



Rolle der Antibiotika und ihre Wirkung auf das Mikrobiom und damit die menschliche Gesundheit

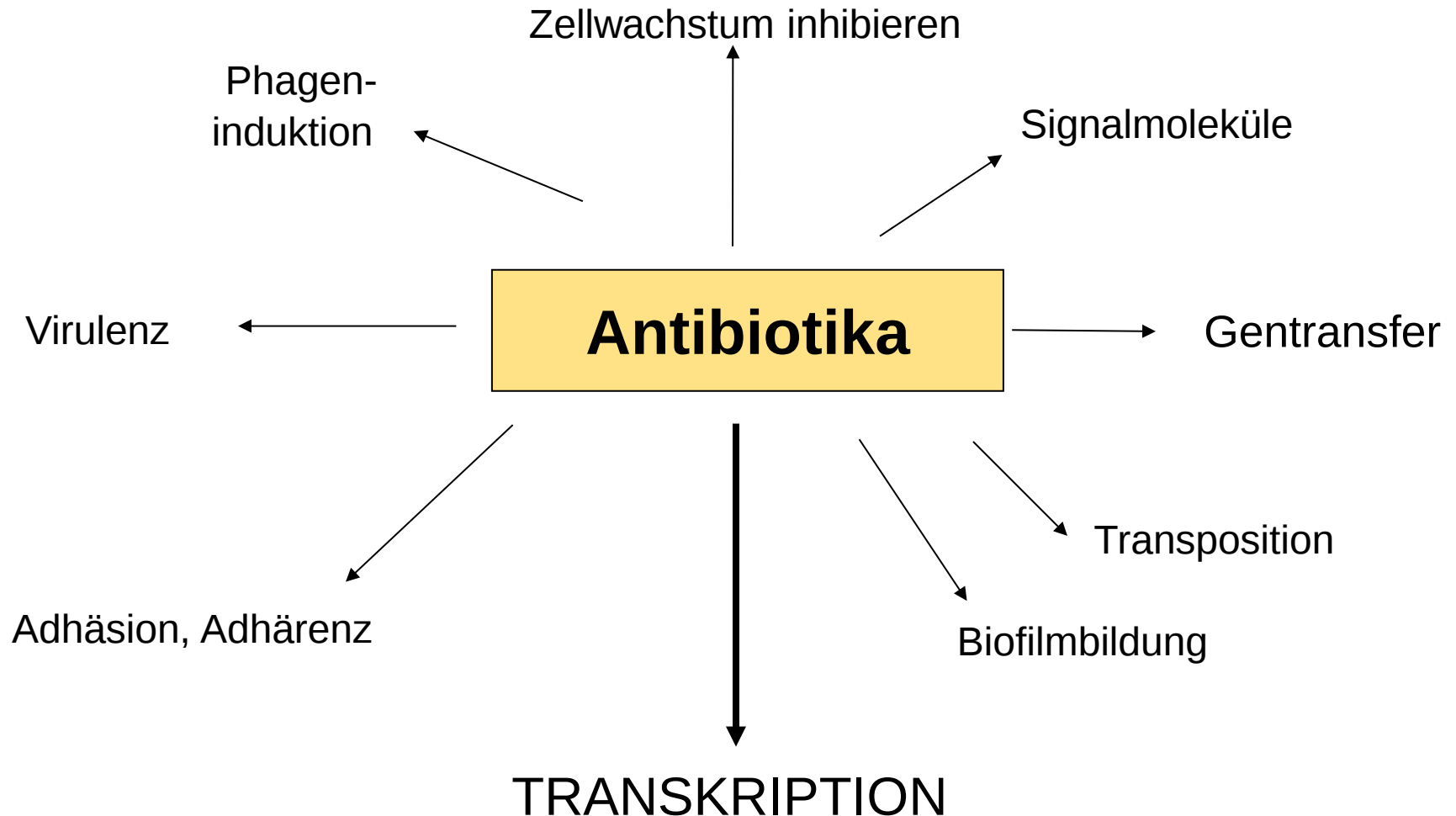
Kornelia Smalla

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
(JKI), Braunschweig, kornelia.smalla@julius-kuehn.de
kornelia.smalla@icloud.com

Viele Boden- und Pflanzen-assoziierte Bakterien produzieren Antibiotika

Natürliche Funktionen:

Bioaktive Moleküle, die bei sub-inhibitorischen Konzentrationen



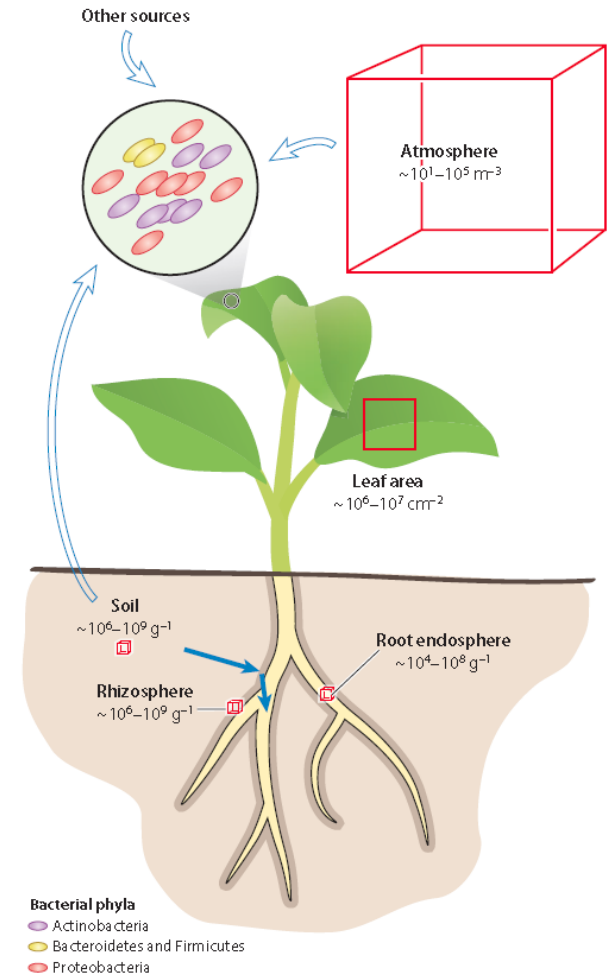
Antibiotika-Resistenz

Das natürliche oder intrinsische Resistome

Kein Bindungsort, Inaktivierung, durch geringe Aufnahme oder effizienten Efflux
(Olivares et al., 2013; Perry & Wright, 2013)

Erworbene Antibiotikaresistenz

Antibiotika-, Metal- und Biozid-Verbindungen, die vom Menschen genutzt werden, verursachen Veränderungen in der Mikrobiomzusammensetzung, Selektion von resistenten Bakterien und fördern horizontalen Gentransfer



ONE health approach

Antibiotikaresistenz – Rolle des Agro-Ökosystems

➤ Hot spots:

Mischen des Mikrobioms von **organischem Dünger mit Bodenbakterien:**

Hohe Zelldichten

Nährstoffverfügbarkeit

Selektionsdruck

➤ **Antibiotika, Metallverbindungen und Desinfektionsmittel sowie resistente Bakterien** werden mit Gülle, Gärresten, Klärschlämmen oder Beregnungswasser in landwirtschaftliche Böden eingebracht.

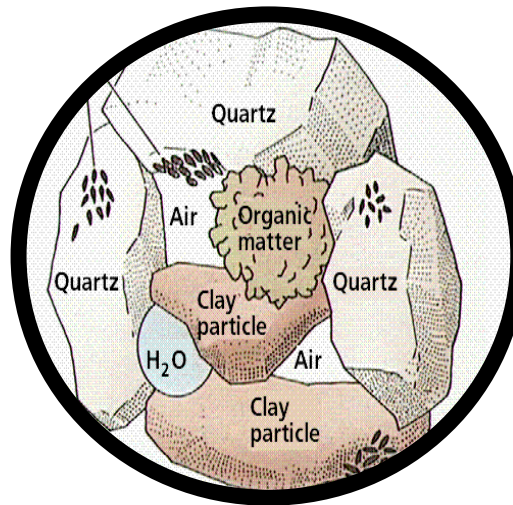


ONE health

Monitoring von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen

Organischer Dünger → Boden → Gemüse & Obst → Menschliches Darmmikrobiom

Gülle
Gärreste
Klärschlamm
Beregnungswasser



Antibiotikareste in organischen Düngern oder Beregnungswasser

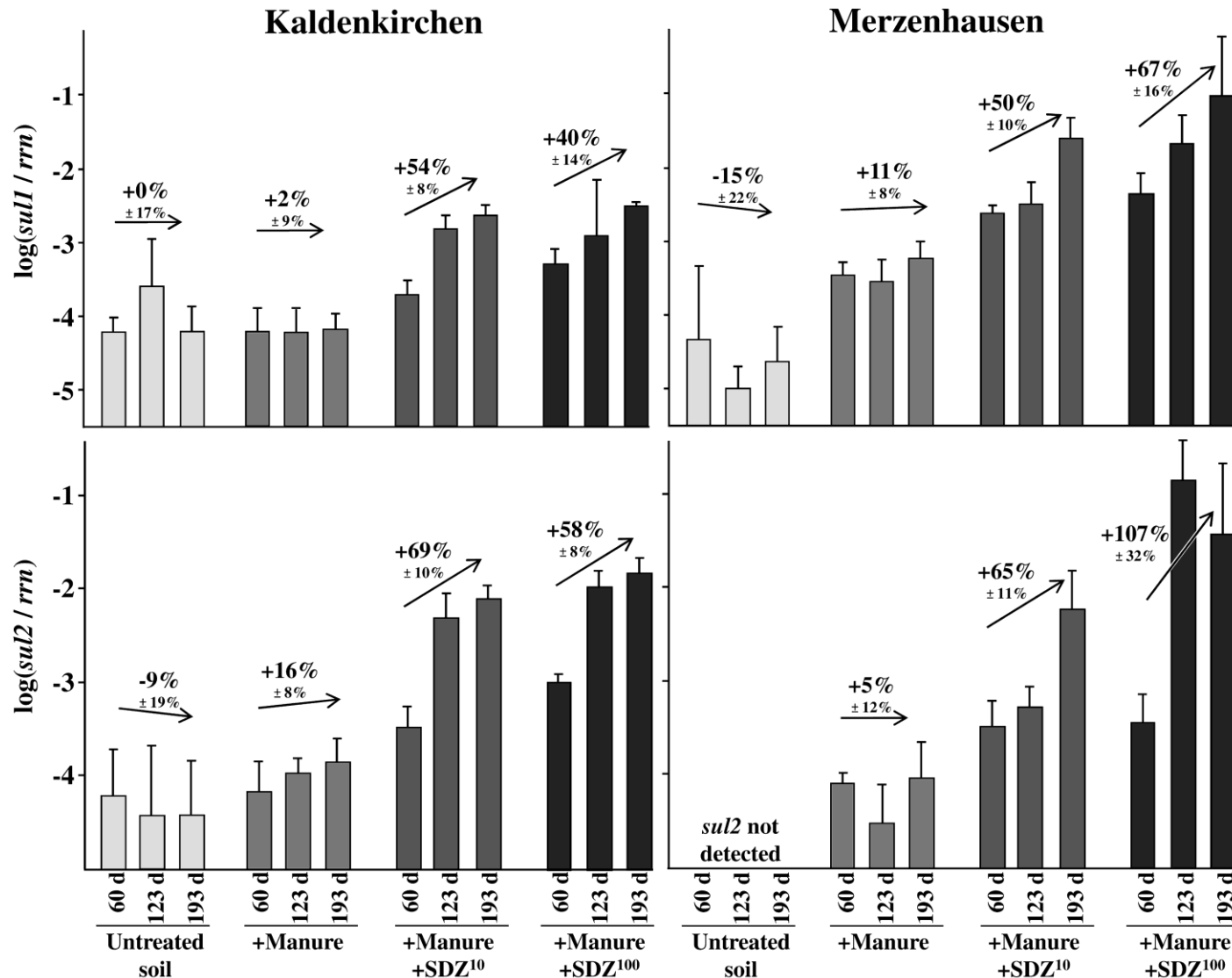
- ➔ Verschiebungen in der relativen Abundanz von Mikroorganismenpopulationen im Boden
- ➔ Veränderungen in den Bodenfunktionen
- ➔ Abundanz und Diversität von Resistenzgenen und Bakterien mit MGE

Effekte auf das Pflanzenmikrobiom?

Effekte auf das Pflanzenresistom und -mobilom?

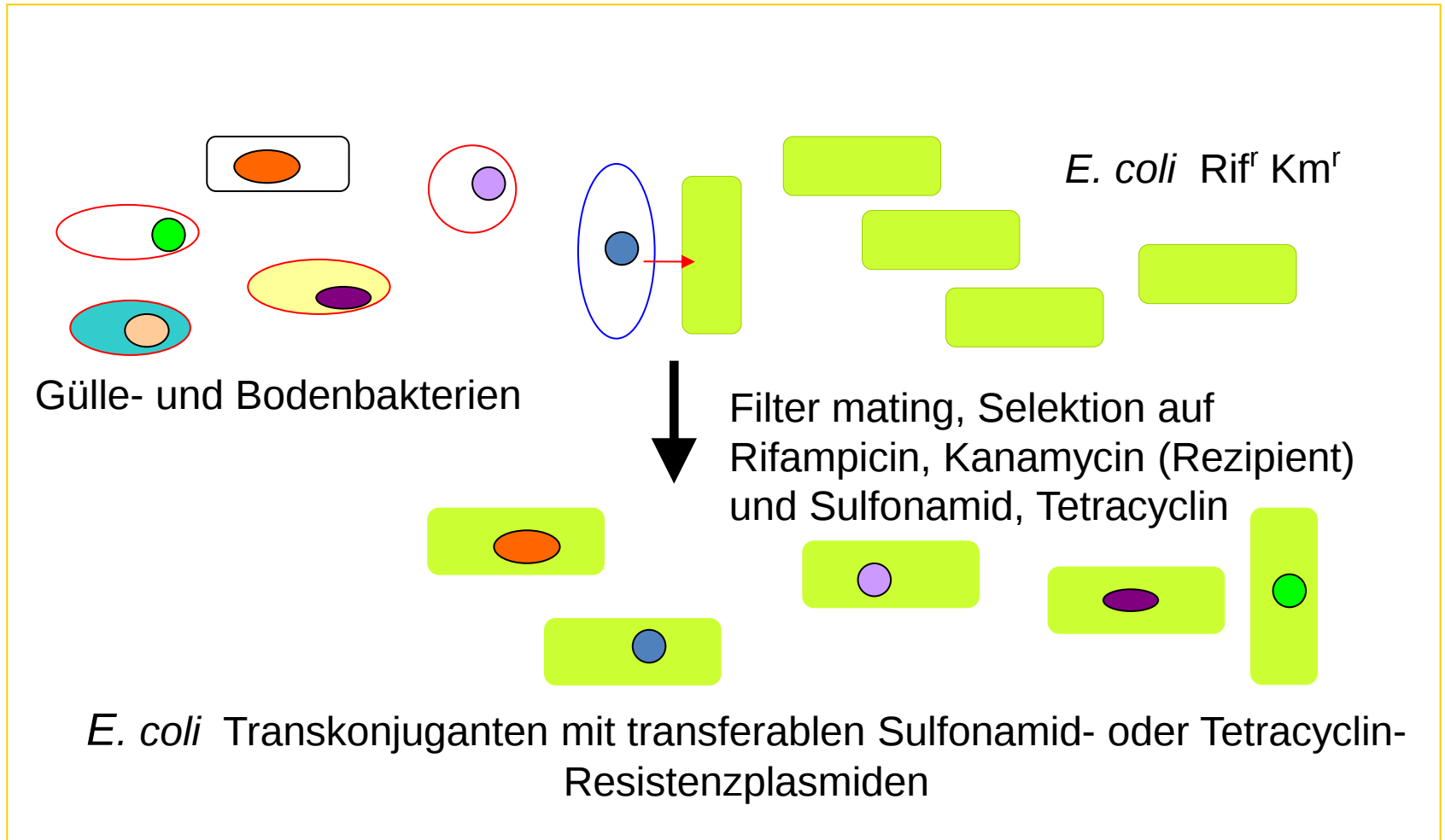


Wiederholte Begüllung führt in Gegenwart von Sulfadiazin zu einer Akkumulation von Sulfonamid-Resistenzgenen (*sul1*, *sul2*)



Quantitative real-time PCR mit Taqman-Sonden mit Gesamt-DNA ermöglicht die Quantifizierung der Abundanz von Resistenzgenen und Plasmiden

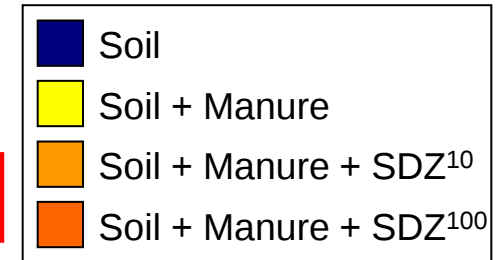
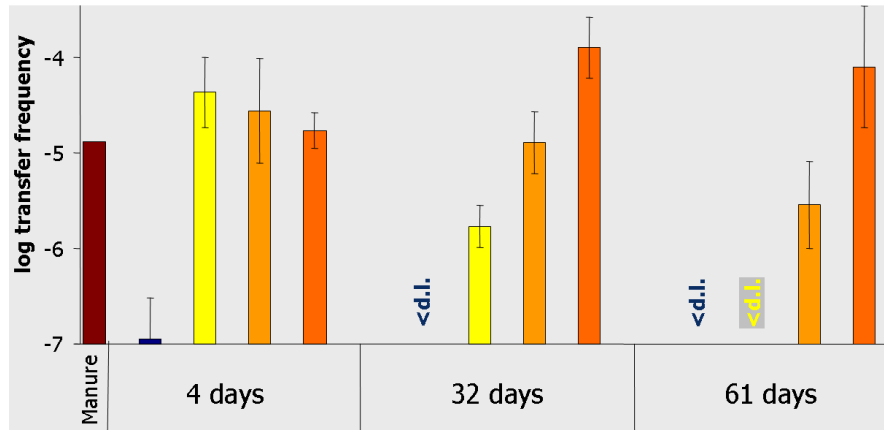
Exogene Isolierung von übertragbaren Antibiotika-Resistenzen in Gülle- und Bodenbakterien



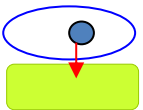
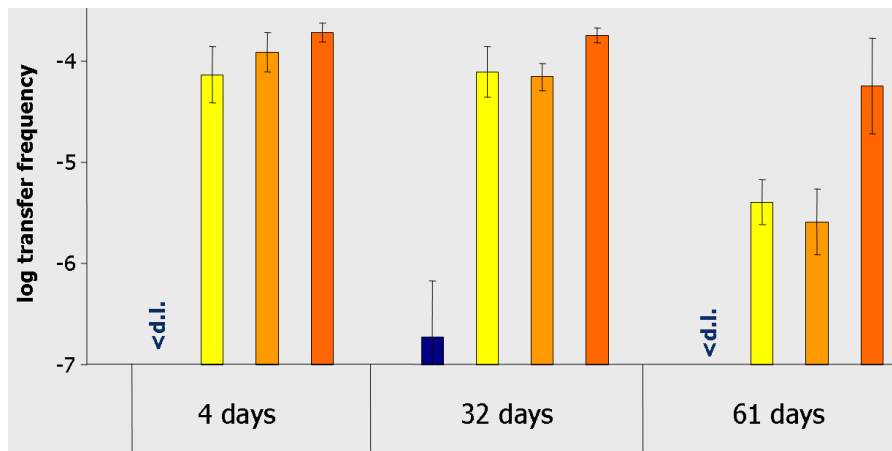
Methode wurde erfolgreich angewendet, um Antibiotika-Resistenzplasmide aus Boden, Rhizosphäre, Gülle, Gärresten, Klärschlämmen und von Pflanzen zu isolieren.

Transferfrequenzen in exogenen Isolierungen waren signifikant höher bei Behandlungen von Böden mit Gülle + Sulfadiazin (SDZ)

Soil KS



Soil ML



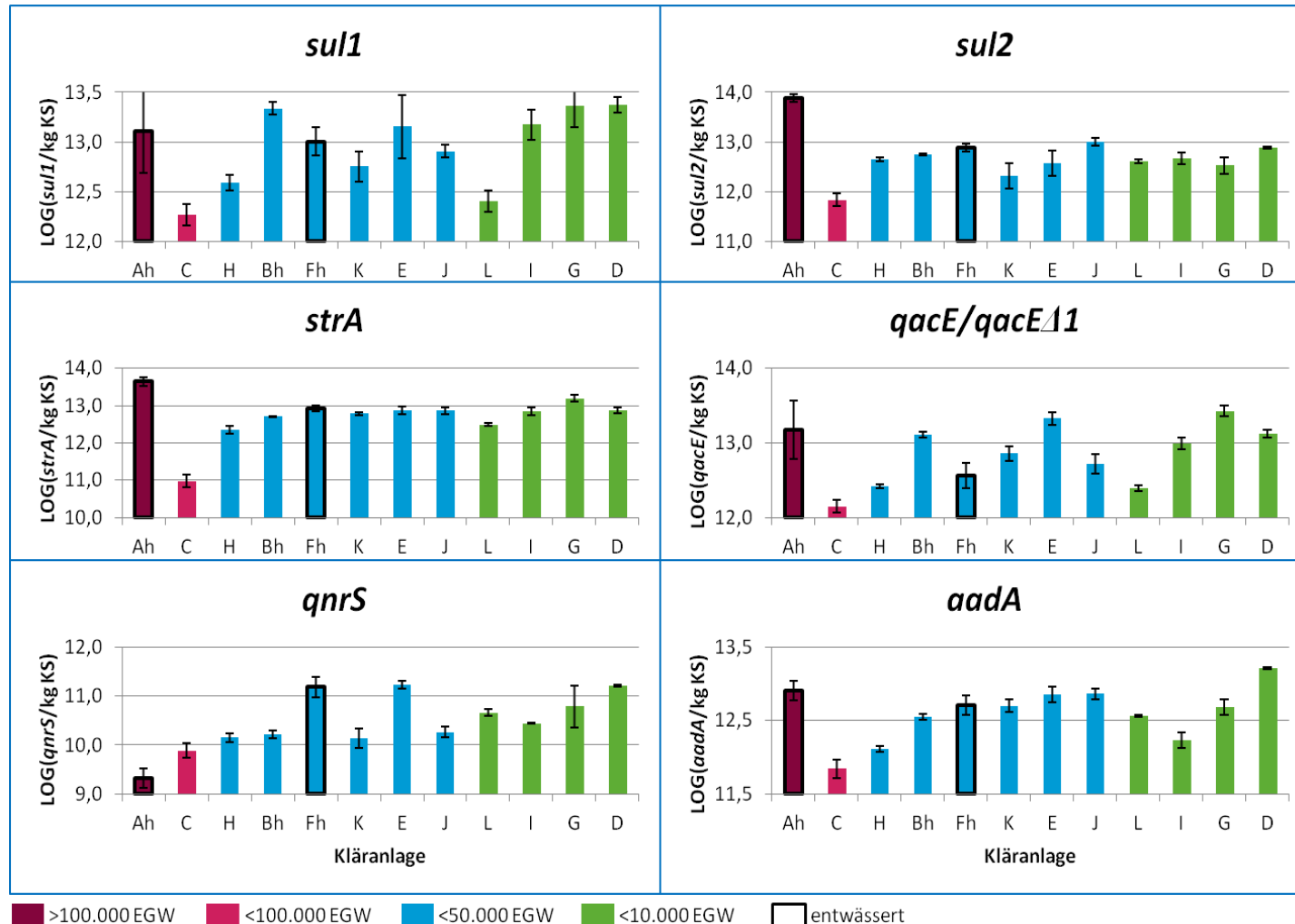
- ➡ Nährstoffe sind notwendig, um das Transferpotential zu aktivieren
- ➡ Geringere Zahl von Transkonjuganten aus Gülle im Vergleich zu begülltem Boden

Biosolids for safe land application: does wastewater treatment plant size matter when considering antibiotics, pollutants, microbiome, mobile genetic elements and associated resistance genes?

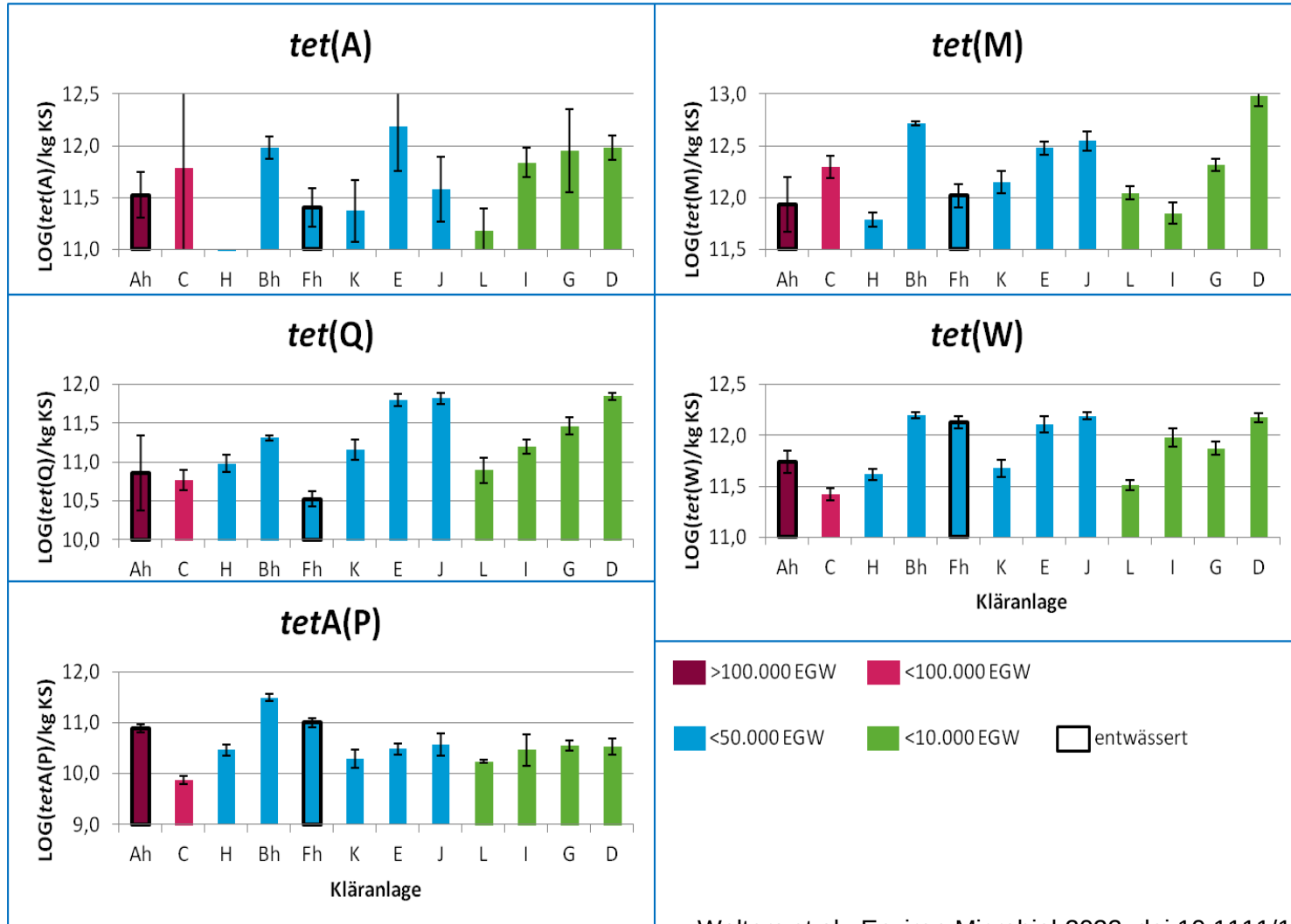
Wolters et al., Environ Microbiol 2022

WWTP	IEs*	Size	WWTP Treatment	State of biosolids	Hospital in catchment area	Biosolid disposal	Other features of catchment area
A ^L	>100,000	Large	Anaerobic digestion	Dewatered	Yes	Land use	Hospital
B ^M	<50,000	Medium	Anaerobic digestion	Liquid	Yes	Land use	Hospital, food industry
C ^L	<100,000	Large	Aerobic stabilization	Liquid	No	Incineration	Food industry
D ^S	< 10,000	Small	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	
E ^M	< 50,000	Medium	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	
F ^M	< 50,000	Medium	Anaerobic digestion	Dewatered	Yes	Land use	Hospital
G ^S	< 10,000	Small	Aerobic stabilization	Liquid, non-stabilized**	No	Land use**	
H ^M	< 50,000	Medium	Aerobic stabilization	Liquid	No	Incineration	
I ^S	< 10,000	Small	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	
J ^M	< 50,000	Medium	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	
K ^M	< 50,000	Medium	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	
L ^S	< 10,000	Small	Aerobic stabilization	Liquid	No	Land use	Amino-acid production factory

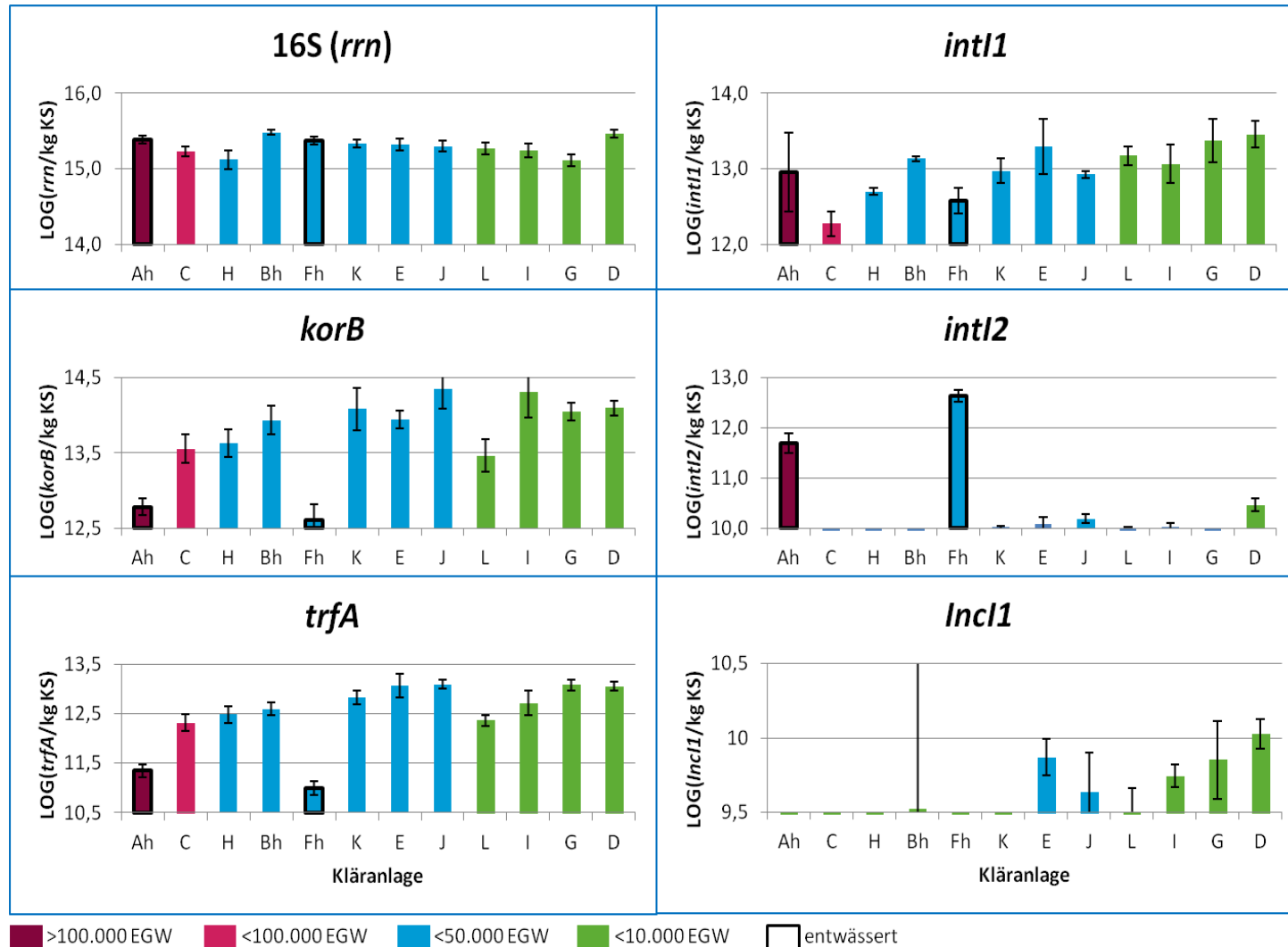
Antibiotika- und qac-Resistenzgene in Klärschlamm



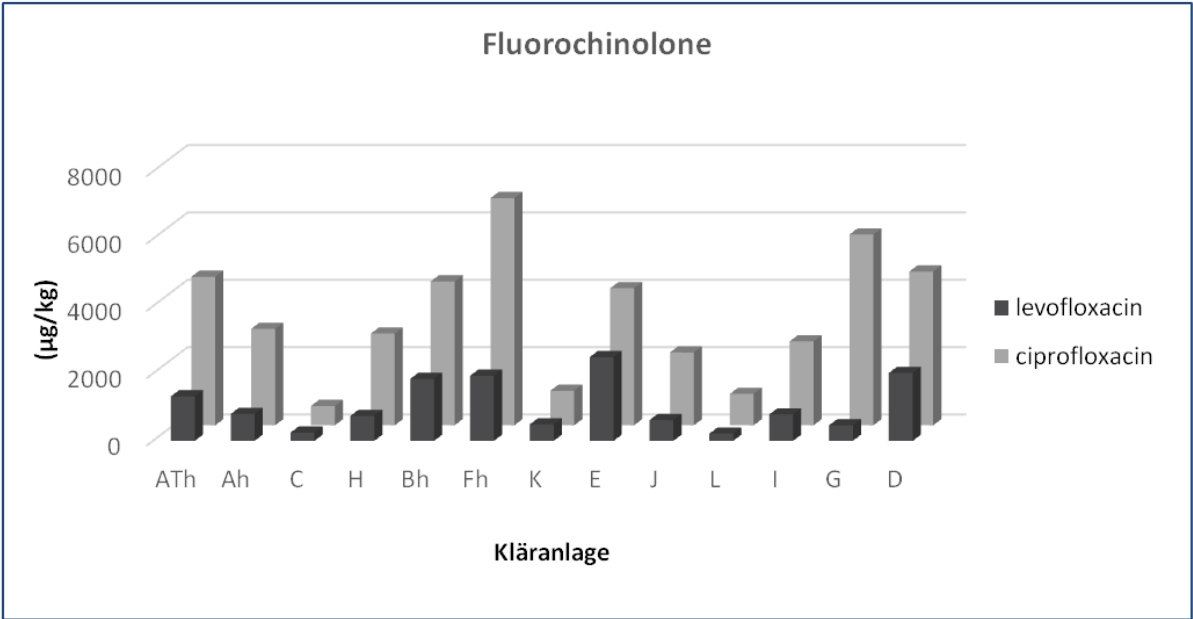
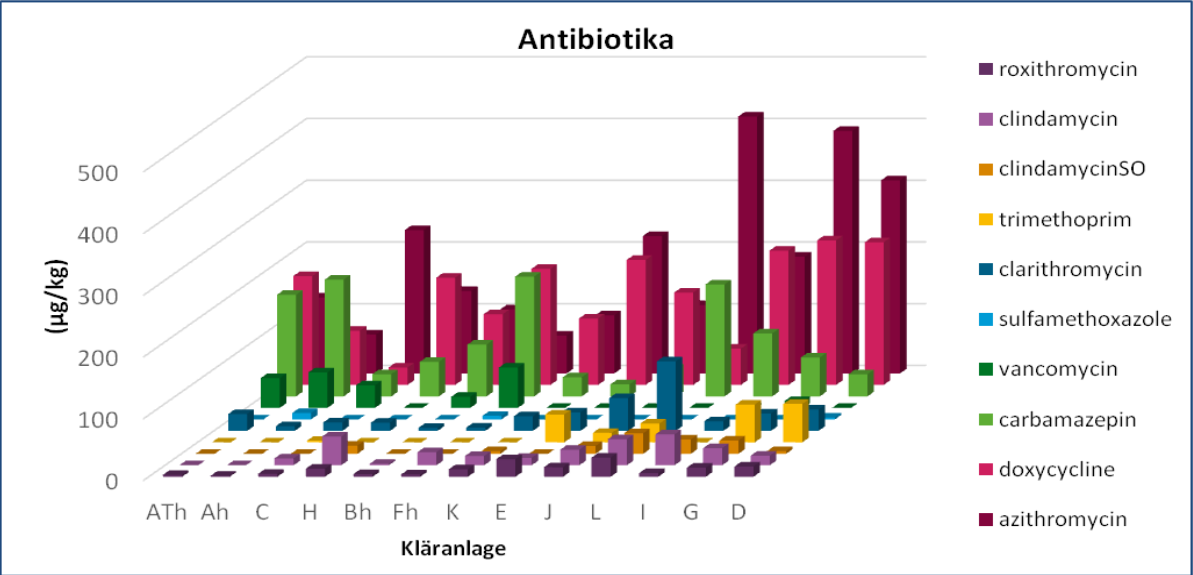
Tetrazyklin-Resistenzgene in Klärschlamm



Mobile genetische Elemente in Klärschlämmen

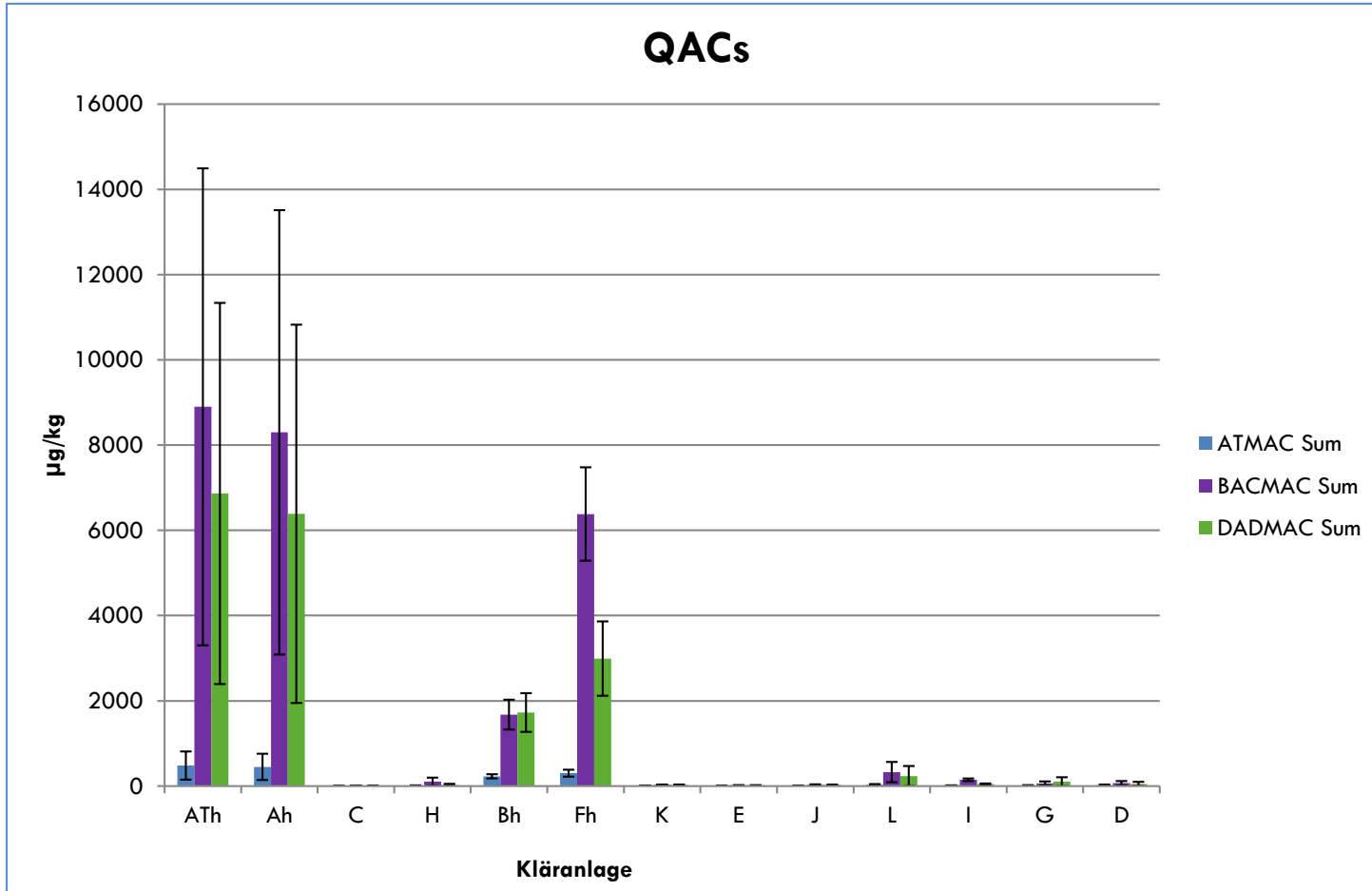


Antibiotika in Klärschlamm



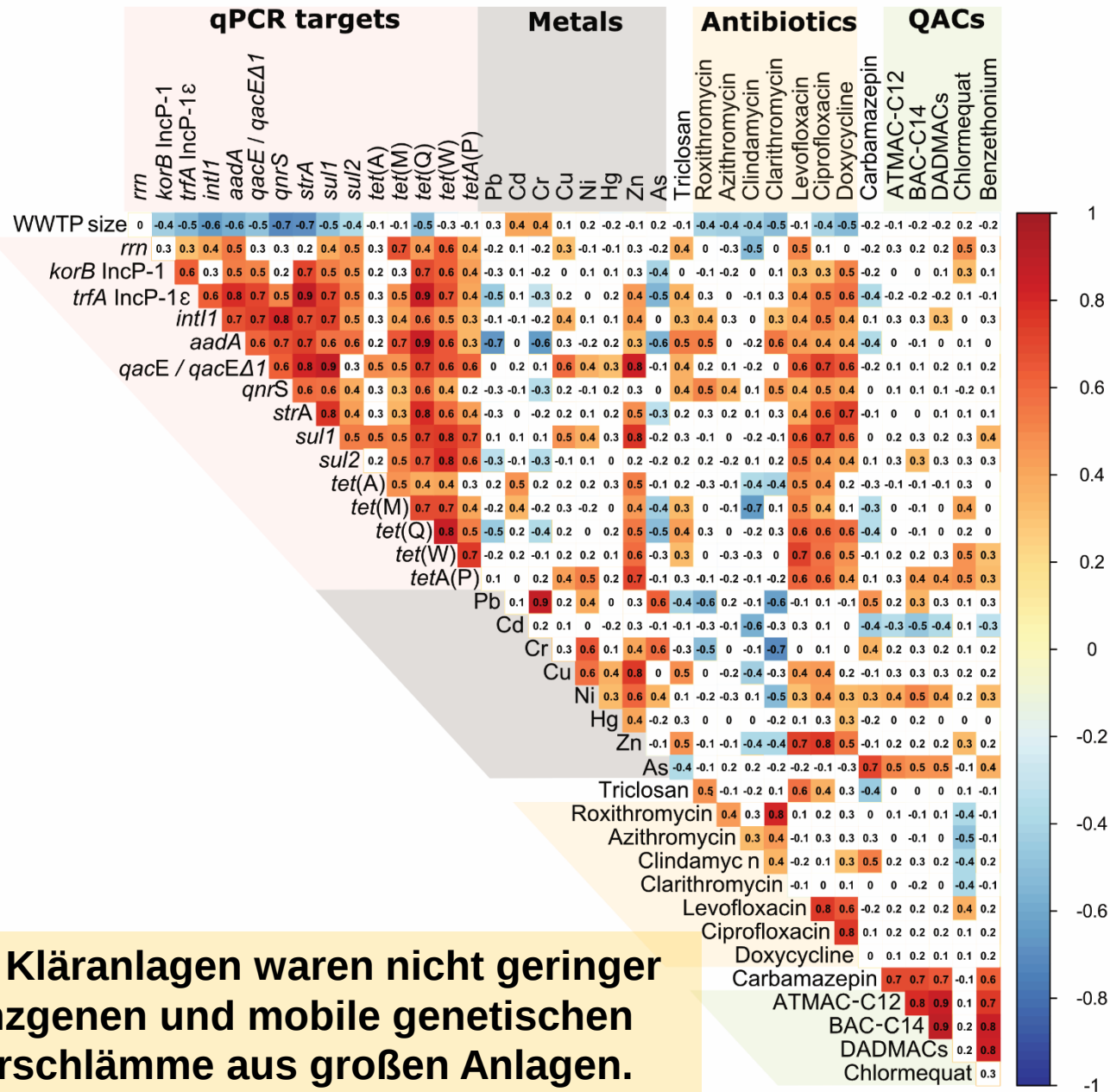
WWTP	IEs*
A ^L	>100,000
B ^M	<50,000
C ^L	<100,000
D ^S	< 10,000
E ^M	< 50,000
F ^M	< 50,000
G ^S	< 10,000
H ^M	< 50,000
I ^S	< 10,000
J ^M	< 50,000
K ^M	< 50,000
L ^S	< 10,000

Quartäre Ammoniumverbindungen in Klärschlämmen



WWTP	IEs*
A ^L	>100,000
B ^M	<50,000
C ^L	<100,000
D ^S	< 10,000
E ^M	< 50,000
F ^M	< 50,000
G ^S	< 10,000
H ^M	< 50,000
I ^S	< 10,000
J ^M	< 50,000
K ^M	< 50,000
L ^S	< 10,000

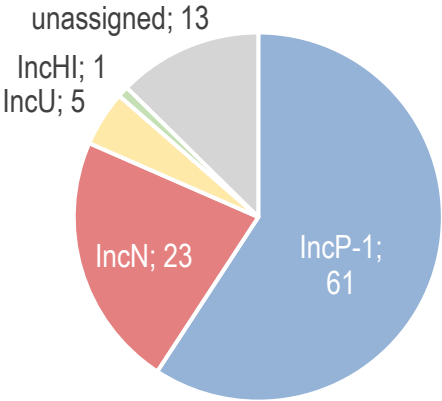
Korrelogramm zwischen allen in Klärschlamm gemessenen Parametern



Klärschlämme aus kleinen Kläranlagen waren nicht geringer mit Schadstoffen, Resistenzgenen und mobile genetischen Elementen belastet als Klärschlämme aus großen Anlagen.

Die exogene Plasmidisolierung wurde auch genutzt, um Plasmide aus Klärschlämmen zu isolieren

WWTP	Σ	IncP-1	IncP-1ε	IncN	IncHI1	IncU	int1	int2	qacE/ qacEΔ1	su1	su2	tet(A)	tet(M)
A-hd ^L	16	16	16	-	-	-	16	-	16	16	-	16	-
C ^L	16	12	9	4	-	-	10	-	10	10	5	10	4
B-h ^M	10	10	10	-	-	-	10	-	10	10	-	10	2
E ^M	4	1	-	-	-	3	4	-	4	4	-	-	-
F-hd ^M	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1
H ^M	11	7	5	-	1	-	8	-	7	7	2	5	4
J ^M	4	1	1	-	-	-	1	-	1	1	-	1	3
K ^M	15	7	5	8	-	-	7	-	6	7	8	12	1
G ^S	5	2	2	1	-	1	4	1	4	4	-	2	1
I ^S	13	1	-	6	-	-	3	-	3	3	3	5	-
L ^S	8	3	2	4	-	1	6	-	6	6	3	7	-
Σ	103	61	50	23	1	5	60	2	58	59	21	68	16



Identifitierung durch RT-PCR oder PCR-Replikon-Typing

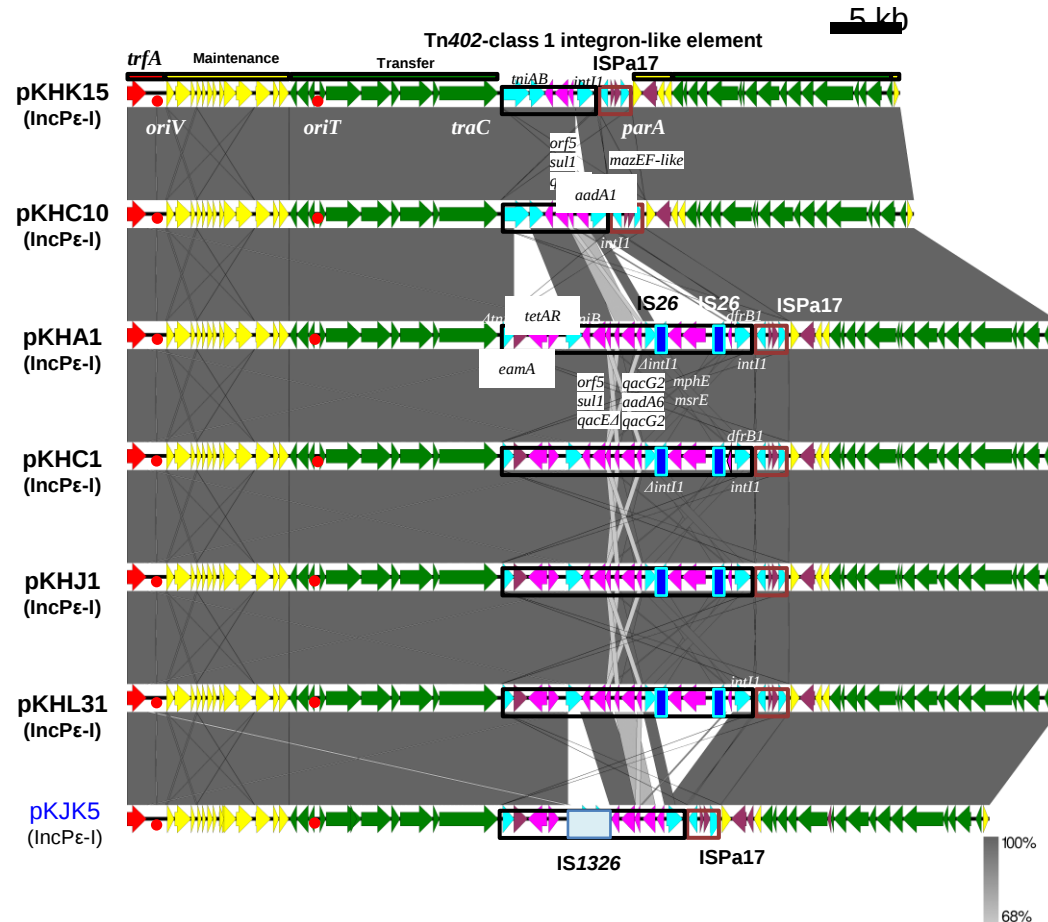
h: Krankenhaus im Einzugsgebiet; d: entwässerte Klärschlamme; S: kleine WWTP; M:mittlere WWTP; L: large WWTP

Mehrzahl der Plasmide gehörten der IncP und der IncN Gruppe an

Sequenzanalysen zeigen fast identische „backbone“ Gene und die Integration akzessorischer Gene zwischen *traC* und *parA*

IncP ϵ

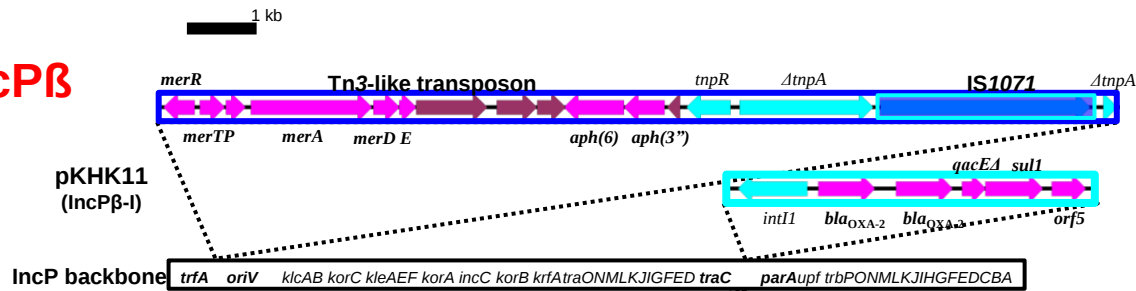
Breiter Wirtsbereich
Effizienter Transfer



IncP ϵ Plasmide wurden aus Klärschlämmen großer (pKHA1,7; pKHC1), mittlerer (pKHK15;pKHK16; pKHJ1) und kleiner (pKHL31) Kläranlagen isoliert

Erworbene Resistenzen

IncP β



Hg, SM, AMP, SDZ

SDZ

BAC*,SDZ

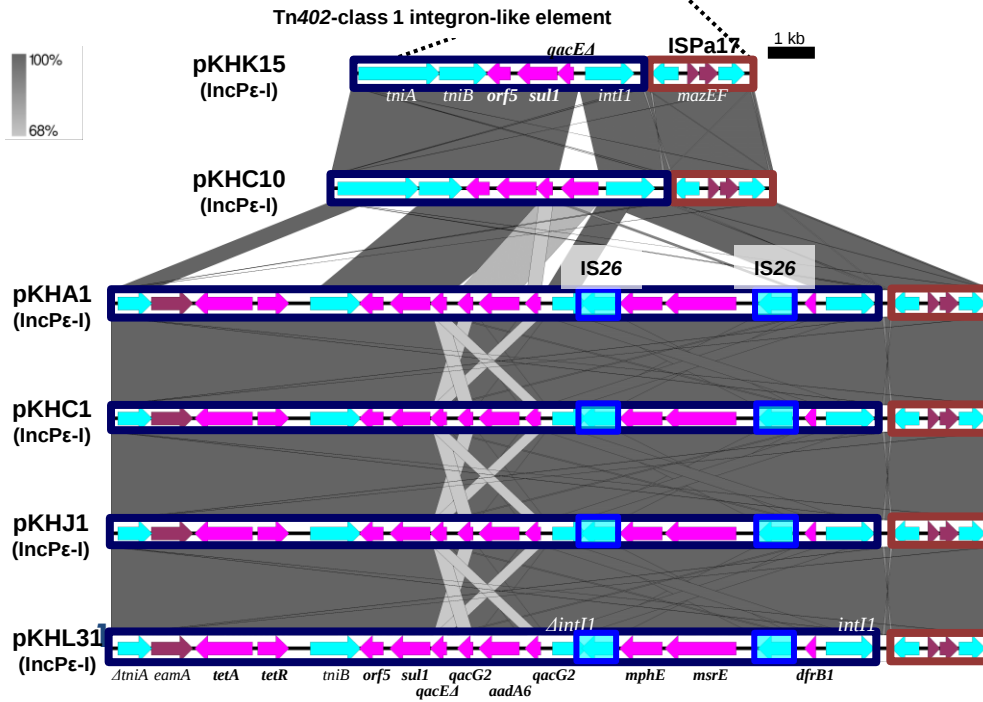
ERY, BAC, TET, SDZ, TMP

ERY, BAC, TET, SDZ, TMP

ERY, BAC, TET, SDZ, TMP

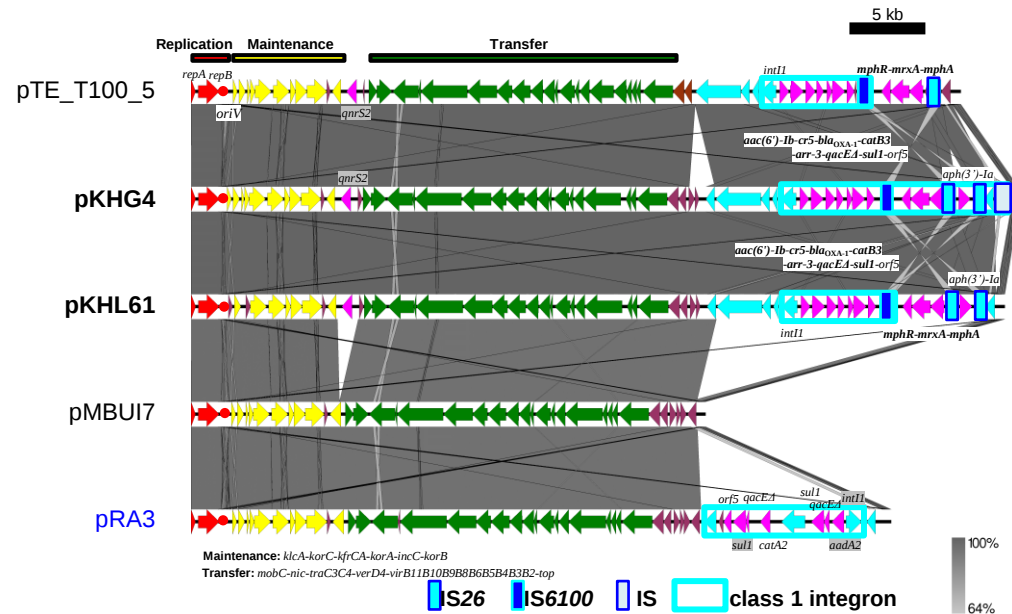
ERY, BAC, TET, SDZ, TMP

IncP ϵ



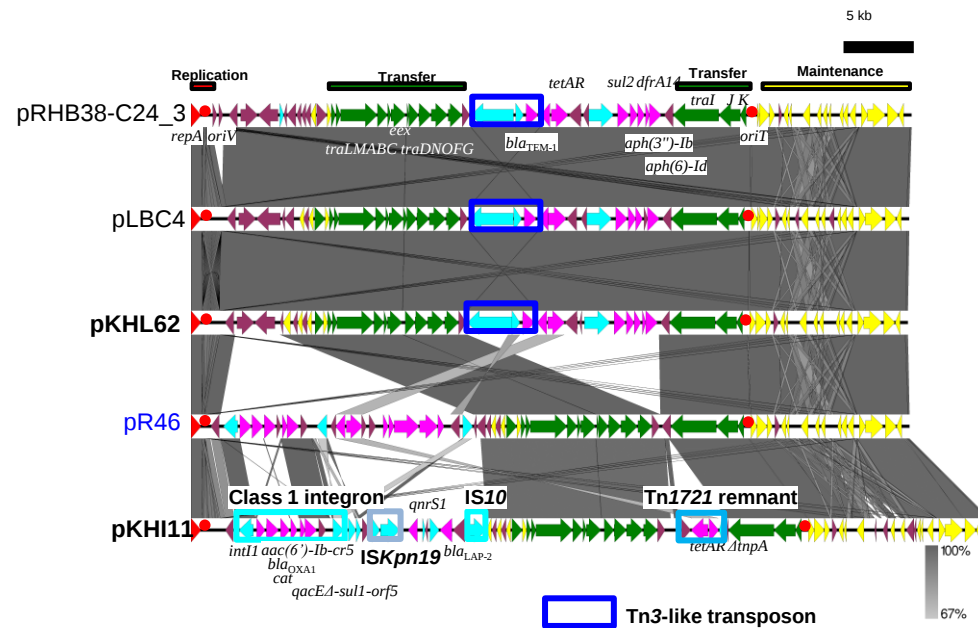
Sequenzanalysen von IncU Plasmiden - fast identische „backbone“ Gene wie das Referenzplasmid pRA3

IncU plasmids



Die zwei Plasmide pKHG4 und pKHL61 waren nicht nur in den “backbone” sondern auch in den akzessorischen Genen sehr ähnlich zu pTE_E100_5, aus Abwasser einer Kläranlage in Göteborg (Schweden).

IncN Plasmide

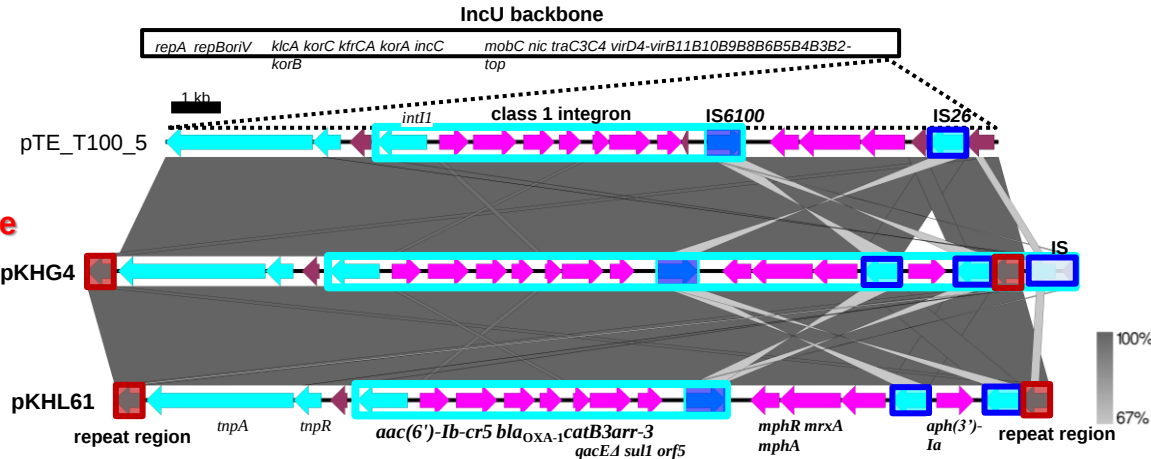


Beide IncN Plasmide stammen aus dem Klärschlamm von zwei kleinen Kläranlagen. Die genetische Struktur von pKHL62 zeigt eine hohe Ähnlichkeit zum Plasmid pLBC4 (exogen isoliert aus Bachsedimenten unterhalb einer Antibiotikaproduktionsstätte in Kroatien)

Akzessorische Gene

Erworbene Resistenzen

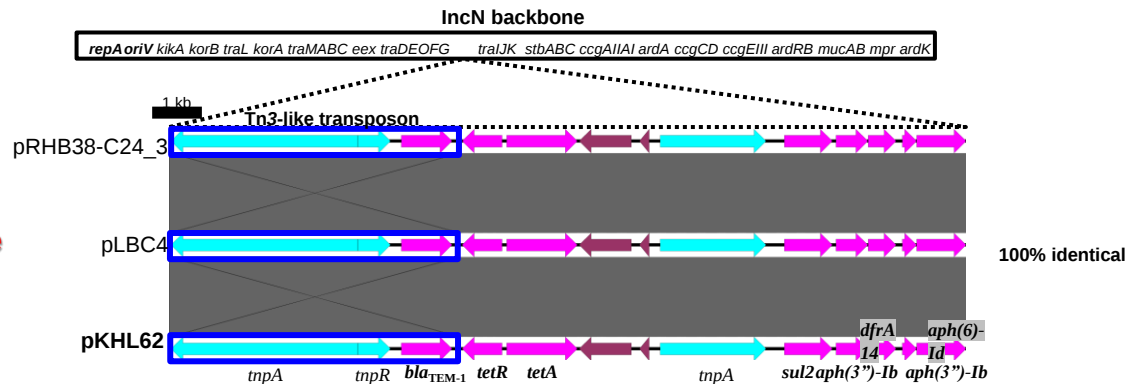
(A)



BAC, RIF, AMP,
CIP, SDZ, TET

BAC, RIF, AMP,
CIP, SDZ, TET

(B)



BAC*, AMP,
TET,
SDZ, TMP

Ko-Lokalisation verschiedener klinisch relevanter Antibiotikaresistenzgene
Die in der Veterinärmedizin verwendeten Sulfonamide oder Tetracykline können
klinisch relevante Resistenzgene selektieren

Das Pflanzenmikrobiom

Diverse Mikrobiome in Abhängigkeit vom Mikrohabitat

➤ Dominante bakterielle Phyla

- *Proteobacteria*
- *Firmicutes*
- *Actinobacteria*
- *Bacteroidetes*

Mikrobiom-Zusammensetzung abhängig:

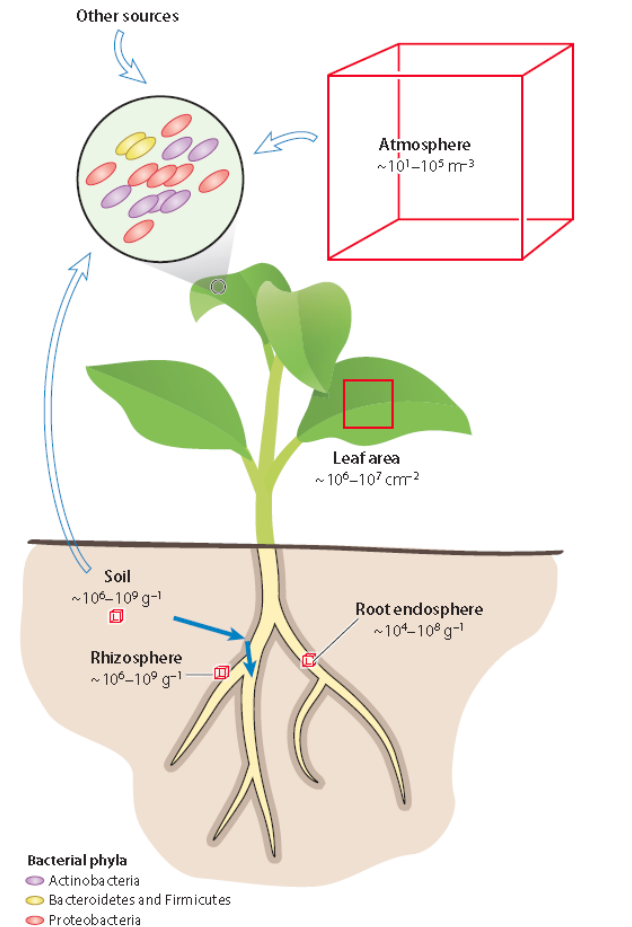
Pflanzenart, -genotype, -entwicklungsstadium,
Mikrohabitat, Bodentyp, der Beregnungswasser-
Qualität und von abiotischen und biotischen Faktoren

Phyllosphäre: 10^6 - 10^7 CFU/g

Heterogen Kolonisierungsmuster

Lokal hohe Zelldichten (Aggregate, Biofilme)

Heterogene Verteilung der Nährstoffes



Vorholt, 2012 Nature Microbiology, 828
Doi: 10.1038/nmicro2910

Bakterien, die mit Pflanzen assoziiert sind, gehören häufig zu Gattungen wie

Acinetobacter

Burkholderia

Enterobacter

Klebsiella

Citrobacter

Pseudomonas

Stenotrophomonas

Serratia

Raoultella

Viele Noskomialkeime gehören zu diesen Gattungen (Berg et al., 2005; Ryan et al., 2009).

Gründe für den Erfolg dieser Gattungen im Krankenhaus:

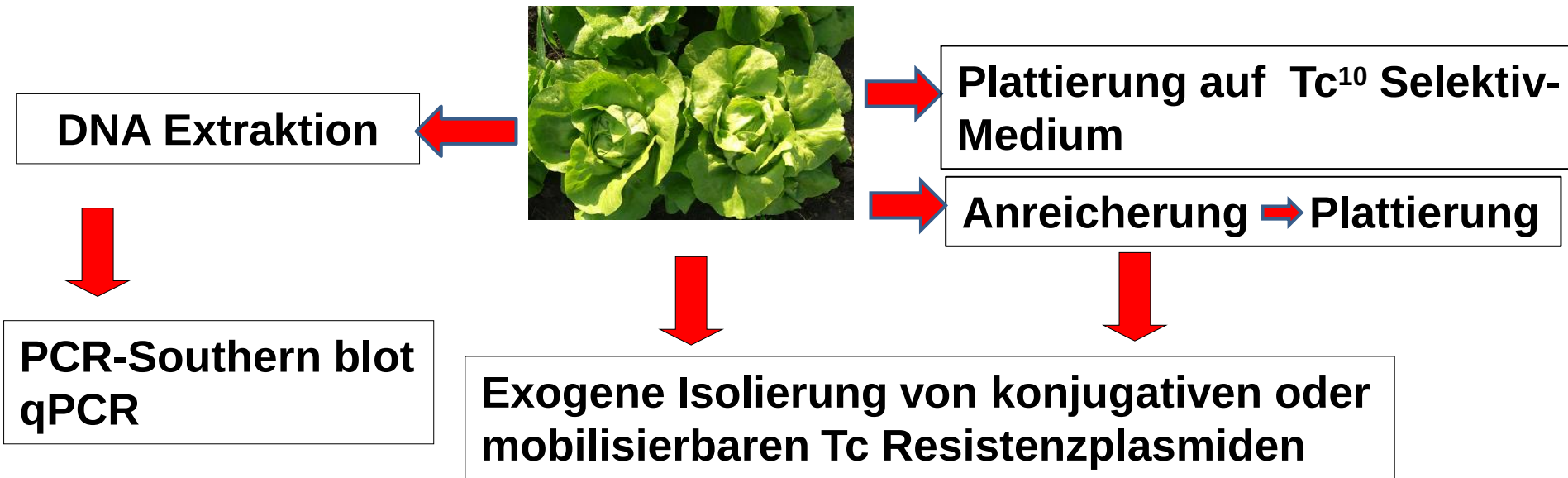
Viele Pflanzen-assoziierte Bakterien bilden Biofilme

Sie haben natürlicherweise Mehrfachantibiotikaresistenzen z.B. durch effiziente Effluxpumpen.

➡ dadurch haben sie einen Selektionsvorteil unter den Bedingungen im Krankenhaus

Im Pflanzenmikrobiom können- oft in geringen Zahlen- auch *E. coli* nachgewiesen werden

Übertragbare Antibiotikaresistenzplasmide in Pflanzen-assoziierten Bakterien



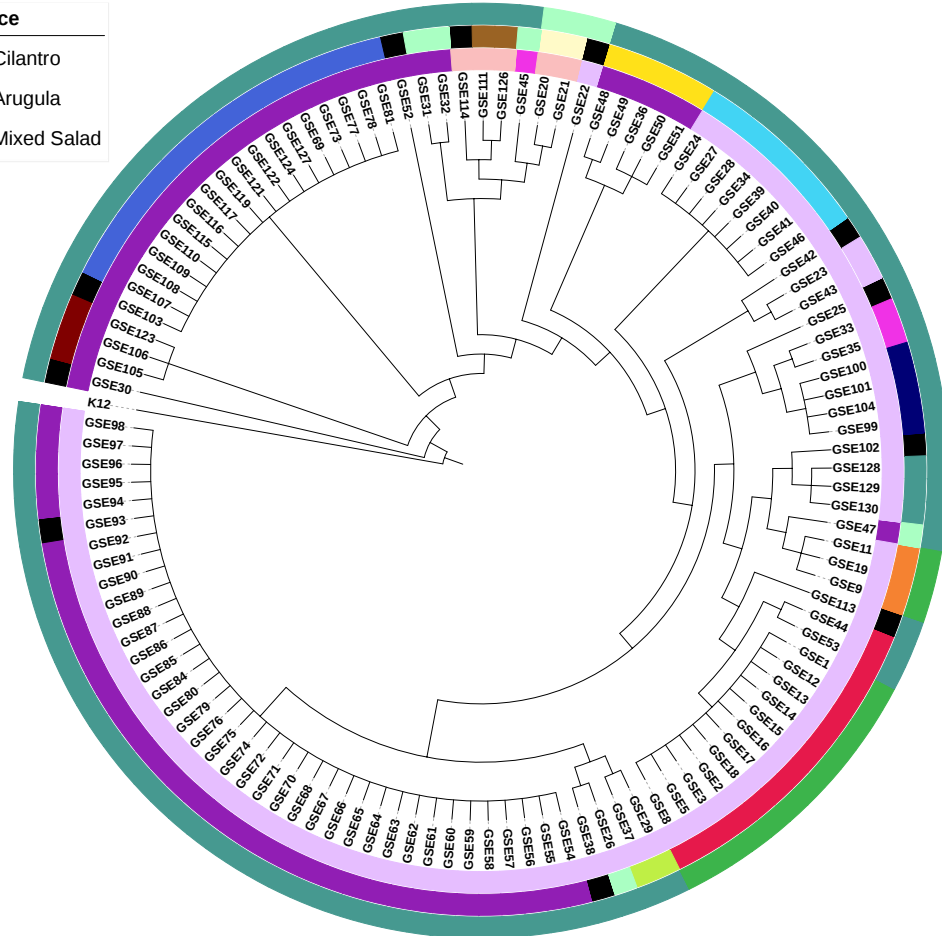
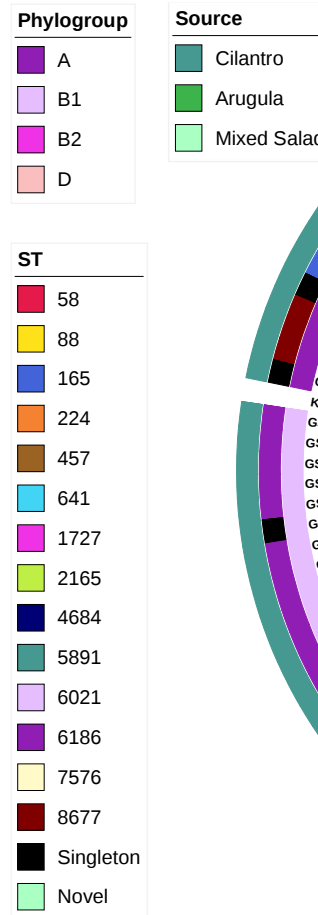
Genomsequenzierung von 120 *E. coli* Stämmen isoliert von Frischeprodukten

Phylogruppe B1 dominiert
häufigsten STs:

6186, 165, 58, 641, 88

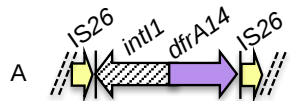
84/120 Stämmen trugen
Klasse 1 Integrans (*intI1*)

ST58: 2 von 14 Stämmen
mit ESBL gene *bla*_{CTX-M15}

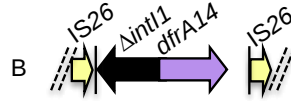


Genomsequenzierung von 120 *E. coli* Stämmen isoliert von Frischeprodukten

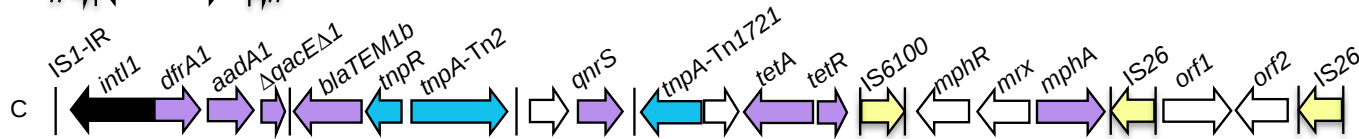
- Viele Klasse 1 Integrons waren auch mit Insertionssequenzen Elementen wie IS26 und verschiedenen ARGs assoziiert
- Die Detektion der gleichen Integrons in *E. coli*- Stämmen verschiedener Sequence types (STs) deutet auf horizontalen Gentransfer hin



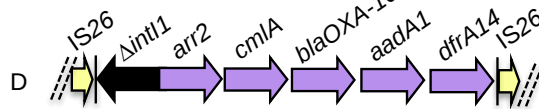
n=42; ST58, 88, 2165, 6186



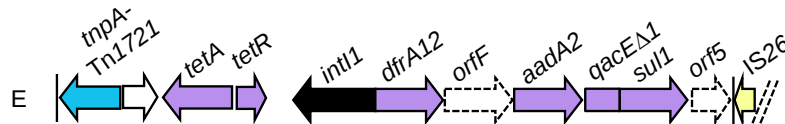
n=13; ST58, 641, 1704, 4684



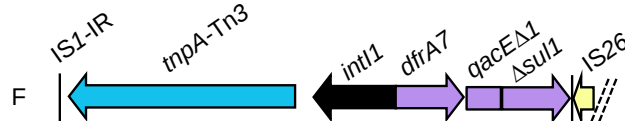
n=20; ST165, 457



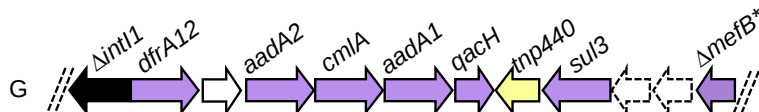
n=1, ST1704



n=1, ST345

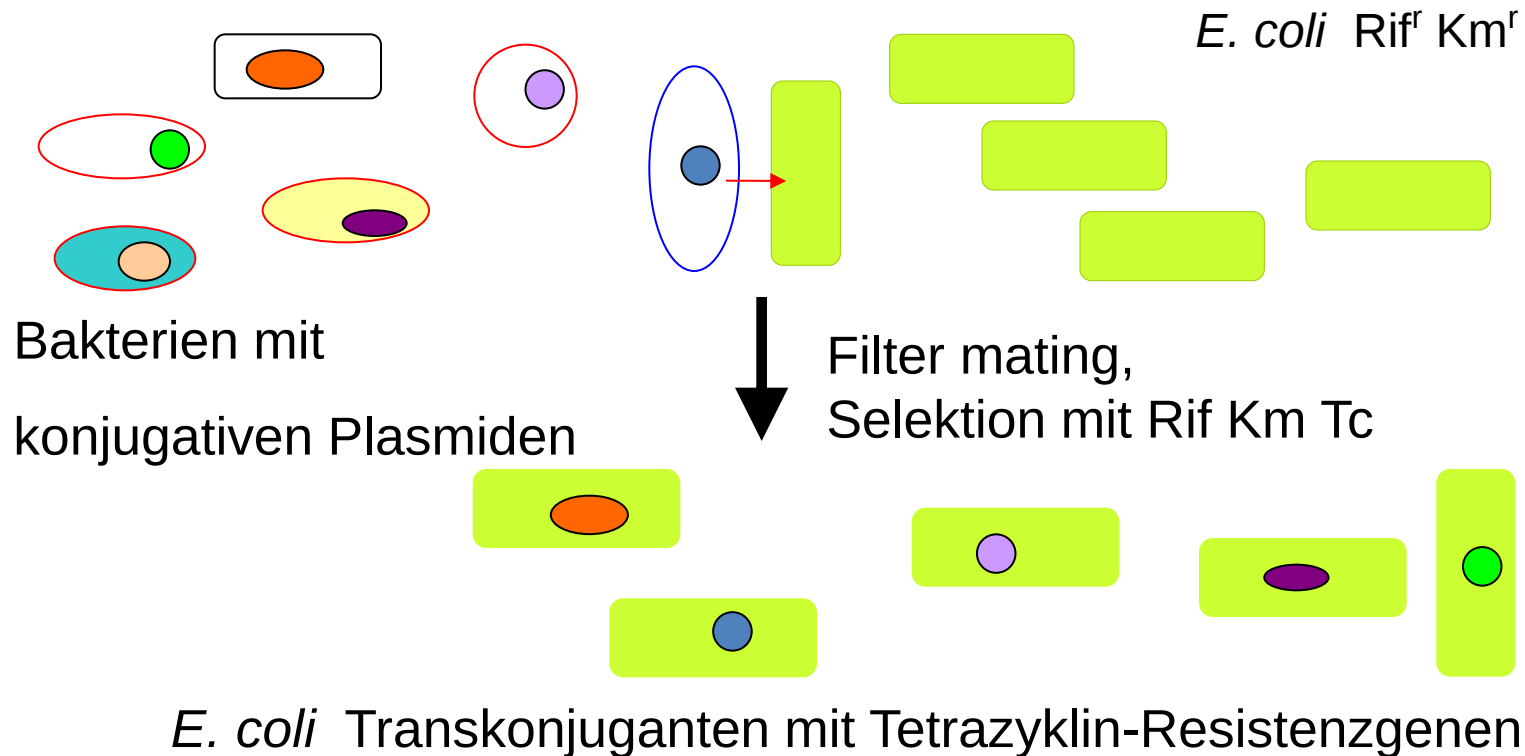


n=2, ST7576



n=3, ST224

Übertragbare Antibiotikaresistenzgene von Bakterien an Frischeprodukten



IncFIB und IncFII (TE, D, AM, AMX, CIP, NA, OFX)
IncI1 (TE, D, AM, AMX, CIP, OFX)
IncP β (TE, D, AM, AMX, Hg)

Nachweis von IncF, I1, I2 Plasmiden, *intI1* und *tet(A)* in TC-DNA extrahiert aus Frischeprodukten direkt oder nach Anreicherung

Produce	DNA		IncF		IncI1		IncI2		<i>intI1</i>		<i>tet(A)</i>	
			qPCR	Blot	qPCR	Blot	qPCR	Blot	qPCR	Blot	qPCR	Blot
Mixed salad	Direkte DNA-Extraktion	0	-	-	-	-	-	+++	+	(+++)	-	(++) ^{1*}
		7	-	-	-	-	-	+++	+	(+++)	-	(+++) ^{2*}
	Anreicherung	0	+	(+++)	+	(++)	+	+++	+	(+++)	+	(++) ^{2*}
		7	+	(+++)	+	(++)	+	+++	+	(+++)	+	+++
Rucola	Direkte DNA-Extraktion	0	-	-	-	-	-	(++) ^{3*}	+	(++)	-	(+++) ^{2*}
		7	-	-	-	-	-	(++) ^{1*}	+	(++)	-	(+++) ^{1*}
	Anreicherung	0	+	(+++)	-	-	+	+++	+	(++)	+	+++
		7	+	(+++)	-	-	+	+++	+	(++)	+	+++
Koriander	Direkte DNA-Extraktion	0	-	-	-	-	-	-	(+) ^{1*}	(++)	(+) ^{1*}	(+++) ^{3*}
		7	(+) ^{1*}	(++) ^{2*}	-	-	-	-	(+) ^{3*}	(+++)	(+) ^{2*}	(+++) ^{3*}
	Anreicherung	0	(+) ^{2*}	(+++) ^{2*}	(+) ^{1*}	(++) ^{2*}	-	-	(+) ^{3*}	(+++)	(+) ^{2*}	(+++) ^{3*}
		7	(+) ^{2*}	(+++) ^{2*}	(+) ^{2*}	(++) ^{2*}	-	-	(+) ^{3*}	(+++) ^{3*}	(+) ^{3*}	(+++) ^{3*}

(*): Number of positive replicates, -: Not detected or no signal, +: positive (qPCR), (++): Medium signal; (+++): Strong signal.

Faktoren, die das Mikrobiom und das übertragbare Resistom von Pflanzen beeinflussen

Pflanzenart und –sorte

Das Substrat (Bodentyp)

Beregnungsqualität

Nutzung organischer Dünger

Lagerung und Verarbeitung nach der Ernte: induzierte Mikrobiom-Verschiebungen

Zusammenfassung

- ➔ Das Mischen des Darmmikrobioms von Mensch (Klärschlämme) und Tier (Gülle und Gärreste) mit Bodenbakterien in Gegenwart von Nährstoffen und Selektionsdruck (Antibiotikareste) führt zum Wachstum von resistenten Populationen und stimuliert horizontalen Genaustausch.
- ➔ Organische Dünger tragen zu einem erhöhten Vorkommen von Bakterien mit transferablen Resistenzgenen im Boden und im Pflanzen-Mikrobiom bei.
- ➔ Mobile genetische Elemente wie Plasmide helfen ihren bakteriellen Wirten sich schnell an sich verändernde Umweltbedingungen anzupassen
- ➔ Das Pflanzenmikrobiom ist ein Reservoir für übertragbare Resistenzgene für Darmbakterien

Organische Dünger aber auch behandeltes Abwasser enthalten wichtige Nährstoffe für Pflanzen und Mikroorganismen. Aber die enthaltenen Mikroschadstoffe und Bakterien mit transferablen Antibiotikaresistenzen stellen ein mögliches Risiko dar. Die Reduzierung bzw. noch besser die Entfernung solcher Mikroschadstoffe ist daher dringend geboten.



Khald Blau



Sven Jechalke



Holger Heuer



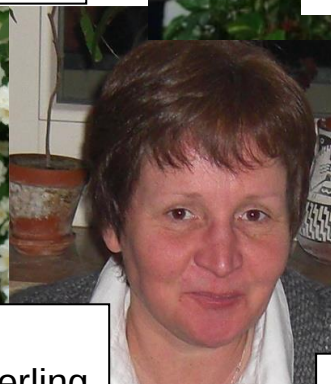
Birgit Wolters



Sara Gallego



Kristin Hauschild



Ute
Zimmerling



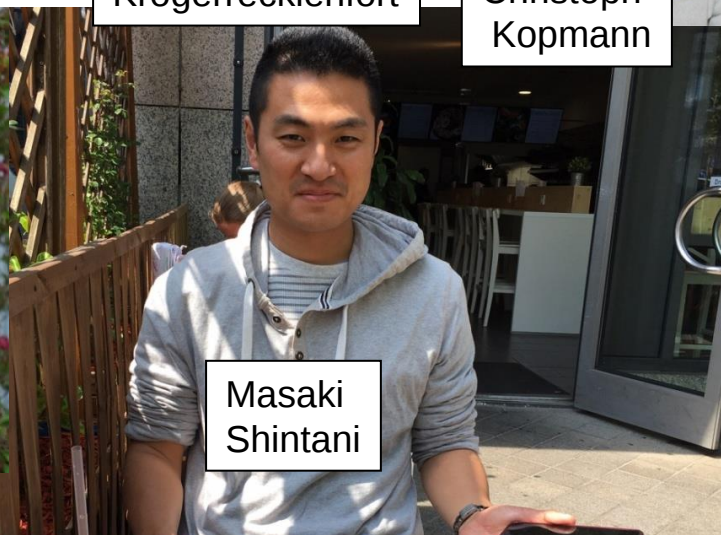
Ellen
Krögerrecklenfort



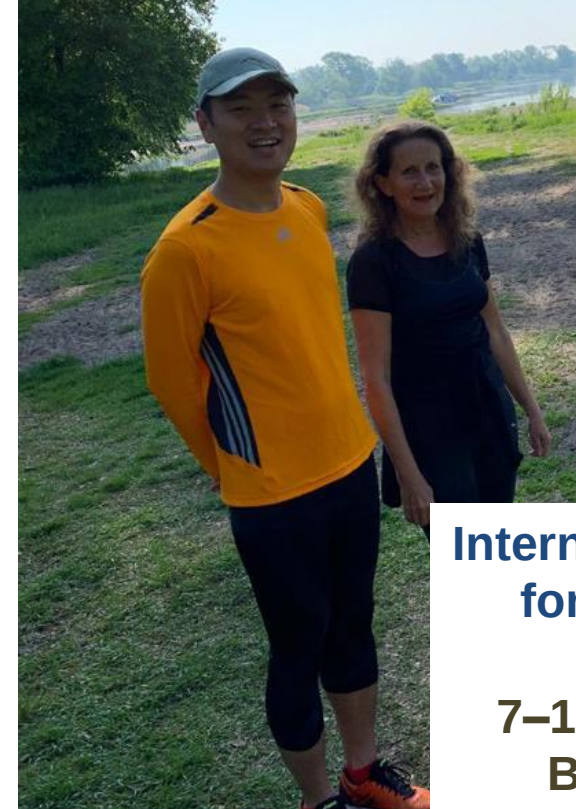
Christoph
Kopmann



Kornelia Smalla



Masaki
Shintani



International Symposium for Plasmid Biology

7–11 September 2026
Berlin, Germany

