ist für seine antimikrobielle Wirkung gegen G+ und G- Bakterien, Pilze, Protozoen und einige Viren bekannt und kommt auch u. a. in Kühlschränken, Filtern und Klimaanlagen vor (Faunce and Watal, 2010; Monteiro *et al*., 2009). Shrestha *et al*. (2010) konnten nachweisen, dass die Nanopartikel Chitosan (Cs-np) und Zinkoxid (ZnO-np) antimikrobielle Eigenschaften besitzen und *E. faecalis* Biofilme zerstören können.

Falls einige dieser Substanzen im Laborexperiment als wirksam befunden werden, müssten diese auf ihre Effizienz in Langzeitversuchen unter den speziellen Bedingungen auf der Concordia und der ISS sowie damit verbundenen Auswirkungen auf die Gesundheit der Crew untersucht werden.

## 5.2 Milchsäurebakterien

In einigen LAB Stämmen konnten Transfergene (für Relaxasen, ATPasen und Kopplungsproteine) unterschiedlicher Plasmide (plca36, pSK41, pIP501, pJS42) aus G+ Bakterien (*Lactobacillus*, *Enterococcus* und *Staphylococcus*) sowie Antibiotika-Resistenzgene (*erm*B, *van*C1/2, *tet*M) nachgewiesen werden. Drei der LAB Stämme (*Pediococcus* Spezies) besitzen konjugative Elemente und konnten das Plasmid pVA-GFP in *E. faecalis* im triparentalen Mating nach *Lactococcus lactis* mobilisieren.

Der konjugative Transfer von Plasmiden und Antibiotika-Resistenzgenen der LAB Stämme sollte nicht nur *in vitro* untersucht werden, sondern auch *in vivo* z. B. im Magen-Darm-Trakt von Mäusen, um das Risikopotential der LAB Stämme, die Antibiotika-Resistenzgene an andere Bewohner des Magen-Darm-Trakts weiterzugeben und somit die Verbreitung von Resistenzen durch Aufnahme der Nahrung abschätzen zu können. Feld *et al*. (2009) erreichten höhere Transkonjugantenzahlen im Transferversuch in gnotobiotischen Ratten als *in vitro* mit triparentalen Mating. Dabei konnte ein *erm*B (Erythromycinresistenz) kodierendes kleines Plasmid aus *Lactobacillus plantarum* nach *E. faecalis* übertragen werden. Im Darm gnotobiotischer Mäuse konnte auch das Vancomycin-Resistenzgen *van*A von *E. faecium* auf *L. acidophilus* (probiotischer Stamm) transferiert werden (Mater *et al*., 2008). Der Gentransfer kann nicht nur *in vivo* stattfinden, sondern auch *in situ* während der Fermentation. Toomey *et al*. (2009) untersuchten den Transfer von Antibiotika-Resistenzgenen *in vitro* und *in situ* während einer Joghurt Herstellung, dabei wurden die LAB Stämme (Donoren) als Starterkulturen verwendet und die pathogenen Stämme (Rezipienten) als Kontaminanten. Es konnte nur der Transfer zwischen zwei LAB Stämmen detektiert werden. Auch wenn kein Transfer in diesem Versuch zwischen den LAB Stämmen und den Pathogenen stattgefunden hat, so muss dies nicht für alle Versuche gelten. Die in unseren LAB Stämmen detektierten Transfergene zeigen, dass durch Gentransfer ein Austausch zwischen LAB und Staphylokokken sowie Enterokokken stattgefunden hat.

LAB spielen aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften eine große Rolle bei der Fermentation von Milch- und Fleischprodukten, Gemüse sowie der Produktion von Wein, Kaffee, Kakao und Sauerteig. Sie besitzen einige metabolische Eigenschaften, wie Säureproduktion, proteolytische Aktivität, Bildung von Bakteriocinen, Resistenzen gegen Bakteriophagen, Produktion von Exopolysacchariden, Vitaminen und komplexen Aromastoffen. Bakteriocine sind antimikrobielle Peptide oder Proteine und können

Verderbnisbakterien sowie Krankheitserreger wie *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus* und *Listeria monocytogenes* inhibieren und dienen somit auch als biologische Konservierungsstoffe. Exopolysaccharide werden in der Lebensmittelindustrie u. a. als Verdickungsmittel, Stabilisatoren und Emulgatoren verwendet. Sie sollen außerdem das Immunsystem stärken, das Cholesterin senken und Antitumor-Eigenschaften besitzen. Einige LAB werden als Probiotika eingesetzt, da sie im Magen-Darm-Trakt überleben, sich an die Darmschleimhaut anhaften können, Resistenz gegenüber Säuren sowie Gallenflüssigkeit besitzen und die Gesundheit des Wirtes günstig beeinflussen. Probiotika können Magen-Darm Infektionen verhindern und diese verkürzen, den Cholesterinspiegel erniedrigen, das Immunsystem stärken, Lebensmittelallergie-Symptome schwächen sowie antimikrobielle, antimutagene und antikarzinogene Fähigkeiten besitzen (Granato *et al*., 2010; O´Sullivan *et al*., 2009; Zhu *et al*., 2009; Vinderola *et al*., 2006).

Die Untersuchung der LAB auf einige dieser Fähigkeiten könnte Aufschluss über die positiven Eigenschaften dieser Stämme bringen sowie die Möglichkeit geben definierte Stämme für Fermentationsprozesse in Zukunft auswählen und verwenden zu können. Die Kontrolle von in der Lebens- und Futtermittelindustrie verwendeten LAB auf erworbene Antibiotika-Resistenzgene sowie MGE sollte regelmäßig durchgeführt werden, da durch Kontaminationen, Verunreinigungen und Hygienemangel Krankheitserreger eingeschleust werden, die durch Gentransfer Virulenzfaktoren übertragen können, die wiederum auf das Tier oder den Menschen übertragbar sind.

# 6 LITERATUR

**Abajy, M.Y., Kopec, J., Schiwon, K., Burzynski, M., Döring, M., Bohn, C. and Grohmann, E.** (2007) A Type IV-Secretion-Like System (T4SLS) is required for conjugative DNA transport of the Gram-Positive Plasmid pIP501. *J. Bacteriol.* **189**: 2487-2496.

**Aguilar, J., Zupan, J., Cameron, T. A. and Zambryski, P. C.** (2010) *Agrobacterium* type IV secretion system and its substrates form helical arrays around the circumference of virulence-induced cells. *PNAS* **107**(8): 3758-3763.

**Alegre, M. T., Rodríguez, M. C. and Mesas, J. M.** (2005) Nucleotide sequence, structural organization and host range of pRS4, a small cryptic *Pediococcus pentosaceus* plasmid that contains two cassettes commonly found in other lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett*. **250**(1): 151-156.

**Alvarez-Martinez, C. E. and Christie, P. J.** (2009) Biological Diversity of prokaryotic Type IV Secretion Systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **73**(4): 775-808.

**Ammor, M. S., Flórez, A. B., van Hoek, A. H. A. M., los Reyes-Gavilán, C. G. de, Aarts, H. J. M., Margolles, A. and Mayo, B.** (2008) Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J Mol. Microbiol. Biotechnol.* **14**(1-3): 6-15.

**Anderson, D. G. and McKay, L. L.** (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol* **46**(3): 549-552.

**Anderson, G. G. and O'Toole, G. A.** (2008) Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms. In T. Romeo (Ed.), *Bacterial Biofilms* Vol. **322**: 85-105: Springer Berlin Heidelberg.

**Andersson, S., Rajarao, G. K., Land, C. J. and Dalhammar, G.** (2008) Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems. *FEMS Microbiol. Lett*. **283**(1): 83-90.

**Andrup, L., Jorgensen, O., Wilcks, A., Smidt, L. and Jensen, G. B.** (1996) Mobilization of "nonmobilizable" plasmids by the aggregation-mediated conjugation system of *Bacillus thuringiensis. Plasmid* **36**(2): 75-85.

**Angles, M. L., Marshall, K. C. and Goodman, A. E.** (1993) Plasmid Transfer between Marine Bacteria in the Aqueous Phase and Biofilms in Reactor Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol* **59**(3): 843-850.

**Archer, G. L. and Johnston, J. L.** (1983) Self-transmissible plasmids in staphylococci that encode resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**(1): 70-77.

**Archer, G. L., Coughter, J. P. and Johnston, J. L.** (1986) Plasmid-encoded trimethoprim resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**(5): 733-740.

**Arechaga, I., Pena, A., Fernandez-Alonso, M., Rivas, G. and de la Cruz, F.** (2008) ATPase Activity and Oligomeric State of TrwK, the VirB4 Homologue of the Plasmid R388 Type IV Secretion System. *J. Bacteriol.* **190**(15): 5472-5479.

**Arends, K. (2010)** Entwicklung von *gfp*-basierten Monitoring Tools zur Verfolgung von horizontalem Gentransfer und Studien zum T4SLS des konjugativen Plasmids pIP501 aus *Enterococcus faecalis*. Doktorarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland.

**Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P.R., Naumann, M. and Meyer, T.F.** (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol.* **2**(2): 155-164.

**Balaban, N.** (Ed.) (2008) Control of Biofilm Infections by Signal Manipulation**:** Springer Berlin Heidelberg.

**Ballard, S. A., Pertile, K. K., Lim, M., Johnson, P. D. R. and Grayson, M. L.** (2005) Molecular Characterization of *vanB* Elements in Naturally Occurring Gut Anaerobes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(5): 1688-1694.

**Barton, B. M., Harding, G. P. and Zuccarelli, A. J.** (1995) A General Method for Detecting and Sizing Large Plasmids. *Anal. Biochem.* **226**(2): 235-240.

**Bastos, M. d. C. F. de, Coutinho, B. G. and Coelho, M. L. V.** (2010) Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals* **3**(4): 1139-1161.

**Bellanger, X., Roberts, A. P., Morel, C., Choulet, F., Pavlovic, G., Mullany, P., Decaris, B. and Guedon, G.** (2009) Conjugative Transfer of the Integrative Conjugative Elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **191**(8): 2764–2775.

**Bera, A., Biswas, R., Herbert, S., Kulauzovic, E., Weidenmaier, C., Peschel, A. and Gotz, F.** (2007) Influence of Wall Teichoic Acid on Lysozyme Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**(1): 280-283.

**Berg, T., Firth, N., Apisiridej, S., Hettiaratschi, A., Leelaporn, A. and Skurray, R. A.** (1998) Complete Nucleotide Sequence of pSK41: Evolution of Staphylococcal Conjugative Resistence Plasmids. *J. Bacteriol*. **180**(17): 4350-4359.

**Beuls, E., Van Houdt, R., Leys, N., Dijkstra, C., Larkin, O. and Mahillon, J.** (2009) *Bacillus thuringiensis* Conjugation in Simulated Microgravity. *Astrobiology* **9**(8): 797-805.

**Biavasco, F., Foglia, G., Paoletti, C., Zandri, G., Magi, G., Guaglianone, E., Sundsfjord, A., Pruzzo, C., Donelli, G. and Facinelli, B.** (2007) VanA-Type Enterococci from Humans, Animals, and Food: Species Distribution, Population Structure, Tn*1546* Typing and Location, and Virulence Determinants. *Appl. Environ. Microbiol*. **73**(10): 3307-3319.

**Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**(6): 1513-1523.

**Böckelmann, U., Dörries, H. H., Ayuso-Gabella, M. N., Salgot de Marçay, M., Tandoi, V., Levantesi, C., Masciopinto, C., Van Houtte, E., Szewzyk, U., Wintgens, T. and Grohmann, E.** (2009) Quantitative PCR Monitoring of Bacterial Pathogens and Antibiotic Resistance Genes in three European Artificial Groundwater Recharge Systems. *Appl. Environ. Microbiol*. **75**(1): 154-163.

**Böckelmann, U., Manz, W., Neu, T. and Szewzyk, U.** (2002) Investigation of lotic microbial aggregates by a combined technique of fluorescent in situ hybridization and lectin-binding-analysis. *J. Microbiol. Methods* **49**: 75-87.

**Böckelmann, U., Szewzyk, U. and Grohmann, E.** (2003) A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *J. Microbiol. Methods* **55**(1): 201-211.

**Boguslawska, J., Zycka-Krzesinska, J., Wilcks, A. and Bardowski, J.** (2009) Intra - and Interspecies Conjugal Transfer of Tn*916*-Like Elements from *Lactococcus lactis* In Vitro and In Vivo. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(19): 6352-6360.

**Boles, B. R., Thoendel, M., Roth, A. J. and Horswill, A. R.** (2010) Identification of Genes Involved in Polysaccharide-Independent *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLoS ONE* **5**(4): e10146.

**Bottone, E. J.** (2010) *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev*. **23**(2): 382-398.

**Boucher, H., Miller, L. G. and Razonable, R. R.** (2010) Serious Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* **51**(S2): 183-197.

**Bouillard L., Michel O., Dramaix M., Devleeschouwer M.** (2005) Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust, and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. *Ann. Agric. Environ. Med.* **12**(2):187-192.

**Brüssow, H., Canchaya, C. and Hardt, W.-D.** (2004) Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **68**(3): 560-602.

**Bryers, J. D**. (2008) Medical biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, **100**(1): 1-18.

**Burmølle, M., Thomsen, T. R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., Tvede, M., Nyvad, B., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Moser, C., Kirketerp-Møller, K., Johansen, H. K., Høiby, N., Jensen, P. Ø., Sørensen, S. J. and Bjarnsholt, T.** (2010) Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**(3): 324-336.

**Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J. and Kjelleberg, S.** (2006) Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol* **72**(6): 3916-3923.

**Cabeen, M. T. and Jacobs-Wagner,** C. (2005) Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Micro.* **3**(8): 601-610.

**Carattoli, A.** (2009) Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**(6): 2227-2238.

**Caryl, J. A. and O´Neill A. J.** (2009) Complete nucleotide sequence of pGO1, the prototype conjugative plasmid from the staphylococci. *Plasmid* **62**(1): 35-38.

**Cascales, E. and Christie, P. J.** (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol*. **1**(2): 137-149.

**Cascales, E. and Christie, P.J.** (2004): Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**(5674): 1170-1173.

**Casetta, A., Buu Hoi, A., De Cespedes, G. and Horaud, T.** (1998) Diversity of Structures Carrying the High-Level Gentamicin Resistance Gene *(aac6-aph2)* in *Enterococcus faecalis* Strains Isolated in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(11): 2889-2892.

**Celik, E.-K., Abajy, M. Y., Saleh, M., Arends, K., Sakinc, T., Salih, R., Keller, W., and Grohmann, E.** pIP501-encoded Orf10 is a VirD4-like type IV secretion system ATPase with ssDNA binding activity (in preparation).

**Chambers, H. F. and DeLeo, F. R.** (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**(9): 629-641.

**Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J. and Waksman, G.** (2009) Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* **462**(7276): 1011-1015.

**Chen, I. and Dubnau, D.** (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Micro.* **2**(3): 241-249.

**Chen, J. and Novick, R. P.** (2009) Phage-Mediated Intergeneric Transfer of Toxin Genes. *Science* **323**(5910): 139-141.

**Chopra, I., and Roberts, M.** (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**(2): 232-260.

**Christensen, G. D., Simpson, A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. and Beachey, E. H.** (1985) Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J. Clin. Microbiol*. **22**(6): 996-1006.

**Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. and Cascales, E.** (2005) Biogenesis, Architecture, and Function of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu. Rev. Microbiol*. **59**: 451-485.

**Clewell, D.** B. (2005) Antibiotic resistance Plasmids in Bacteria. *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & Sons.

**Cotter, J. J., O´Gara, J. P., Mack, D. and Casey E.** (2009) Oxygen-Mediated Regulation of Biofilm Development is controlled by the alternative Sigma Factor $\sigma^B$ in *Staphylococcus epidermidis*. *Appl. Environ. Microbiol*. **75**(1): 261-264.

**Courvalin, P.** (2006) Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clin. Infect. Dis*. **42**(S1):25-34.

**Covacci, A. and R. Rappuoli.** (1993) Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. *Mol. Microbiol*. **8**(3): 429-434.

**Creti, R., Koch, S., Fabretti, F., Baldassarri, L. and Huebner, J.** (2006) Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC Microbiol.* **6**(1): 60.

**Dancer, S. J.** (2008) Importance of the environment in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *Lancet Infect. Dis.* **8**(2): 101-113.

**Danielsen, M.** (2002) Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Plasmid* **48**(2): 98-103.

**Das, T., Sharma, P. K., Busscher, H. J., Van der Mei, H. C. and Krom, B. P.** (2010) Role of Extracellular DNA in Initial Bacterial Adhesion and Surface Aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**(10): 3405-3408.

**Davey, M. E. and O'Toole, G. A.** (2000) Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**(4): 847-867.

**David, M. Z. and Daum, R. S.** (2010) Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clin. Microbiol. Rev*. **23**(3): 616-687.

**Davies, J.** (2007) Microbes have the last word. *EMBO Rep.* **8**(7): 616-621.

**De Boever, P., Mergeay, M., Ilyin, V., Forget-Hanus, D., Van der Auwera, G. and Mahillon, J.** (2007) Conjugation-mediated plasmid exchange between bacteria grown under space flight conditions. *Microgravity Sci. Technol.* **19**(5): 138-144.

**De Carvalho, C. C. R.** (2007) Biofilms: Recent Developments on an Old Battle. *Recent Pat. Biotechnol*. **1**(1):49-57.

**Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M. J., Espinosa, M. and Diaz-Orejas, R.** (1998) Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Micro. Molec. Bio. Reviews* **62**(2):434-464.

**DeLeo, F. R., Diep, B. an and Otto, M.** (2009) Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **23**(1): 17-34.

**Demaneche, S., Bertolla, F., Buret, F., Nalin, R., Sailland, A., Auriol, P. and Vogel, T.M.** (2001) Laboratory-scale evidence for lightning-mediated gene transfer in soil. *Appl. Environ. Microbiol*. **67**(8):3440-3444.

**Deneke, J. and Chaconas, G.** (2008) Purification and Properties of the Plasmid Maintenance Proteins from the *Borrelia burgdorferi* Linear Plasmid lp17. *J. Bacteriol.* **190**(11): 3992-4000.

**Depardieu, F., Perichon, B. and Courvalin, P.** (2004) Detection of the *van* Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol*. **42**(12): 5857-5860.

**Desmond, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. and Stanton, C.** (2005) Sequence analysis of the plasmid genome of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* NFBC338 which includes the plasmids pCD01 and pCD02. *Plasmid* **54**(2): 160-175.

**Devirgiliis, C., Coppola, D., Barile, S., Colonna, B. and Perozzi, G.** (2009) Characterization of the *Tn*916 conjugative transposon in a foodborne strain of *Lactobacillus paracasei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(12): 3866-3871.

**Di Rosa, R., Creti, R., Venditti, M., D'Amelio, R., Arciola, C. R., Montanaro, L. and Baldassarri, L.** (2006) Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **256**(1): 145-150.

**Diep, B. An, Gill, S. R., Chang, R. F., Phan, T. H., Chen, J. H., Davidson, M. G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H. A., Mongodin, E. F., Sensabaugh, G. F. and Perdreau-Remington, F.** (2006) Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* **367**(9512): 731-739.

**Dodsworth, J. A., Li, L., Wei, S., Hedlund, B. P., Leigh, J. A. and Figueiredo, P. de** (2010) Interdomain Conjugal Transfer of DNA from Bacteria to Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**(16): 5644-5647.

**Doherty, N., Trzcinski, K., Pickerill, P., Zawadzki, P. and Dowson, C. G.** (2000) Genetic Diversity of the tet(M) Gene in Tetracycline-Resistant Clonal Lineages of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(11): 2979-2984.

**Donabedian, S. M., Thal, L. A., Hershberger, E., Perri, M. B., Chow, J. W., Bartlett, P., Jones, R., Joyce, K., Rossiter, S., Gay, K., Johnson, J., Mackinson, C., Debess, E., Madden, J., Angulo, F. and Zervos, M. J.** (2003) Molecular Characterization of Gentamicin-Resistant Enterococci in the United States: Evidence of Spread from Animals to Humans through Food. *J. Clin. Microbiol* **41**(3): 1109-1113.

**Donlan, R. M**. (2008) Biofilms on Central Venous Catheters: Is Eradication Possible? In T. Romeo (Ed.), *Bacterial Biofilms*, Vol. **322**: 133-161: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

**Donlan, R. M. and Costerton, J. W.** (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**(2): 167-193.

**Dorsch, M. R.** (2007) Rapid detection of bacterial antibiotic resistance: Preliminary evaluation of PCR assays targeting Tetracycline resistance genes. Fishermans Bend, Vic.: Defence Science and Technology Organisation.

**Drlica, K. and Zhao, X.** (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**(3): 377-392.

**Duan, K., Dunn, N. W. and Kim, W. S.** (1999) Rapid plasmid DNA isolation from *Lactococcus lactis* using overnight cultures. *Biotechnol. Tech.* **13**(8): 519-521.

**Dubreuil, J. D., Giudice, G. D. and Rappuoli, R.** (2002) *Helicobacter pylori* Interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **66**(4):617-629.

**Eftekhar, F. and Speert, D. P**. (2009) Biofilm formation by persistent and non-persistent isolates of *Staphylococcus epidermidis* from a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect*. **71**(2): 112-116.

**Enne, V. I., Delsol, A. A., Roe, J. M. and Bennett, P. M.** (2004) Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**(2): 203-207.

**Evans, R. P., Jr. and F. L. Macrina**. (1983) Streptococcal R plasmid pIP501: endonuclease site map, resistance determinant location, and construction of novel derivatives. *J. Bacteriol*. **154**(3):1347-1355.

**Faria, C., Vaz-Moreira, I., Serapicos, E., Nunes, O. C. and Manaia, C. M.** (2009) Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Sci. Total Environ.* **407**(12): 3876-3882.

**Faunce, T. and Watal, A.** (2010) Nanosilver and global public health: international regulatory issues. *Nanomedicine* **5**(4): 617-632.

**Feld, L., Bielak, E., Hammer, K. and Wilcks, A.** (2009) Characterization of a small erythromycin resistance plasmid pLFE1 from the food-isolate *Lactobacillus plantarum* M345. *Plasmid* **61**(3): 159-170.

**Ferguson, J. K.** (2009) Preventing healthcare-associated infection: risks, healthcare systems and behaviour. *Intern. Med. J.* 39(9): 574-581.

**Ferry, T., Perpoint, T., Vandenesch, F. and Etienne, J.** (2005) Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Curr. Infect. Dis. Rep*. **7**(6):420-428.

**Fey, P. D. and Olson, M. E.** (2010) Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* **5**(6): 917-933.

**Firth, N. and R. A. Skurray.** (2006) Genetics: accessory elements and genetic exchange, p. 413-426. In Fischetti, V. A., Novick, R. P. and Ferretti, J. J. (ed.), Gram-positive pathogens 2nd edition. ASM Press, Washington, D. C.

**Firth, N., Ridgway, K. P., Byrne, M. E., Fink, P. D., Johnson, L., Pauslsen, I. T. and Skurray, R. A.** (1993) Analysis of a transfer region from the staphylococcal conjugative plasmid pSK41. *Gene* **136**(1-2): 13-25.

**Fisher, K. and Phillips, C.** (2009) The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus*. Microbiology* **155**(6): 1749-1757.

**Flemming, H.-C. and Wingender, J.** (2001) Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biologie in unserer Zeit* **31**(3): 169-180.

**Flemming, H.-C. and Wingender, J.** (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Micro.* **8**(9): 623-633.

**Forbes, B. A.** (2009) Issues in the Identification and Susceptibility Testing of Staphylococci: *Staphylococci in Human Disease:* Wiley-Blackwell.

**Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and Vuyst, L. de** (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**(1): 1-24.

**Francia, M. V., Haas, W., Wirth, R., Samberger, E., Muscholl-Silberhorn, A., Gilmore, M. S., Ike, Y., Weaver, K. E., An, F. Y. and Clewell, D. B.** (2001) Completion of the nucleotide sequence of the *Enterococcus faecalis* conjugative virulence plasmid pAD1 and identification of a second transfer origin. *Plasmid* **46**(2): 117-127.

**Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C. and La Cruz, F. de** (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**(1): 79-100.

**Francolini, I. and Donelli, G.** (2010) Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**(3): 227-238.

**Fronzes, R., Schäfer, E., Wang, L., Saibil, H.R., Orlova, E.V. and Waksman G.** (2009) Structure of a Type IV Secretion System Core Complex. *Science* **323**(5911): 266-268.

**Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. and Toussaint, A.** (2005) Mobile Genetic Elements: The Agents of open source Evolution. *Nature* **3**(9): 722-732.

**Fürch, S.** (2010) Molekularbiologische Untersuchungen von pathogenen *Staphylococcus*-Isolaten in Bezug auf Antibiotikaresistenzen, mobile genetische Elemente (MGEs) und Biofilmbildung. Diplomarbeit.

**Gandara, A., Mota, L. C., Flores, C., Perez, H. R., Green, C. F. and Gibbs, S. G.** (2006) Isolation of *Staphylococcus aureus* and Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* from Residential Indoor Bioaerosols. *Environ. Health Perspect.* **114**(12): 1859-1864.

**Garcia-Migura, L., Hasman, H. and Jensen, L.** (2009) Presence of pRI1: A Small Cryptic Mobilizable Plasmid Isolated from *Enterococcus faecium* of Human and Animal Origin. *Curr. Microbiol.* **58**(2): 95-100.

**Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V. and La Cruz, F. de.** (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**(3): 657-687.

**Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Llaca-Díaz, J. M. and Rodriguez-Noriega, E.** (2010) Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiol. Infect.* **138**(5): 645-654.

**Gastmeier, P., Schwab, F., Bärwolff, S., Rüden, H. and Grundmann, H.** (2006) Correlation between the genetic diversity of nosocomial pathogens and their survival time in intensive care units. *J. Hosp. Infect*. **62**(2): 181-186.

**Gevers, D., Huys, G. and Swings, J.** (2003) In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**(1): 125-130.

**Gilbert, Y., Veillette, M. and Duchaine, C.** (2010) Airborne bacteria and antibiotic resistance genes in hospital rooms. *Aerobiologia* **26**(3): 185-194.

**Gonzalez, C. F and Kunka, B. S.** (1983) Plasmid Transfer in *Pediococcus* sp.: Intergeneric and Intrageneric Transfer of pIP501. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(1): 81-89.

**Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. A. F. de and Shah, N. P.** (2010) Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. **9**(5): 455-470.

**Grohmann, E.** (2010) Autonomous plasmid-like replication of *Bacillus* ICEBs1: a general feature of integrative conjugative elements? *Mol. Microbiol*. **75** (2): 261-263.

**Grohmann, E., Muth, G. and Espinosa, M.** (2003) Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**(2): 277-301.

**Gryczan, T., Israeli-Reches, M., Del Bue, M. and Dubnau D.** (1984) DNA sequence and regulation of *ermD,* a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance element from *Bacillus licheniformis. Mol. Gen. Genet*. **194**(3):349-356.

**Guéguinou, N., Huin-Schohn, C., Bascove, M., Bueb, J.-L., Tschirhart, E., Legrand-Frossi, C. and Frippiat, J.-P.** (2009) Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth´s orbit? *J. Leukoc. Biol.* **86**(5): 1027-1038.

**Hahn, S.** (2008) Molekularbiologische Untersuchungen an bakteriellen Isolaten der Antarktisstation CONCORDIA und der Internationalen Raumstation ISS in bezug auf Biofilmbildung, konjugativen Transfer und Plasmidmobilisierung.

**Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P.** (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* **11**(7): 1034-1043.

**Hanssen, A. M. and Ericson Sollid, J. U.** (2006) SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**(1): 8-20.

**Hanssen, A.-M., Kjeldsen, G. and Sollid, J. U. E.** (2004) Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer? *Antimicrob. Agents Chemother*. **48**(1): 285-296.

**Harmsen, D., Rothgänger, J., Frosch, M. and Albert, J.** (2002) RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms Database. *Nucleic Acids Res.* **30**(1): 416-417.

**Hauschild, T., Lüthje, P. and Schwarz, S.** (2005) Staphylococcal tetracycline-$MLS_B$ resistance plasmid pSTE2 is the product of an $RS_A$-mediated *in vivo* recombination *J. Antimicrob. Chemother*. **56**(2): 399-402.

**Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T. M., Werner, G. and Sundsfjord, A.** (2010) Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect*. **16**(6): 541-554.

**Heinz, M., Wintzingerode, F. von, Moter, A., Halle, E., Lohbrunner, H., Kaisers, U. and Neuhaus, P.** (2000) A Case of Septicemia with *Pediococcus acidilactici* After Long-Term Antibiotic Treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**(12): 946-948.

**Hendrickx, A. P. A., Willems, R. J. L., Bonten, M. J. M. and Van Schaik, W.** (2009) LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol.* **17**(9): 423-430.

**Hickey, R. M., Twomey, D. P., Ross, R. P. and Hill, C.** (2001) Exploitation of Plasmid pMRC01 To Direct Transfer of Mobilizable Plasmids into Commercial Lactococcal Starter Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(6): 2853-2858.

**Hirt, H., Manias, D. A., Bryan, E. M., Klein, J. R., Marklund, J. K., Staddon, J. H., Paustian, M. L., Kapur, V. and Dunny, G. M**. (2005) Characterization of the pheromone response of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pCF10: complete sequence and comparative analysis of the transcriptional and phenotypic responses of pCF10-containing cells to pheromone induction. *J. Bacteriol*. **187**(3): 1044-1054.

**Horinouchi, S. and Weisblum, B.** (1982) Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* **150**(2): 815-825.

**Horneck, G., Klaus, D. M. and Mancinelli, R. L.** (2010) Space Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**(1): 121-156.

**Hotopp, J. C. D., Clark, M. E., Oliveira, D. C. S. G., Foster, J. M., Fischer, P., Torres, M. C. M., Giebel, J. D., Kumar, N., Ishmael, N., Wang, S., Ingram, J., Nene, R. V., Shepard, J., Tomkins, J., Richards, S., Spiro, D. J., Ghedin, E., Slatko, B. E., Tettelin, H. and Werren, J. H.** (2007) Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. *Science* **317**(5845): 1753-1756.

**Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H. and Franz, C. M. A. P.** (2007) Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(3): 730-739.

**Ike, Y., Craig, R. A., White, B. A., Yagi, Y. and Clewell, D. B.** (1983) Modification of *Streptococcus faecalis* sex pheromones after acquisition of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**(17): 5369-5373.

**International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements** (IWG-SCC) (2009) Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(12): 4961-4967.

**Iordanescu, S.** (1976) Temperature-sensitive mutant of a tetracycline resistance staphylococcal plasmid. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbial*. **35**(3): 257-264.

**Ito, Y., Kawai, Y., Arakawa, K., Honme, Y., Sasaki, T. and Saito, T.** (2009) Conjugative Plasmid from *Lactobacillus gasseri* LA39 That Carries Genes for Production of and immunity to the Circular Bacteriocin Gassericin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(19): 6340-6351.

**Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B. and Kaplan, J. B.** (2008) Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(2): 470-476.

**Jabbouri, S. and Sadovskaya, I.** (2010) Characteristics of the biofilm matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of *Staphylococcus epidermidis* associated with medical implant infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* **59**(3): 280-291.

**Jacob, A.E., Hobbs, S.J.** (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *S. faecalis var. zymogenes*. *J. Bacteriol*. **117**(2): 360-372.

**Jefferson, K. K.** (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* **236**(2): 163-173.

**Jensen, L. B., Garcia-Migura, L., Valenzuela, A. J. S., Løhr, M., Hasman, H. and Aerestrup, F. M.** (2010) A classification system for plasmids from Enterococci and other Gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Methods* **80**(1): 25-43.

**Jensen, S. O. and Lyon, B. R.** (2009) Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* **4**(5): 565-582.

**Johnsborg, O., Eldholm, V. and Håvarstein, L. S.** (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function: Microbial genomics. *Res. Microbiol.* **158**(10): 767-778.

**Juhas, M., Derrick, W. C. and Derek W. H.** (2008) Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell. Microbiol.* **10**(12): 2377-2386.

**Kajiura, T., Wada, H., Ito, K., Anzai, Y., & Kato, F.** (2006) Conjugative Plasmid Transfer in the Biofilm Formed by *Enterococcus faecalis*. *J. Health Sci.* **52**(4): 358-367.

**Karatan, E. and Watnick, P.** (2009) Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**(2): 310-347.

**Karunakaran, E. and Biggs, C.** (2011) Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**(4): 1161-1175.

**Kerr, J. E. and Christie, P. J.** (2010) Evidence for VirB4-Mediated Dislocation of Membrane-Integrated VirB2 Pilin during Biogenesis of the *Agrobacterium* VirB/VirD4 Type IV Secretion System. *J. Bacteriol* **192**(19): 4923-4934.

**Kim, H.-S., Choi, E.-C. and Kim, B.-K.** (1993) A Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinant from *Bacillus anthracis* 590: Cloning and Expression of ermJ. *J. Gen. Microbiol*. **139**(3): 601-607.

**Kim, J.-H., Sunako, M., Ono, H., Murooka, Y., Fukusaki, E. and Yamashita, M.** (2008) Characterization of Gene Encoding Amylopullulanase from Plant-Originated Lactic Acid Bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137. *J. Biosci. Bioeng.* **106**(5): 449-459.

**Kiran, G. S., Sabarathnam, B. and Selvin, J.** (2010) Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**(3): 432-438.

**Klaenhammer, T. R.** (1984) A general method for plasmid isolation in lactobacilli. *Curr. Microbiol.* **10**(1): 23-28.

**Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W. and Goossens, H.** (2007) Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother*. **59**(5): 900-912.

**Klein, J. R., Chen, Y., Manias, D. A., Zhuo, J., Zhou, L., Peebles, C. L. and Dunny, G. M.** (2004) A Conjugation-Based System for Genetic Analysis of Group II Intron Splicing in Lactococcus lactis. *J. Bacteriol* **186**(7): 1991-1998.

**Klingenberg, C., Aarag, E., Rønnestad, A., Sollid, J. E., Abrahamsen, T. G., Kjeldsen, G. and Flaegstad, T.** (2005) Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr. Infect. Dis*. J. **24**(9): 817-822.

**Knittel, I.** (2010) Biotechnologische und molekulare Charakterisierung von Antibiotika resistenten Milchsäurebakterien aus Milch- und Fleischprodukten. Praxisarbeit.

**Knittel, I.** (2010) Identifizierung von Antibiotika resistenten Milchsäurebakterien aus fermentierten Milch- und Fleischprodukten sowie molekulare Charakterisierung bezüglich Plasmidtransfer und Antibiotikaresistenzen. Bachelorarbeit.

**Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C. and Hübner, J.** (2004) Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities: Possibilities for Active and Passive Vaccination against Opportunistic Infections. *Vaccine* **22**(7): 822-830.

**Korem, M., Gov, Y., Kiran, M. D. and Balaban, N.** (2005) Transcriptional Profiling of Target of RNAIII-Activating Protein, a Master Regulator of Staphylococcal Virulence. *Infect. Immun.* **73**(10): 6220-6228.

**Krause, S., Pansegrau, W., Lurz, R., de la Cruz, F. and Lanka, E.** (2000) Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J. Bacteriol*. **182**(10): 2761-2770.

**Kumar, R. B. and Das, A.** (2002) Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Mol. Microbiol*. **43**(6): 1523-1532.

**Kurenbach, B.** (2004) Konjugativer DNA-Transfer zwischen gram-positiven und gram-negativen Bakterien: Transferkomponenten des Multiresistenzplasmids pIP501 aus *Streptococcus agalactiae*. Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland.

**Kurenbach, B., Kopec, J., Magdefrau, M., Andreas, K., Keller, W., Bohn, C., Abajy, M. Y. and Grohmann, E.** (2006) The TraA relaxase autoregulates the putative type IV secretion-like system encoded by the broad-host-range Streptococcus agalactiae plasmid pIP501. *Microbiology* **152**(3): 637-645.

**Lee, C. A., and Grossman, A. D**. (2007) Identification of the origin of transfer (*oriT*) and DNA relaxase required for conjugation of the integrative and conjugative element ICE*Bs1* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189**(20): 7254-7261.

**Leplae, R., Lima-Mendez, G. and Toussaint, A.** (2006) A first global analysis of plasmid encoded proteins in the ACLAME database. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**(6): 980-994.

**Leplae, R., Lima-Mendez, G. and Toussaint, A.** (2010) ACLAME: A CLAssification of Mobile genetic Elements, update 2010. *Nucleic Acids Res.* **38**(S1): 57-61.

**Li, X., Hauer, B. and Rosche, B.** (2007) Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**(6): 1255-1262

**Lim, S-K., Tanimoto, K., Tomita, H. and Ike, Y.** (2006) Pheromone-Responsive Conjugative Vancomycin Resistance Plasmids in *Enterococcus faecalis* Isolates from Humans and Chicken Feces. *Appl. Environ. Microbiol*. **72**(10): 6544-6553.

**Lindsay, J. A.** (2010). Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol*. **300**(2-3): 98-103.

**López, D., Vlamakis, H. and Kolter, R. (2010)** Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**(7): 1-12.

**Lynch, S. V., Mukundakrishnan, K., Benoit, M. R., Ayyaswamy, P. S. and Matin, A.** (2006) Escherichia coli Biofilms Formed under Low-Shear Modeled Microgravity in a Ground-Based System. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(12): 7701-7710.

**MacFaddin, J. F.** (1985) Media for the isolation-cultivation-maintenance of medical bacteria. Volume 1. Williams and Wilkins, Baltimore, London.

**Maeda, S., Ito, M., Ando, T., Ishimoto, Y., Fujisawa, Y., Takahashi, H., Matsuda, A., Sawamura, A. and Kato, S.** (2006) Horizontal transfer of nonconjugative plasmids in a colony biofilm of Escherichia coli. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**(1): 115-120.

**Magi, G., Capretti, R., Paoletti, C., Pietrella, M., Ferrante, L., Biavasco, F., Varaldo, P. E. and Facinelli, B.** (2003) Presence of a *vanA*-Carrying Pheromone Response Plasmid (pBRG1) in a Clinical Isolate of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**(5): 1571-1576.

**Malachowa, N. and DeLeo, F.** (2010) Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**(18): 3057-3071.

**Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J. and Wade, W. G.** (1998) Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(2): 795-799.

**Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martínez-Solano, L. and Sánchez, M. B.** (2009) A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**(1): 44-65.

**Mater D. D. G., Langella P., Corthier G. and Flores M.-J.** (2008) A Probiotic *Lactobacillus* Strain Can Acquire Vancomycin Resistance during Digestive Transit in Mice. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **14**(1-3):123-127.

**Mathur, S. and Singh, R.** (2005) Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria--a review. *Int. J. Food Microbiol*. **105**(3): 281-295.

**Matin, A., and S. Lynch, and M. R. Benoit**. (2006) Increased bacterial resistance and virulence in simulated microgravity and its molecular basis. *Gravitational and Space Biology* **19**(2): 31-42.

**McDougal, L. K., Fosheim, G. E., Nicholson, A., Bulens, S. N., Limbago, B. M., Shearer, J. E. S., Summers, A. O. and Patel, J. B.** (2010) Emergence of Resistance among USA300 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Causing Invasive Disease in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**(9): 3804-3811.

**McPhee, J. C. and White, R. J**. (2003) Physiology, medicine, long-duration space flight and the NSBRI. *Acta Astronaut*. **53**: 239-248.

**Medema, M. H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., Van den Berg, M., Müller, U., Heijne, W., Wu, L., Alam, M. T., Ronning, C. M., Nierman, W. C., Bovenberg, R. A. L., Breitling, R. and Takano, E.** (2010) The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol. Evol*. **12**(2): 212-224.

**Mende, L.** (2010) Biotechnological and molecular characterisation of antibiotic resistant lactic acid bacteria isolated from dairy products. Projektarbeit.

**Merlin, C., Mahillon J., Nesvera J. and Toussaint A.** (2000) Gene recruiters and transporters: the modular structure of bacterial mobile elements. In *The horizontal gene pool: bacterial plasmids and gene spread* (ed. C.M. Thomas), pp. 363-409. *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam.

**Miele, A., Bandera, M. and Goldstein, B. P.** (1995) Use of Primers Selective for Vancomycin Resistance Genes To Determine *van* Genotype in Enterococci and To Study Gene Organization in VanA Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*. **39**(8): 1772-1778.

**Mills, D. A., Phister, T. G., Dunny, G. M. and McKay, L. L.** (1998) An Origin of Transfer (*oriT*) on the Conjugative Element pRS01 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(4): 1541-1544.

**Mills, S., McAuliffe, O. E., Coffey, A., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P.** (2005) Plasmids of lactococci-genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol. Rev*. **30**(2):243-273.

**Mohamed, J. A. and Huang, D. B.** (2007) Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol*. **56**(12): 1581-1588.

**Molin, S. and Tolker-Nielsen, T.** (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**(3): 255-261.

**Møller-Jensen, J. and Gerdes, K.** (2007) Plasmid segregation: spatial awareness at the molecular level. *J. Cell Biol.* **179**(5): 813-815.

**Monod, M., Mohan, S. and Dubnau, D.** (1987) Cloning and Analysis of *ermG*, a New Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Element from *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.* **169**(1): 340-350.

**Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Takamiya, A. S., Ruvollo-Filho, A. C., de Camargo, E. R. and Barbosa, D. B.** (2009) The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int. J. Antimicrob. Agents* **34**(2): 103-110.

**Mullis, K. B., Fallona, F. A., Scharf, S., Randall, S., Horn, G. and Ehrlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Sping Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**(1): 263-273.

**Mulvey, M. R. P. and Simor, A. E. M.** (2009) Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *CMAJ* **180**(4): 408-415.

**Neu, T., Swerhone, G. D. W. and Lawrence, J. R.** (2001) Assessment of lectin-binding analysis for *in situ* detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiol.* **147**(2)**:** 299-313.

**Novikova N., De Boever P., Poddubko S., Deshevaya E., Polikarpov N., Rakova N., Coninx I. and Mergeay M.** (2006) Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Res. Microbiol*. **157**(1): 5-12.

**Oliveira, A. and Cunha, M. L. de** (2010) Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res. Notes* **3**(1): 260-267.

**Ong, C.-L. Y., Beatson, S. A., McEwan, A. G. and Schembri, M. A.** (2009) Conjugative plasmid transfer and adhesion dynamics in an *Escherichia coli* biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(21): 6783-6791.

**O'Sullivan, O., O'Callaghan, J., Sangrador-Vegas, A., McAuliffe, O., Slattery, L., Kaleta, P., Callanan, M., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. and Beresford, T.** (2009) Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.* **9**: 50-58.

**Otto, M.** (2008) Staphylococcal Biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. **322**: 207-228.

**Otto, M.** (2009) *Staphylococcus epidermidis*-the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Micro.* **7**(8): 555-567.

**Palmer, K. L., Kos, V. N. and Gilmore, M. S**. (2010) Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**(5): 632-639.

**Papagianni, M. and Anastasiadou, S.** (2009) Pediocins: The bacteriocins of Pediococci. Sources, production, properties and applications. *Microb. Cell Fact.* **8**(1): 1-16.

**Paulsen, I. T., Banerjei, L., Myers, G. S. A., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R., Heidelberg, J. F., Tettelin, H., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Durkin, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., Vamathevan, J., Tran, B., Upton, J., Hansen, T., Shetty, J., Khouri, H., Utterback, T., Radune, D., Ketchum, K. A., Dougherty, B. A. and Fraser, C. M.** (2003) Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**(5615): 2071-2074.

**Peeters, E., Nelis, H. J. and Coenye, T.** (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods* **72**(2): 157-165.

**Pérez-Roth, E., Kwong, S. M., Alcoba-Florez, J., Firth, N. and Mendez-Alvarez, S.** (2010) Complete Nucleotide Sequence and Comparative Analysis of pPR9, a 41.7-Kilobase Conjugative Staphylococcal Multiresistance Plasmid Conferring High-Level Mupirocin Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**(5): 2252-2257.

**Périchon, B. and Courvalin, P.** (2009) VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(11): 4580-4587.

**Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. and Teuber. M.** (1997) Antibiotic resistance spread in food. *Nature* **389**(6653): 801-802.

**Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P. and Frey J.** (2005). Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol*. **43**(5): 2291-2302.

**Phillips, G. and Funnell, B. E.** (2004) Plasmid biology. ASM Press.

**Prescha, K.** (2009) Studien zur Antibiotikaresistenz und zum horizontalen Gentranfer von *Staphylococcus* Isolaten der Internationalen Raumstation (ISS) und der Antarktis Forschungsstation Concordia. Diplomarbeit.

**Projan, S. J. and Archer, G. L.** (1989) Mobilization of the relaxable *Staphylococcus aureus* plasmid pC221 by the conjugative plasmid pGO1 involves three pC221 loci. *J. Bacteriol.* **171**(4): 1841-1845.

**Queck, S. Y.**, **Khan, B. A.**, **Wang, R.**, **Bach, T. H.**, **Kretschmer, D.**, **Chen, L.**, **Kreiswirth, B. N.**, **Peschel, A.**, **Deleo, F. R. and Otto M**. (2009) Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. *PLoS pathogens* **5**(7): e1000533.

**Rangrez, A., Abajy, M., Keller, W., Shouche, Y. and Grohmann, E.** (2010) Biochemical characterization of three putative ATPases from a new type IV secretion system of *Aeromonas veronii* plasmid pAC3249A. *BMC Biochemistry* **11**(1): 10-17.

**Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A., Lewandowski, Z., Davison, W. M., Buckingham-Meyer, K. and Stewart, P. S.** (2007) Spatial Patterns of DNA Replication, Protein Synthesis, and Oxygen Concentration within Bacterial Biofilms Reveal Diverse Physiological States. *J. Bacteriol.* **189**(11): 4223-4233.

**Rashkova, S., Spudich, G. M. and Christie, P. J.** (1997) Characterization of membrane and protein interaction determinants of the Agrobacterium tumefaciens VirB11 ATPase. *J. Bacteriol* **179**(3): 583-591.

**Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S. and Ravel, J.** (2005) Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**(2): 303-329.

**Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Okstad, O. A., Fouts, D. E., Jiang, L., Cer, R. Z., Kolsto, A.-B., Gill, S. R. and Ravel, J.** (2007) Complete Sequence Analysis of Novel Plasmids from Emetic and Periodontal *Bacillus cereus* Isolates Reveals a Common Evolutionary History among the *B. cereus*-Group Plasmids, Including *Bacillus anthracis* pXO1. *J. Bacteriol*. **189**(1): 52-64.

**Rice, L. B.** (1998). Tn*916* Family conjugative Transposons and Dissemination of Antimicrobial Resistance Determinants. *Antimicrob. Agents Chemother*. **42**(8): 1871-1877.

**Rintala, H., Pitkaranta, M., Toivola, M., Paulin, L. and Nevalainen, A**. (2008) Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiol.* **8**(1): 56-68.

**Roberts, M. C.** (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **245**(2): 195-203.

**Roberts, M. C.** (2008) Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett*. **282**(2): 147-159.

**Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J. and Seppala, H.** (1999) Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**(12): 2823-2830.

**Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J. and Oliveira, R.** (2006) Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**(4): 609-618.

**Rodríguez-Alonso, P., Fernández-Otero, C., Centeno, J. A. and Garabal, J. I.** (2009) Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and *Micrococcaceae/Staphylococcaceae* Isolates from Artisanal Raw Milk Cheeses, and Potential Implications on Cheese Making. *J. Food Sci.* **74**(6): M284-M293.

**Rogowski, K. M.** (2009) Untersuchung von Gram-positiven bakteriellen Isolaten der CONCORDIA Forschungsstation auf Antibiotika-Resistenzen und Transfergene mit PCR. Praxisarbeit.

**Rogowski, K. M.** (2010) Konjugativer Plasmidtransfer in Gram-positiven Bakterien: Studien zur DNA-Bindung und zum Plasmidtransfer zwischen Enterokokken und Staphylokokken. Bachelorarbeit.

**Rosado, H., Doyle, M., Hinds, J. and Taylor, P. W.** (2010) Low-shear modelled microgravity alters expression of virulence determinants of *Staphylococcus aureus*. *Acta Astronautica* **66**(3-4): 408-413.

**Rosenzweig, J., Abogunde, O., Thomas, K., Lawal, A., Nguyen, Y.-U., Sodipe, A. and Jejelowo, O.** (2010) Spaceflight and modeled microgravity effects on microbial growth and virulence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**(4): 885-891.

**Ruiz, N., Kahne, D. and Silhavy, T. J.** (2006) Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat. Rev. Micro.* **4**(1): 57-66.

**Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T. Ehrlich, H.A. and Arnheim, N.** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**(4732): 1350-1354.

**Sambrook, J. and Russel, D.W.** (2001) Preparation of plasmid DNA by Alkaline lysis with SDS, p.31-34. N. Irwing (ed.), Molecular cloning. *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Sanford, B. A., Thomas, V. L., Mattingly, S. J., Ramsay, M. A. and Miller, M. M.** (1995) Lectin-biotin assay for slime present in *in situ* biofilm produced by *Staphylococcus epidermidis* using transmission electron microscopy (TEM). *J. Industrial Microbiol*. **15**(3): 156-161.

**Sava, I. G., Heikens, E. and Hübner, J.** (2010) Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**(6): 533-540.

**Scheffers, D. and Pinho, M. G.** (2005) Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **69**(4): 585-607.

**Schmeisser, C., Liesegang, H., Krysciak, D., Bakkou, N., Le Quere, A., Wollherr, A., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Pommerening-Roser, A., Flores, M., Palacios, R., Brenner, S., Gottschalk, G., Schmitz, R. A., Broughton, W. J., Perret, X., Strittmatter, A. W. and Streit, W. R.** (2009) *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Possesses a Remarkable Number of Secretion Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(12): 4035-4045.

**Schmidt, H. and Hensel, M.** (2004). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**(1): 14-56.

**Schroeder, K., Jularic, M., Horsburgh, S. M., Hirschhausen, N., Neumann, C., Bertling, A., Schulte, A., Foster, S., Kehrel, B. E., Peters, G. and Heilmann, C.** (2009) Molecular Characterization of a Novel *Staphylococcus aureus* Surface Protein (SasC) Involved in Cell Aggregation and Biofilm Accumulation. *PLoS ONE* **4**(10): e7567.

**Schwarz, F. V., Perreten, V. and Teuber, M.** (2001) Sequence of the 50-kb Conjugative Multiresistance Plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. *Plasmid* **46**(3): 170-187.

**Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B. and Cloeckaert, A.** (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**(5): 519-542.

**Scott, R. and Sullivan, W. C.** (2008) Ecology of Fermented Food. *Human Ecology Review* 15(1): 25-31.

**See, J. R. H., Czachor, J. S. and Brown, G. R.** (2006) *Lactobacillus* Endocarditis: Case Report and Literature Review. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **14**(3): 134-136.

**Settanni, L. and Moschetti, G.** (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* **27**(6): 691-697.

**Shrestha, A., Shi, Z., Neoh, K. G. and Kishen, A.** (2010) Nanoparticulates for Antibiofilm Treatment and Effect of Aging on Its Antibacterial Activity. *J. Endod.* **36**(6): 1030-1035.

**Silbergeld, E. K., Graham, J. and Price, L. B.** (2008) Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. *Annu. Rev. Public. Health* **29**(1): 151-169.

**Simões, L. C., Simões, M. and Vieira, M. J.** (2007) Biofilm Interactions between Distinct Bacterial Genera Isolated from Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol* **73**(19): 6192-6200.

**Singh, R., Paul, D. and Jain, R. K.** (2006) Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol.* **14**(9): 389-397.

**Sivanesan, D., Hancock, M. A., Villamil Giraldo, A. M. and Baron, C.** (2010) Quantitative analysis of VirB8-VirB9-VirB10 interactions provides a dynamic model of type IV secretion system core complex assembly. *Biochemistry* **49**(21): 4483-4493.

**Smalla, K. and Sobecky, P. A.** (2002) The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**(2): 165-175.

**Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C. and La Cruz, F. de** (2010) Mobility of Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**(3): 434-452.

**Soge, O. O., Beck, N. K., White, T. M., No, D. B. and Roberts, M. C.** (2008) A novel transposon, Tn*6009*, composed of Tn*916* element linked with *Staphylococcus aureus* mer operon. *J. Antimicrob. Chemother*. **62**(4): 674-680.

**Solheim, M., Aakra, A., Snipen, L., Brede, D. and Nes, I.** (2009) Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants. *BMC Genomics* 10(1): 194-205.

**Solheim, M., Brekke, M., Snipen, L., Willems, R., Nes, I. and Brede, D.** (2011) Comparative genomic analysis reveals significant enrichment of mobile genetic elements and genes encoding surface structure-proteins in hospital-associated clonal complex 2 *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiol.* **11**(1): 3-14.

**Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N. and Wuertz, S.** (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat. Rev. Micro.* **3**(9): 700-710.

**Southern, E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNS fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol*. **98**(3): 503-517.

**Stein, G. and Craig, W.** (2006) Reviews of Anti-infective Agents: Tigecycline: A Critical Analysis. *Clin. Infect. Dis.* **43**(4): 518-524.

**Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. and Granum, P. E.** (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**(4): 579-606.

**Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M.** (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* **40**(2): 175-179.

**Stewart, P. S. and Franklin, M. J.** (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Micro.* **6**(3): 199-210.

**Strahilevitz, J. and Hooper, D. C.** (2009) Resistance to Other Agents in *Staphylococci in Human Disease*: Wiley-Blackwell.

**Sudhamani, M., Ismaiel, E., Geis, A., Batish, V. and Heller, K. J.** (2008) Characterisation of pSMA23, a 3.5 kbp plasmid of *Lactobacillus casei*, and application for heterologous expression in *Lactobacillus*. *Plasmid* **59**(1): 11-19.

**Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W. and Schleifer, K. H.** (2000) Microbiological Safety of drinking water. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**(1): 81-127.

**Tang, J. W.** (2009) The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J. R. Soc. Interface* **6**(S6): S737-S746.

**Tanimoto, K. and Ike, Y.** (2008) Complete nucleotide sequencing and analysis of the 65-kb highly conjugative Enterococcus faecium plasmid pMG1: identification of the transfer-related region and the minimum region required for replication. *FEMS Microbiol. Lett.* **288**(2): 186-195.

**Tato I, Zunzunegui S., de la Cruz F. and Cabezon E.** (2005) TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA dependent ATPase*. Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**(23): 8156-8161.

**Tenover, F. C. and Goering, R. V.** (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**(3): 441-446.

**Tenover, F. C. and Rasheed, J. K.** (2004) Detection of antimicrobial resistance genes and mutations associated with antimicrobial resistance in microorganisms. Molecular Microbiology diagnostics principles and practice. (Chapter 31) ASM Press, Washington D.C.

**Theilacker, C., Sanchez-Carballo, P., Toma, I., Fabretti, F., Sava, I., Kropec, A., Holst, O. and Huebner, J.** (2009) Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **71**(4): 1055-1069.

**Thirsk, R., Kuipers, A., Mukai, C. and Williams, D.** (2009) The space-flight environment: the International Space Station and beyond. *CMAJ* **180**(12): 1216-1220.

**Timmery, S.** (2007) pXO16 from *Bacillus thuringiensis*: conjugation, mobilisation and retromobilisation. Post graduate thesis.

**Timmery, S., Hu, X. and Mahillon, J.** (2011) Characterization of Bacilli isolated from the confined Environments of the Antarctic Concordia Station and the International Space Station. *Astrobiology* 11(4): 323-334.

**Tomich, P. K., An, F. Y., Damale, S. P. and Clewell, D. B.** (1979) Plasmid-Related Transmissibility and Multiple Drug Resistance in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes* Strain DS16. *Antimicrob. Agents Chemother*. **15**(6): 828-830.

**Toomey, N., Monaghan, A., Fanning, S. and Bolton, D.** (2009) Transfer of Antibiotic Resistance Marker Genes between Lactic Acid Bacteria in Model Rumen and Plant Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(10): 3146-3152.

**Toomey, N., Monaghan, Ã., Fanning, S. and Bolton, D. J.** (2009) Assessment of Antimicrobial Resistance Transfer Between Lactic Acid Bacteria and Potential Foodborne Pathogens Using *In Vitro* Methods and Mating in a Food Matrix. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**(8): 925-933.

**Truesdale, G. A, Downing, A. L. and Lowden, G. F.** (1955) The solubility of oxygen in pure water and sea water. *J. Appl. Chem*. **5**(2): 53-62.

**Trzcinski, K., Cooper, B. S., Hryniewicz, W. and Dowson, C. G.** (2000) Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**(6): 763-770.

**Vakulenko, S. B. and Mobashery, S.** (2003) Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clin. Microbiol. Rev*. **16**(3): 430-450.

**Van Houdt R., De Boever P., Coninx I., Le Calvez C., Dicasillati R., Mahillon J., Mergeay M. and Leys N.** (2009) Evaluation of the airborne bacterial population in the periodically confined Antarctic base Concordia. *Microb. Ecol*. **57**(4): 640-648.

**Van Kranenburg, R., Golic, N., Bongers, R., Leer, R. J., Vos, W. M. de, Siezen, R. J. and Kleerebezem, M.** (2005) Functional Analysis of Three Plasmids from *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(3): 1223-1230.

**Van Kregten, M., Lindhout, B. I., Hooykaas, P. J. J. and Van der Zaal, B. J.** (2009) *Agrobacterium*-Mediated T-DNA Transfer and Integration by Minimal VirD2 Consisting of the Relaxase Domain and a Type IV Secretion System Translocation Signal. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**(11): 1356-1365.

**Vergunst, A. C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., Vlaam, C. M. T. de, Regensburg-Tuïnk, T. J. G. and Hooykaas, P. J. J.** (2000) VirB/D4-Dependent Protein Translocation from Agrobacterium into Plant Cells. *Science* **290**(5493): 979-982.

**Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E. and Matar, C.** (2006) Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine* **36**(5-6): 254-260.

**Voskuil, M. and Chambliss G. H.** (1993) Rapid isolation and Sequencing of purified Plasmid DNA from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(4): 1138-1142.

**Vriesema, A. J. M., Zaat, S. A. J. and Dankert, J.** (1996) A Simple Procedure for Isolation of Cloning Vectors and Endogenous Plasmids from Viridans Group Streptococci and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol*. **62**(9): 3527-3529.

**Wallden, K., Rivera-Calzada, A. and Waksman, G.** (2010) Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell. Microbiol.* **12**(9): 1203-1212.

**Ward, D. V., Draper, O., Zupan, J. R. and Zambryski, P. C.** (2002) Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens vir*-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *PNAS* **99**(17): 11493-11500.

**Wardal, E., Sadowy, E. and Hryniewicz, W.** (2010) Compex Nature of Enterococcal Pheromone-Responsive Plasmids. *Pol. J. Microbiol*. **59**(2): 79-87.

**Weaver, K. E., Kwong, S. M., Firth, N. and Francia, M. V.** (2009) The RepA_N replicons of Gram-positive bacteria: a family of broadly distributed but narrow host range plasmids. *Plasmid* **61**(2): 94-109.

**Weber, D. J., Rutala, W. A., Miller, M. B., Huslage, K. and Sickbert-Bennett, E.** (2010) Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am. J. Infect. Control* **38**(5): S25-S33.

**Weigel, L. M., Clewell, D. B., Gill, S. R., Clark, N. C., McDougal, L. K., Flannagan, S. E., Kolonay, J. F., Shetty, J., Killgore, G. E. and Tenover, F. C.** (2003) Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* **302**(5650): 1569-1571

**Werckenthin, C., Schwarz, S. and Roberts, M. C.** (1996) Integration of pT181-like tetracycline resistance plasmids into large staphylococcal plasmids involves IS257. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**(11): 2542-2544.

**Werner, G., Freitas, A. R., Coque, T. M., Sollid, J. E., Johnsen, P. J., Lester, C., Hammerum, A. M., Garcia-Migura, L., Jensen, L. B., Francia, M. V., Witte, W. Willems, R. J., Sundsfjord, A.** (2011) Host range of enterococcal *van*A plasmids among Gram-positive intestinal bacteria. *J. Antimicrob. Chemother*. **66**(2):273-282.

**Werner, G., Klare, I. and Witte, W.** (1999) Large Conjugative *vanA* Plasmids in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium. J. Clin. Microbiol* **37**(7): 2383-2384.

**Werner, G., Strommenger, B. and Witte, W.** (2008) Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Microbiol.* **3**(5): 547-562.

**Wicke, D., Böckelmann, U. and Reemtsma, T.** (2007) Experimental and modeling approach to study sorption of dissolved hydrophobic organic contaminants to microbial biofilms. *Water Research* **41**(10): 2202-2210.

**Will, A.** (2008). Studien zum Gentransfer in Biofilmen mit *Staphylococcus*- und *Bacillus*-Isolaten der Internationalen Raumstation (ISS) und der Antarktisforschungsstation Concordia.

**Williams, D., Kuipers, A., Mukai, C. and Thirsk, R.** (2009) Acclimation during space flight: effects on human physiology. *CMAJ* **180**(13): 1317-1322.

**Wilson, J. W., Ott, C. M., Bentrup, K. H. zu, Ramamurthy, R., Quick, L., Porwollik, S., Cheng, P., McClelland, M., Tsaprailis, G., Radabaugh, T., Hunt, A., Fernandez, D., Richter, E., Shah, M., Kilcoyne, M., Joshi, L., Nelman-Gonzalez, M., Hing, S., Parra, M., Dumars, P., Norwood, K., Bober, R., Devich, J., Ruggles, A., Goulart, C., Rupert, M., Stodieck, L., Stafford, P., Catella, L., Schurr, M. J., Buchanan, K., Morici, L., McCracken, J., Allen, P., Baker-Coleman, C., Hammond, T., Vogel, J., Nelson, R., Pierson, D. L., Stefanyshyn-Piper, H. M. and Nickerson, C. A.** (2007) Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *PNAS* **104**(41): 16299-16304.

**Witte, W., Cuny, C., Klare, I., Nübel, U., Strommenger, B. and Werner, G.** (2008) Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**(5-6): 365-377.

**Woodford, N., D. Morrison, B. Cookson and R. C. George**. (1993) Comparison of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from different continents. *Antimicrob. Agents Chemother*. **37**(4): 681-684.

**Wozniak, R. A. F. and Waldor, M. K.** (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Micro*. **8**(8): 552-563.

**Yoneyama, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K. and Sonomoto, K.** (2009) Peptide-Lipid Huge Toroidal Pore, a New Antimicrobial Mechanism Mediated by a Lactococcal Bacteriocin, Lacticin Q. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(8): 3211-3217.

**Zhang, K., McClure, J. A., Elsayed, S. and Conly, J. M.** (2009) Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type tentatively designated type VIII harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(2): 531-540.

**Zhang, W., Yu, D., Sun, Z., Chen, X., Bao, Q., Meng, H., Hu, S. and Zhang, H.** (2008) Complete nucleotide sequence of plasmid plca36 isolated from *Lactobacillus casei* Zhang. *Plasmid* **60**(2): 131-135.

**Zheng, B., Tomita, H., Inoue, T. and Ike, Y.** (2009) Isolation of VanB-Type *Enterococcus faecalis* Strains from Nosocomial Infections: First Report of the Isolation and Identification of the Pheromone-Responsive Plasmids pMG2200, Encoding VanB-Type Vancomycin Resistance and a Bac41-Type Bacteriocin, and pMG2201, Encoding Erythromycin Resistance and Cytolysin (Hly/Bac). *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**(2): 735-747.

**Zhu, W., Murray, P. R., Huskins, W. C., Jernigan, J. A., McDonald, L. C., Clark, N. C., Anderson, K. F., McDougal, L. K., Hageman, J. C., Olsen-Rasmussen, M., Frace, M., Alangaden, G. J., Chenoweth, C., Zervos, M. J., Robinson-Dunn, B., Schreckenberger, P. C., Reller, L. B., Rudrik, J. T. and Patel, J. B.** (2010) Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-Like *vanA* Plasmid Associated with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**(10): 4314-4320.

**Zhu, Y., Zhang, Y. and Li, Y.** (2009) Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**(4): 597-610.

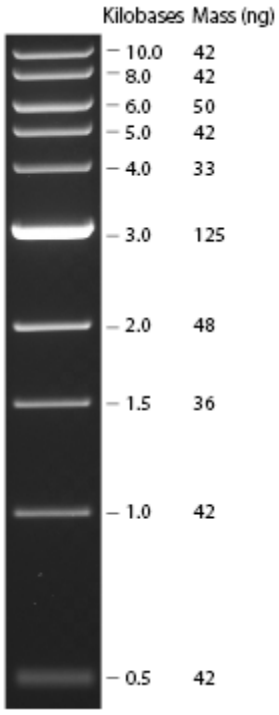
**Ziegler, A.** (2009) Der Mensch im Weltraum – Ein Organismus unter Ausnahmebedingungen. *Naturwissenschaftliche Rundschau* **62**(7): 357-359.

**Zou, W., Frye, J. G., Chang, C. W., Liu, J., Cerniglia, C. E. and Nayak, R.** (2009) Microarray analysis of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* from preharvest poultry environment. *J. Appl. Microbiol.* **107**(3): 906-914.

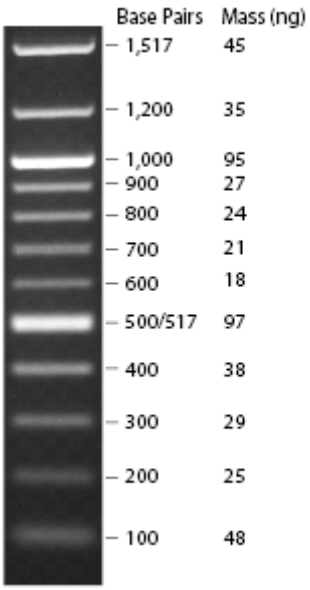
**Zupan, J., Hackworth, C. A., Aguilar, J., Ward, D. and Zambryski, P.** (2007) VirB1 promotes T-Pilus formation in the *vir*-Type IV Secretion System of *Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol.* **189**(18): 6551-6563.

# 7 ANHANG

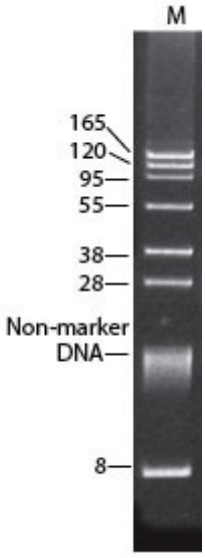
## 7.1 DNA-Größenstandards



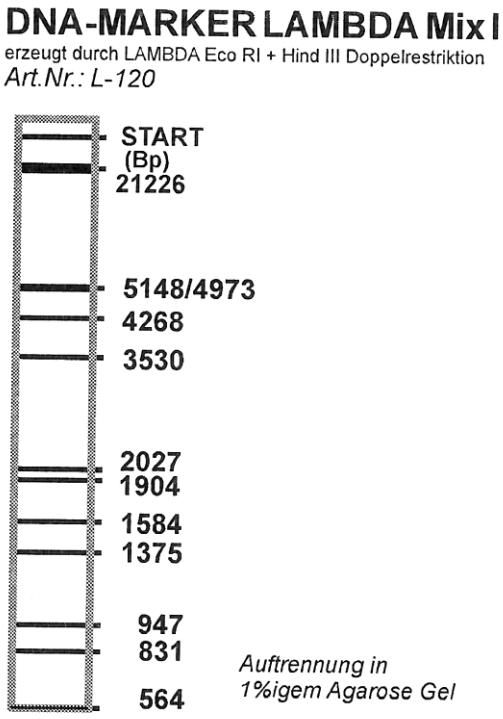

1 kb DNA Marker (NEB)



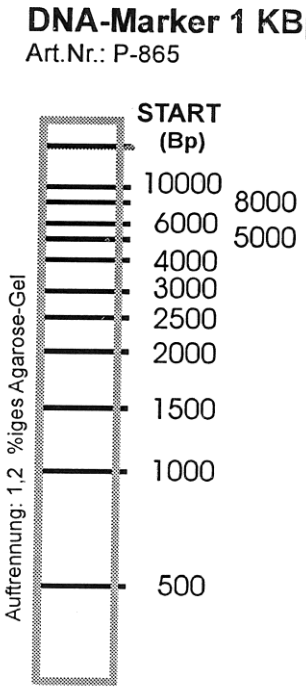

100 bp Marker (NEB)




BAC Supercoiled Marker (Epicenter)




Lambda DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII DNA Marker (MBBL)




1 kb DNA Marker (MBBL)

## 7.2 LAB Stammsammlung

| Stamm | Produkt- Alter der Produkte | Ursprung | Mikroskop | pH | Katalase | Antibiotikaresistenzen | Medium |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LAB1 | White cheese-30 days old | market | rod | 5,7 | Negativ | VA | MRS |
| LAB2 | White cheese-30 days old | market | coccus | 5,5 | Negativ | E | KAN |
| LAB3 | White cheese-7 months old | market | rod | 5,2 | Negativ | VA | MRS-NNLP |
| LAB4 | Tulum cheese peynir-30 days old | market | rod | 5,7 | Negativ | CIP ,VA | MRS-NNLP |
| LAB5 | Tulum cheese-8 months old | market | rod | 5,5 | Negativ | CIP, TE, VA | MRS-SOR |
| LAB6 | Tulum cheese-6 months old | market | rod | 5,4 | Negativ | VA | MRS-SOR |
| LAB7 | Tulum cheese-6 months old | market | coccus | 6 | Negativ | VA | M17 |
| LAB9 | Yoghurt-3 days old | market | rod | 5,0 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB10 | Turkish sausage-15 days old | small scale manufacture | coccus | 5,6 | Negativ | CIP,VA | M17 |
| LAB11 | Pastırma-30 days old | butcher | coccus | 5,4 | Negativ | F/M,CIP,VA | M17 |
| LAB12 | Pastırma-45 days old | butcher | coccus | 5,5 | Negativ | F/M,CİP,VA | M17 |
| LAB13 | Turkish sausage-11 days old | small scale manufacture | rod | 5,8 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB14 | Turkısh sausage-20 days old | small scale manufacture | rod | 5,1 | Negativ | CIP,VA | MRS |
| LAB15 | Turkish sausage-15 days old | small scale manufacture | rod | 5,2 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB16 | Turkish sausage-13 days old | small scale manufacture | rod | 5,5 | Negativ | F/M,CIP,VA | MRS |
| LAB17 | Turkish sausage-16 days old | small scale manufacture | rod | 5,9 | Negativ | CIP,VA | MRS |
| LAB18 | Turkish sausage-30 days old | small scale manufacture | coccus | 6,2 | Negativ | CIP,VA | MRS |
| LAB19 | Turkish sausage-22 days old | small scale manufacture | rod | 5,2 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB20 | Turkish sausage-22 days old | small scale manufacture | coccus | 5,2 | Negativ | F/M,CIP,VA | KAN |
| LAB21 | Pastırma-45 days old | butcher | coccus | 5,8 | Negativ | F/M,CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB22 | Turkish sausage-18 days old | small scale manufacture | coccus | 5,7 | Negativ | F/M,CİP,VA | MRS |
| LAB23 | Turkish sausage-22 days old | small scale manufacture | coccus | 5,2 | Negativ | CIP,VA | MRS |
| LAB24 | Pastırma-45 days old | butcher | coccus | 5,8 | Negativ | CIP,VA | MRS |
| LAB25 | Turkish sausage-30 days old | small scale manufacture | coccus | 5,8 | Negativ | F/M,CIP,VA | M17 |
| LAB26 | Turkish sausage-16 days old | small scale manufacture | coccus | 5,5 | Negativ | F/M,CIP,VA | MRS |
| LAB27 | Turkish sausage-17 days old | small scale manufacture | coccus | 6,1 | Negativ | CIP,VA | M17 |
| LAB28 | Pastırma-32 days old | butcher | coccus | 5,5 | Negativ | F/M,CIP,VA | MRS |
| LAB29 | Turkish sausage-22 days old | small scale manufacture | coccus | 5,6 | Negativ | F/M,CIP,VA | KAN |
| LAB30 | Turkish sausage-16 days old | small scale manufacture | rod | 5,9 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB31 | Turkish sausage-25 days old | small scale manufacture | rod | 5,5 | Negativ | CİP,VA | MRS-SOR |
| LAB32 | Turkish sausage-27 days old | small scale manufacture | coccus | 5,3 | Negativ | F/M,CIP,VA | MRS |
| LAB33 | Pastırma-32 days old | butcher | rod | 5,4 | Negativ | CIP,VA | MRS |
| LAB34 | Turkish sausage-27 days old | small scale manufacture | coccus | 5,3 | Negativ | F/M,CIP,VA | KAN |
| LAB35 | Turkish sausage-15 days old | small scale manufacture | rod | 5,6 | Negativ | CIP,VA | MRS |
| LAB36 | Pastırma-22 days old | butcher | rod | 5,2 | Negativ | CIP,VA | MRS |

| Stamm | Produkt- Alter der Produkte | Ursprung | Mikroskop | pH | Katalase | Antibiotikaresistenzen | Medium |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LAB37 | Turkish sausage-17 days old | small scale manufacture | rod | 6,1 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB38 | Turkish sausage-10 days old | small scale manufacture | rod | 5,3 | Negativ | CIP,VA | NNLP |
| LAB39 | Pastırma-20 days old | butcher | coccus | 6,6 | Negativ | CIP,VA | KAN |
| LAB40 | Turkish sausage-15 days old | small scale manufacture | rod | 5 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB41 | Turkish sausage-7 days old | small scale manufacture | coccus | 5,6 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB42 | Pastırma-20 days old | butcher | coccus | 6,6 | Negativ | CIP,VA | MRS |
| LAB43 | Turkish sausage-15 days old | small scale manufacture | rod | 5,5 | Negativ | CIP,VA | MRS |
| LAB44 | Pastırma-30 days old | butcher | rod | 6 | Negativ | CIP,VA, CN 10 | MRS-NNLP |
| LAB45 | Turkish sausage-15 days old | small scale manufacture | coccus | 5,5 | Negativ | CIP,VA, CN 10 | MRS |
| LAB46 | Turkish sausage-7 days old | small scale manufacture | rod | 6 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB47 | Pastırma-20 days old | butcher | rod | 6,6 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB48 | Pastırma-21 days old | butcher | rod | 6 | Negativ | CIP,VA | MRS-NNLP |
| LAB49 | Turkish sausage-7 days old | small scale manufacture | rod | 5,6 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB50 | Turkish sausage-14 days old | small scale manufacture | rod | 5 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB51 | Turkish sausage-10 days old | small scale manufacture | rod | 5 | Negativ | CIP,VA | MRS |
| LAB52 | Deri Tulum Peyniri-120 days old | market | rod | 5,5 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB53 | White cheese-60 days old | market | coccus | 4,8 | Negativ | VA | M17 |
| LAB54 | Yoghurt-10 days old | market | rod | 4,3 | Negativ | VA, E,TE, AMP, CIP, CN 10 | MRS |
| LAB55 | White cheese-8 months old | market | rod | 5,5 | Negativ | VA | MRS |
| LAB56 | Salty Yoghurt- 30 days old | market | rod | 3,8 | Negativ | VA, E | MRS |
| LAB57 | Cökelek-7 days old | market | rod | 5,1 | Negativ | CIP,VA, CN 10 | MRS-SOR |
| LAB58 | White cheese-30 days old | market | rod | 5,5 | Negativ | CIP,VA | MRS-NNLP |
| LAB59 | Yoghurt-10 days old | homemade | rod | 4,3 | Negativ | VA | MRS |
| LAB60 | White cheese-7 months old | market | rod | 5,4 | Negativ | VA | MRS |
| LAB61 | Yoghurt-10 days old | market | rod | 4,3 | Negativ | CN 10 | MRS |
| LAB62 | Yoghurt-7 days old | market | rod | 4,5 | Negativ | VA | MRS |
| LAB63 | White cheese-60 days old | market | coccus | 5,6 | Negativ | CİP | M17 |
| LAB64 | White cheese-4 months old | market | coccus | 4,6 | Negativ | VA | M17 |
| LAB65 | White cheese-7 months old | market | rod | 5,2 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB66 | White cheese-9 months old | market | rod | 5,7 | Negativ | VA, E | MRS |
| LAB67 | Yoghurt-3 days old | homemade | rod | 4,1 | Negativ | CIP | MRS |
| LAB68 | White cheese-30 days old | market | coccus | 5,7 | Negativ | CIP,VA | M17 |
| LAB69 | Yoghurt-8 days old | market | rod | 4,2 | Negativ | CIP,VA | MRS-SOR |
| LAB70 | Tulum cheese-8 days old | market | rod | 6,2 | Negativ | VA, E | MRS-SOR |
| LAB71 | Kefir-60 days old | market | rod | 4,6 | Negativ | CIP, VA | MRS |
| LAB72 | Tulum cheese-20 days old | market | rod | 5,5 | Negativ | VA, E | MRS-SOR |
| LAB73 | Cökelek-20 days old | market | rod | 5,2 | Negativ | VA | MRS-SOR |
| LAB74 | Tulum cheese-5 months old | market | rod | 5,4 | Negativ | CIP,VA, CN 10 | MRS |

| Stamm | Produkt- Alter der Produkte | Ursprung | Mikroskop | pH | Katalase | Antibiotikaresistenzen | Medium |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LAB75 | Yoghurt-3 days old | market | rod | 5 | Negativ | CİP,VA | MRS-SOR |
| LAB76 | White cheese-8 months old | market | rod | 5,2 | Negativ | CİP,VA | MRS-SOR |
| LAB77 | Cökelek-6 days old | market | rod | 4,2 | Negativ | E, CN 10 | NNLP |
| LAB78 | Cökelek-30 days old | market | rod | 5,2 | Negativ | CIP,VA | NNLP |
| LAB79 | White cheese-7 months old | market | coccus | 5,2 | Negativ | CIP, VA, E, RA | KAN |
| LAB80 | White cheese-2 months old | market | rod | 4,6 | Negativ | VA, CN 10 | MRS-SOR |
| LAB81 | White cheese-7 months old | market | rod | 5,4 | Negativ | VA, CN 10 | MRS-NNLP |
| LAB82 | Cökelek-30 days old | market | coccus | 5,6 | Negativ | VA, CİP, CN 10 | MRS |
| LAB83 | Cökelek-30 days old | market | coccus | 6 | Negativ | CİP | M17 |
| LAB84 | Cökelek-30 days old | market | coccus | 6 | Negativ | VA, CİP, CN 10 | KAN |
| LAB85 | Cökelek-30 days old | market | coccus | 6 | Negativ | VA, CİP, CN 10 | MRS-NNLP |
| LAB86 | Cökelek-90 days old | market | coccus | 5,8 | Negativ | VA, CİP, CN 10 | KAN |
| LAB87 | Cökelek-90 days old | market | coccus | 5,8 | Negativ | VA, CİP, CN 10 | MRS-SOR |
| LAB88 | Cökelek-90 days old | market | rod | 5,5 | Negativ | VA, CİP, CN 10 | MRS-NNLP |
| LAB89 | Cökelek-90 days old | market | rod | 5,5 | Negativ | VA, CİP, CN 10 | KAN |
| LAB90 | Cökelek-15 days old | market | rod | 6,2 | Negativ | VA, CİP, CN 10 | MRS-SOR |
| LAB91 | Cökelek-20 days old | market | rod | 5,6 | Negativ | VA.,CİP, CN 10, F/M | MRS-NNLP |
| LAB92 | Tulum cheese-7 months old | market | coccus | 5,6 | Negativ | VA.,CİP, CN 10, F/M | MRS-NNLP |
| LAB93 | Tulum cheese-7 months old | market | coccus | 5,6 | Negativ | CİP, CN 10, F/M, TE | M17 |
| LAB94 | Tulum cheese-7 months old | market | rod | 5,6 | Negativ | VA.,CİP, CN 10 | MRS |
| LAB95 | White cheese-1 months old | market | coccus | 5,0 | Negativ | VA.,CİP, CN 10, F/M | MRS-SOR |
| LAB96 | White cheese-1 months old | market | rod | 5,0 | Negativ | VA.,CİP, CN 10, F/M | MRS |
| LAB97 | White cheese-1 months old | market | coccus | 5,6 | Negativ | RA | M17 |
| LAB98 | White cheese-1 months old | market | rod | 5,6 | Negativ | VA, CİP, CN 10 | MRS |
| LAB99 | White cheese-1 months old | market | coccus | 5,6 | Negativ | CİP, CN 10 E, RA | KAN |
| LAB100 | White cheese-1 months old | market | rod | 5,6 | Negativ | VA, CİP | MRS-NNLP |
| LAB101 | White cheese-1 months old | market | coccus | 5,6 | Negativ | VA, CİP, TE | M17 |

| | Antibiotic List | Medium |
|---|---|---|
| VA | Vancomycin 30 µg | |
| CİP | Ciprofloxacin 5 µg | MRS (*de Man Rogosa and Sharp broth*) |
| CN 10 | Gentamicin 10 µg | MRS-NNLP (*MRS-neomycin sulphate-nalidixic acid-lithium chloride-paramomycine*) |
| F/M | Nitrofurantoin 300 µg | KAN (*Kanamycin esculin azide*) |
| TE | Tetracycline 30 µg | MRS-SOR (*MRS sorbitol*) |
| E | Erythromycin 15 µg | |
| RA | Rifampin/Rifampicin 5µg | |
| AMP | Ampicilin 10 µg | |
| C | Chloramphenicol 30 µg | |

## 7.3 Detektierte Plasmide in den ISS und Concordia Isolaten

| Stamm Nr.: | Plasmide[a] groß (>20kb) | klein (<20kb) | Stamm Nr.: | Plasmide[a] groß (>20kb) | klein (<20kb) |
|---|---|---|---|---|---|
| 41 | 0 | 0 | 92 | 1 | 5 |
| 42 | n.d. | n.d. | 93 | n.d. | n.d. |
| 45 | n.d. | n.d. | 94 | n.d. | n.d. |
| 46 | n.d. | 2 | 95 | n.d. | 6 |
| 47 | n.d. | 1 | 96 | 1 | 2 |
| 48 | n.d. | 1 | 97 | n.d. | 1 |
| 49 | n.d. | 2 | 98 | 1 | 3 |
| 50 | n.d. | 2 | 99 | 1 | 1 |
| 52 | n.d. | 3 | 100 | n.d. | 2 |
| 53 | 1 | 0 | 101 | n.d. | n.d. |
| 54 | n.d. | 3 | 103 | n.d. | 3 |
| 55 | 2 | 7 | 104 | n.d. | n.d. |
| 56 | 1 | 3 | 105 | n.d. | n.d. |
| 57 | n.d. | 4 | 106 | n.d. | n.d. |
| 58 | n.d. | 5 | 108 | n.d. | 2 |
| 60 | n.d. | 4 | 109 | n.d. | 3 |
| 61 | 1 | 6 | 110 | n.d. | 5 |
| 62 | 3 | 3 | 111 | 1 | n.d. |
| 64 | n.d. | n.d. | 112 | 3 | 4 |
| 65 | 3 | 0 | 113 | 2 | 8 |
| 66 | 4 | 8 | 114 | 2 | 8 |
| 67 | 3 | 8 | 115 | 1 | n.d. |
| 68 | 3 | 4 | 116 | 3 | 8 |
| 69 | 1 | 0 | 117 | 1 | 6 |
| 70 | 1 | 0 | 118 | n.d. | n.d. |
| 71 | 1 | 0 | 119 | 1 | 7 |
| 72 | 1 | 0 | 120 | n.d. | 8 |
| 73 | 1 | 0 | 121 | 2 | 7 |
| 74 | 1 | 0 | 122 | n.d. | 7 |
| 75 | 1 | 0 | 123 | 3 | 2 |
| 76 | 1 | 0 | 124 | 3 | 1 |
| 77 | 1 | 0 | 125 | 3 | 10 |
| 78 | 1 | 0 | 126 | 2 | 6 |
| 79 | 1 | 0 | 127 | 1 | 1 |
| 80 | 1 | 0 | 128 | 3 | 3 |
| 81 | 1 | n.d. | 130 | 1 | 4 |
| 83 | n.d. | 4 | 131 | n.d. | n.d. |
| 85 | 1 | 2 | 132 | n.d. | n.d. |
| 86 | n.d. | 5 | 133 | 2 | 8 |
| 87 | n.d. | 5 | 134 | n.d. | n.d. |
| 88 | n.d. | 4 | 135 | n.d. | n.d. |
| 89 | n.d. | 5 | 136 | n.d. | n.d. |
| 90 | n.d. | 2 | 137 | 2 | n.d. |
| 91 | 2 | 3 | | | |

[a]Die Zahl korrespondiert mit der Anzahl der Banden auf dem Gelbild
n.d.: nicht detektiert

## 7.4 Agardiffusionstest der ISS und Concordia Isolate

| TU-Nr. | Spezies | SCK·CEN Nummerierung | Van5 | Oxa5 | Amp25 | Erm10 | Strep25 | Genta10 | Kan30 | Tet10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | *B. cereus s.l* (16S) | T0-Air6-1 | 9 | + | + | 12 | 10 | 13 | 16 | 12 |
| 4. | *B. licheniformis* | T0-Air7-3 | 12 | 10 | 7 | 18 | 12 | 15 | 14 | 21 |
| 6. | *B. megaterium* (16S) | T0-Air8-9 | 12 | 15* | 10* | 16 | 16 | 15 | 14 | + |
| 10. | *B. subtilis* (16S) | T0B-C5-HA37-7 | 10 | 35 | 10* | + | 11 | 12 | 14 | 14 |
| 12. | *B. cereus s.l* (16S) | T0B-C6-HA37-1 | 8 | 8 | + | 14 | 12 | 10 | 12 | 16 |
| 13. | *B. firmus* (16S) | T11-Air1-1 | 9 | 22 | 14 | 17 | 12 | 12 | 12 | + |
| 14. | *B. cereus s.l* (16S) | T11-Air2-1 | 10 | + | + | 10 | 8 | 14 | 14 | 12 |
| 17. | *B. megaterium* (16S) | T2-Air7-2 | 13 | 19 | 16* | 17 | 16 | 17 | 18 | + |

*Kolonien innerhalb des Hemmhofs; (16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK; Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Plate: Isolate einer bestimmten Agarplatte; Amp: Ampicillin; Erm: Erythromycin; Genta: Gentamycin; Kan: Kanamycin; Oxa, Oxacillin; Strep: Streptomycin, Tet: Tetracyclin; Van: Vancomycin

| TU-Nr. | Spezies | SCK·CEN Nummerierung | Van5 | Van30 | Oxa5 | Cat30 | Cat10 | Amp25 | Erm10 | Erm30 | Strep25 | Genta10 | Kan30 | Tet10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 24 | *B. psychrodurans* (16S) | T4-Air1-6 | 17 | 21 | 30 | 27 | 20 | 35 | 38 | 40 | 30 | 30 | 30 | 26 |
| 27 | *B. firmus* (16S) | T5-Air6-2 | + | + | + | 8 | + | + | 23 | 30 | 23 | 25 | + | + |
| 30 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T5-Air8-3 | 17 | 19 | 21 | / | 9 | 20 | 18 | 20 | 21 | 22 | 25 | 30 |
| 31 | *B. circulans* (16S) | T5-Air8-4 | 18 | 21 | 25 | 26 | 20 | + | 21 | 24 | 22 | + | 25 | 30 |
| 33 | *B. cereus s.l* (16S) | T6-Air5-1 | 8 | 15 | + | 20 | 14 | + | 18 | 20 | 16 | 15 | 15 | 17 |
| 34 | *B. cereus s.l* (16S) | T8-Air6-4 | 11 | 17 | + | 20 | 13 | + | 15 | 21 | 20 | + | 15 | 15 |
| 36 | *B. circulans* (16S) | T8-Air8-3 | 10 | 20 | + | 13 | 11 | 30 | / | 20 | 17 | 19 | 19 | 27 |
| 37 | *B. cereus s.l* (16S) | T9-Air1-1 | + | 17 | + | 23 | 17 | + | / | 23 | 16 | 16 | + | 16 |
| 38 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T9-Air1-4 | + | + | 14 | 18 | 12 | 26 | + | + | 17 | 25 | 23 | 35 |
| 39 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T9-Air5-1 | 17 | 25 | 13 | / | 11 | 30 | 19 | 25 | + | 25 | 20 | 8 |
| 40 | *Paenibacillus* sp. (16S) | T8-Air6-5 | 21 | 25 | 17 | 25 | 18 | 35 | 27 | 31 | + | 29 | 28 | 31 |

/: nicht eindeutig; (16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK; Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Plate: Isolate einer bestimmten Agarplatte; Amp: Ampicillin; Cm: Chloramphenicol; Erm: Erythromycin; Genta: Gentamycin; Kan: Kanamycin; Oxa, Oxacillin; Strep: Streptomycin, Tet: Tetracyclin; Van: Vancomycin

| TU-Nr. | Spezies | SCK·CEN Nummerierung | Van5 | Oxa5 | Amp25 | Erm10 | Strep25 | Genta10 | Kan30 | Tet10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 41 | *S. aureus* | R87 | + | 12 | 15 | 17 | 12 | 14 | 14 | 20 |
| 42 | *B. cereus s.l.* | T0-C1-HA28-1 | 9 | 20 | 30 | 22 | 7 | + | 21 | + |
| 45 | *S. aureus* | T5-Air3-1 | 9 | 18 | + | 20 | 13 | 14 | 16 | 21 |
| 46 | *S. aureus* | T5-Air7-8 | 11 | 31 | 20 | 11 | 17 | 22 | 24 | 17 |
| 47 | *S. aureus* (16S) | R42 | 13 | 31 | 13 | + | 18 | 24 | + | 24 |
| 48 | *S. epidermidis* | R56 | 9 | 24 | 12 | 20 | 17 | 20 | 19 | 23 |
| 49 | *S. epidermidis* | R61 | 9 | 26 | 16 | 20 | 17 | 9 | 7 | 18 |
| 50 | *S. hominis* sp. | T0-C1-HA37-2 | 12 | 30 | 19 | 23 | 18 | 20 | 22 | 30 |

(16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK; Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Amp: Ampicillin; Erm: Erythromycin; Genta: Gentamycin; Kan: Kanamycin; Oxa, Oxacillin; Strep: Streptomycin, Tet: Tetracyclin; Van: Vancomycin

| TU-Nr. | Spezies | SCK·CEN Nummerierung | Van5 | Van30 | Oxa5 | Cat30 | Cat10 | Amp25 | Erm10 | Erm30 | Strep25 | Genta10 | Kan30 | Tet10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 52 | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA28-3 | + | 14 | 30 | / | 17 | 20 | 24 | 26 | 17 | 21 | 22 | 21 |
| 53 | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA37-2 | + | 13 | + | 24 | 18 | 19 | 23 | 25 | 20 | 21 | 19 | 13 |
| 54 | *S. epidermidis* | T10-Air8-2 | 12 | 16 | 32 | 23 | 17 | 40 | 25 | 30 | 20 | 22 | 23 | + |
| 55 | *S. epidermidis* | T11-Air2-8 | 11 | 13 | 30 | 17 | 13 | 18 | + | + | 17 | 21 | 22 | + |
| 56 | *S. epidermidis* | T4-Air8-1 | 12 | 15 | 38 | 25 | 21 | 44 | 26 | 29* | 21 | 26 | 24 | 31 |
| 57 | *S. epidermidis* | T6-Air1-4 | 11 | 13 | 25 | 09 | + | 14 | 25 | 25 | 18 | 21 | 23 | 17 |
| 58 | *S. epidermidis* (16S) | R12 | 10 | 15 | 40 | 23 | 18 | 48 | 24 | 30 | 17 | 21 | 21 | 28 |
| 60 | *S. epidermidis* | Plate5 iso2 | 11 | 14 | 27 | 23 | 14 | 17 | 23 | 25 | 18 | 21 | 20 | 26 |
| 61 | *S. capitis* subsp. *capitis* (16S) | T11-Air4-7 | 10 | 13 | 10 | + | + | + | + | + | 12 | 20 | 17 | 22 |
| 62 | *S. epidermidis* (16S) | T0-C3-HA28-3 | 11 | 14 | 30 | 22 | 16 | 14 | 24 | 32 | 18 | 23 | 20 | 27 |
| 64 | *S. epidermidis* | R75 | 9 | 11 | 25 | 21 | 15 | 15 | 22 | 23 | 19 | 24 | 22 | 23 |

/: nicht eindeutig; *Kolonien innerhalb des Hemmhofs; (16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK; Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Plate: Isolate einer bestimmten Agarplatte; Amp: Ampicillin; Cat: Chloramphenicol; Erm: Erythromycin; Genta: Gentamycin; Kan: Kanamycin; Oxa, Oxacillin; Strep: Streptomycin, Tet: Tetracyclin; Van: Vancomycin

| TU-Nr. | Spezies | SCK·CEN Nummerierung | Van5 | Van30 | Oxa5 | Cat30 | Cat10 | Amp25 | Erm10 | Erm30 | Strep25 | Genta10 | Kan30 | Tet10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 65 | *S. epidermidis* | Plate8 iso1 | 8 | 12 | + | + | + | 42 | 22 | 23 | 17 | 21 | 22 | + |
| 66 | *S. epidermidis* | Plate10 iso12 | 8 | 13 | 34 | + | + | 42 | 22 | 26 | 17 | 21 | + | 22 |
| 67 | *S. aureus* | T0-C2-HA28-5 | + | 10 | 20 | 20 | 9 | 8 | 19 | 20 | 12 | 14 | 13 | 20 |
| 68 | *S. aureus* | T0-C2-HA37-4 | 8 | 10 | 17 | 18 | 12* | 9* | 18* | 20* | 10 | 14 | 15 | 23* |
| 69 | *E. faecalis* | Plate10 iso10 | + | 13 | + | 8 | + | 27 | + | + | + | 11 | + | + |
| 70 | *E. faecalis* | Plate10 iso11 | 10 | 13 | 10 | + | + | 28 | + | + | + | 12 | + | + |
| 71 | *E. faecalis* | Plate10 iso14 | 9 | 15 | 9 | 8 | 8 | 25 | + | + | + | 10 | + | + |
| 72 | *E. faecalis* | Plate10 iso16 | 10 | 13 | 11 | 8 | + | 31 | + | + | + | 14 | + | + |
| 73 | *E. faecalis* | Plate10 iso18 | 10 | 14 | 15* | + | + | 29 | + | + | + | 10 | + | + |
| 74 | *E. faecalis* | Plate10 iso2 | 10 | 14 | 12 | 8 | + | 26 | + | + | + | 11 | + | + |
| 75 | *E. faecalis* | Plate10 iso3 | 10 | 13 | 13 | 8 | + | 35 | + | + | + | 12 | + | + |
| 76 | *E. faecalis* | Plate10 iso4 | 10 | 13 | + | 8 | + | 33 | + | + | + | 13 | + | + |
| 77 | *E. faecalis* | Plate10 iso5 | 9 | 13 | 10 | 8 | + | 30 | + | + | + | 12 | + | + |
| 78 | *E. faecalis* | Plate10 iso7 | 9 | 14 | 10* | 8 | + | 25 | + | + | + | 11 | + | + |
| 79 | *E. faecalis* | Plate10 iso8 | 10 | 14 | 9 | + | + | 25 | + | + | + | 10 | + | + |
| 80 | *E. faecalis* | Plate10 iso9 | 9 | 14 | 10* | 8 | + | 26 | + | + | + | 10 | + | + |
| 81 | *S. aureus* | T0B-C4-HA37-3 | 10 | 13 | 26 | 15 | + | 20 | 20 | 8 | 23 | 13 | 20 | 81 |
| 83 | *Microbacterium* sp.(16S) | T4-Air3-1 | 15 | 20 | 30 | 20 | 15 | + | 18 | 20 | 23 | 30 | + | 83 |
| 85 | *S. hominis hominis/ novobiosepticus* | T3-Air3-4 | 15 | 20 | 30 | 30 | 20 | + | + | 20 | 20 | 25 | + | 85 |
| 86 | *S. warneri* | T3-Air4-1 | 12 | 17 | + | 20 | 35 | + | 10 | 15 | 20 | 20 | 30 | 86 |
| 87 | *S. hominis hominis/ novobiosepticus* | T3Air7-2 | 20 | / | 25 | 25 | 25 | 25 | 35 | 20 | 8 | 30 | 20 | 87 |

*Kolonien innerhalb des Hemmhofs; (16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK; Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Plate: Isolate einer bestimmten Agarplatte; Amp: Ampicillin; Cat: Chloramphenicol; Erm: Erythromycin; Genta: Gentamycin; Kan: Kanamycin; Oxa, Oxacillin; Strep: Streptomycin, Tet: Tetracyclin; Van: Vancomycin

| TU-Nr. | Spezies | SCK·CEN Nummerierung | Van5 | Van30 | Oxa5 | Cat30 | Amp25 | Erm10 | Erm30 | Strep25 | Genta10 | Kan30 | Tet10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 88 | *S. hominis hominis/ novobiosepticus* | T4-Air2-1 | 20 | 30 | 25 | 20 | 30 | 30 | 30 | 20 | 25 | 30 | 20 |
| 89 | *S. capitis* | T4-Air4-2 | 10 | 15 | 30 | 20 | 35 | 25 | 20 | 20 | 25 | 20 | 25 |
| 90 | *S. warneri* | T4-Air6-2 | 15 | / | 23 | 30 | 20 | 17 | 27 | 17 | 23 | 25 | 35 |
| 91 | *S. cohnii* subsp. *urealyticum* | T4-Air6-3 | 15 | 20 | 25 | 22 | 15 | + | + | 21 | 25 | 25 | + |
| 92 | *S. warneri* | T4-Air7-1 | 15 | 15 | 30 | 25 | 10 | 15 | 15 | 20 | 20 | 25 | 28 |
| 93 | *S. capitis* | T6-Air5-3 | 10 | 10 | 25 | 25 | 15 | 15 | 30 | 15 | 20 | 20 | 31 |
| 94 | *S. haemolyticus* | T8-Air7-1 | + | + | 25 | 15 | 10 | 20 | 30 | 12 | + | 15 | 25 |
| 95 | *S. saprophyticus* | T11-Air3-3 | 10 | 15 | 26 | 25 | + | + | + | 20 | 21 | 25 | 30 |
| 96 | *S. pasteuri* | T0-C3-HA28-2 | 13 | 17 | 35 | 27 | 40 | 25 | 29 | 20 | 30 | 25 | 35 |
| 97 | *S. pasteuri* (16S) | T0-C4-HA28-1 | 15 | / | 37 | 30 | 50 | 25 | 29 | 18 | 20 | 25 | 33 |
| 98 | *Staphylococcus* sp. (16S) | T0-C4-HA28-3 | 12 | 12 | 35 | 12 | 40 | 30 | 30 | 20 | 25 | 20 | 35 |
| 99 | *S. saprophyticus* (16S) | R13 | 10 | / | 25 | 23 | 10 | 20 | 25 | 16 | 20 | 18 | 25 |
| 100 | *S. lugduniensis* | R76 | 10 | / | 25 | + | 35 | 25 | 10 | 20 | 20 | 20 | 28 |
| 101 | *S. lugduniensis* (16S) | 4IJ-4 | 10 | 15 | 21 | + | 20 | 25 | 30 | 17 | 20 | 20 | 25 |
| 103 | *S. haemolyticus* (16S) | 5IL-2 | + | / | 25 | 25 | 15 | + | + | 20 | 18 | 20 | + |
| 104 | *S. aureus* (16S) | 6OD-2 | + | + | + | 20 | + | + | + | 10 | 10 | 10 | 8 |
| 105 | *S. pasteuri* | T0-C6-HA28-5 | + | + | + | 30 | + | + | + | 10 | 12 | 10 | 18 |
| 106 | *S. haemolyticus* (16S) | T0B-C2-HA37-3 | + | + | + | 20 | + | + | + | 10 | 12 | 10 | 18 |
| 108 | *S. hominis* (16S) | R44 | 10 | 20 | 35 | 30 | 25 | + | 10 | 20 | 23 | 20 | + |
| 109 | *S. haemolyticus* | R69 | 10 | 18 | 30 | 20 | 20 | + | + | 17 | 25 | 22 | + |
| 110 | *S. hominis subsp. hominis* (16S) | 7IL-2 | 12 | 20 | 35 | + | 20 | + | + | 15 | 25 | 25 | + |
| 111 | *S. hominis hominis/ novobiosepticus* | T0-AIR1-1 | 12 | 13 | 23 | + | 31 | 18 | 24 | 16 | 18 | 19 | 18 |
| 112 | *S. hominis hominis/ novobiosepticus* | T2-AIR5-1 | 11 | 16 | 32 | 22 | 31 | 18 | 24 | 15 | 18 | 20 | 21 |
| 113 | *S. hominis hominis/ novobiosepticus* | T2-AIR5-3 | 12 | 12 | 30 | 25 | 14 | + | 7 | 20 | 24 | 22 | + |
| 114 | *S. hominis hominis/ novobiosepticus* | T2-AIR7-1 | 12 | 8 | 29 | 18 | 35 | + | + | 16 | 21 | 21 | 21 |

/: nicht eindeutig; (16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK; Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Amp: Ampicillin; Cat: Chloramphenicol; Erm: Erythromycin; Genta: Gentamycin; Kan: Kanamycin; Oxa, Oxacillin; Strep: Streptomycin, Tet: Tetracyclin; Van: Vancomycin

| TU-Nr. | Spezies | SCK·CEN Nummerierung | Van5 | Van30 | Oxa5 | Cat30 | Amp25 | Erm10 | Erm30 | Strep25 | Genta10 | Kan30 | Tet10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 115 | *S. capitis* | T3-AIR2-3 | 10 | 17 | 26 | 24 | 40 | 21 | 28 | 19 | 23 | 20 | 25 |
| 116 | *S. epidermidis* | T5-AIR4-3 | 8 | 12 | 35 | 21 | 41 | 24 | 25 | 16 | 20 | + | + |
| 117 | *S. epidermidis* (16S) | T6-AIR1-5 | 10 | 12 | 37 | 20 | 52 | 23 | 24 | 14 | 19 | 18 | 18 |
| 118 | *S. epidermidis* (16S) | T6-AIR2-1 | 9 | 12 | 24 | 20 | 45 | 12 | 23 | 15 | 17 | 20 | 17 |
| 119 | *S. epidermidis* (16S) | T6-AIR2-2 | 9 | 10 | + | 23 | 13 | 21 | 23 | 17 | 20 | 20 | 20 |
| 120 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T6-AIR2-3 | 12 | 17 | 31 | 13 | 15 | 20 | 25 | 16 | 19 | 20 | 20 |
| 121 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T9-Air2-4 | 12 | / | 27 | + | 36 | + | 8 | 18 | 20 | 20 | 20 |
| 122 | *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (16S) | T9-Air5-2 | 11 | 15 | 27 | 21 | 38 | 22 | 25 | 14 | 19 | 19 | 25 |
| 123 | *S. capitis* subsp. *capitis* (16S) | T11-Air2-3 | 11 | / | 12 | 10 | 15 | 25 | 30* | 17 | 18 | 20 | 28 |
| 124 | *S. epidermidis* (16S) | T11-Air4-3 | 11 | 14 | 26 | + | 12 | + | 8 | 18 | 11 | 8 | 30 |
| 125 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T12-Air2-1 | 12 | / | 24 | 7 | 31 | + | 8 | 18 | 20 | 22 | + |
| 126 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T12-Air2-2 | 10 | 16 | 32 | + | 21 | 20 | 23 | 15 | 20 | 20 | 24 |
| 127 | *S. epidermidis* | T0-C1-HA28-3 | 10 | 12 | + | 22 | 41 | 19 | 23* | 17 | 19 | 20 | 17 |
| 128 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T0-C2-HA28-4 | 11 | 11 | 30 | 25 | 13 | 19 | 21* | 18 | 22 | 20 | 25 |
| 130 | *S. epidermidis* (16S) | T0-C6-HA28-3 | 10 | 11 | 28 | 17 | 21 | + | + | 16 | 17 | 17 | 21 |
| 131 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T0-C1-HA37-1 | 12 | 13 | 18 | 25 | 33 | 23 | 25* | + | 17 | 21 | 20 |
| 132 | *S. pasteuri* (16S) | T0-C3-HA37-1 | 9 | 11 | 31 | 20 | 43* | 22 | 25 | 18 | 21 | 21 | 18 |
| 133 | *S. capitis* subsp. *capitis* (16S) | T0B-C1-HA37-4 | 10 | 13 | 26 | 24 | 33 | 21 | 22 | 17 | 10 | 20 | 18 |
| 134 | *S. hominis hominis/ novobiosepticus* (16S) | T0B-C2-HA37-2 | 13 | 13 | 32 | 24 | 23 | 21 | 20* | 18 | 21 | 18 | 25 |
| 135 | *S. hominis subsp. novobiosepticus* (16S) | T0B-C2-HA37-4 | 12 | 14 | 30 | 17 | 40 | 20 | 20 | 13 | 18 | 19 | 26 |
| 136 | *S. epidermidis* | T0B-C3-HA37-3 | 10 | 19 | 30 | 11 | 16 | 22 | 25 | 18 | 19 | 22 | 13 |
| 137 | *S. hominis* subsp. *hominis* (16S) | T0B-C4-HA28-4 | 12 | 12 | 26 | 19 | 17 | + | + | 16 | 18 | 18 | + |

/: nicht eindeutig; *Kolonien innerhalb des Hemmhofs; (16S): Identifizierung mittels 16S rDNA Sequenzierung, ansonsten mittels VITEK; Air/R: Luftprobe; HA/IJ/IL: Proben von der Crew; Amp: Ampicillin; Cat: Chloramphenicol; Erm: Erythromycin; Genta: Gentamycin; Kan: Kanamycin; Oxa, Oxacillin; Strep: Streptomycin, Tet: Tetracyclin; Van: Vancomycin