

Pathogene Bakterien, die gegen ein oder mehrere Antibiotika resistent sind, werden zunehmend zu einem Problem. Schon heute sind den Medizinern zahlreiche Krankheitserreger bekannt, gegen die die üblichen Antibiotika nicht mehr wirken. Durch die langjährige und großzügige Verwendung von Antibiotika im Bereich der Human- und Veterinärmedizin sowie der Landwirtschaft ist diese Entwicklung begünstigt worden, denn Bakterien können genetisches Material aus ihrer Umgebung relativ leicht aufnehmen und untereinander austauschen. Vor diesem Hintergrund wird das Einfügen von Antibiotika-Resistenzgenen als Selektionsmarker in gentechnisch veränderten Pflanzen sehr kritisch betrachtet. Neue Methoden zum Aufspüren solcher Resistenzgene in der Umwelt haben es ermöglicht, das Risikopotenzial dieser transgenen Pflanzen mit anderen, bisher nicht erfassbaren Eintragungswegen zu vergleichen. Mit überraschenden Ergebnissen.

Mitte des letzten Jahrhunderts hatte durch den Einsatz von Antibiotika zur Bekämpfung von bakteriellen Krankheiten ein neues Zeitalter in der Human- und Veterinärmedizin begonnen. Antibiotika wurden jedoch auch zur Prophylaxe und als Wachstumsförderer in der Tierhaltung genutzt. Auf den einsetzenden Selektionsdruck reagierten die Bakterien außerordentlich schnell. Das Ausmaß der Antibiotika-Nutzung in den letzten 60 Jahren hat die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften geändert.

Horizontaler Gentransfer

Bakterien sind in ihren Leistungen immens vielfältig. Selbst innerhalb einer Art findet man unterschiedliche Stoffwechselfähigkeiten, zelluläre Strukturen und Lebensformen. Möglich wird dies durch

so genannte „mobile genetische Elemente“. Darunter versteht man unter anderem Plasmide (ringförmige DNA außerhalb des eigentlichen Bakterien-Chromosoms), Phagen (Bakterien befallende Viren, die genetisches Material in ihre Wirte verfrachten) oder Transposons (springende Gene). Dieses genetische Material kann zwischen Bakterien der gleichen Art, aber auch über die Artgrenzen hinweg ausgetauscht werden – sogar freie DNA können Bakterien aus ihrem Umgebungsmilieu aufnehmen. Ein solcher Austausch wird als „horizontaler Gentransfer“ bezeichnet. Sein Beitrag zur Anpassung und Diversität von Bakterien wurde lange Zeit unterschätzt. Durch den horizontalen Gentransfer können Bakterien viel leichter und in viel größerem Umfang Erbmaterial austauschen als dies zum Beispiel bei Tieren oder Pflanzen der Fall ist, deren Erbgut sich nur durch sexuelle Vorgänge zwischen Partnern der gleichen Art mischt.

Neben Pilzen können auch bestimmte Bakterien Antibiotika produzieren, zum Beispiel Rhizobakterien wie *Streptomyces* spp., *Erwinia carotovora* und *Pseudomonas aureofaciens*, die im Wurzelbereich von Pflanzen vorkommen. Die Antibiotika-produzierenden Stämme benötigen, um sich selbst zu schützen, entsprechende Resistenzgene. Epidemiologische Untersuchungen deuteten darauf hin, dass diese häufig auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert sind – damit auch durch horizontalen Gentransfer verbreitet werden können. Aber erst seit der Sequenzierung kompletter bakterieller Genome ist klar, dass ein relativ großer Anteil bakterieller Gene tatsächlich durch horizontalen Gentransfer erworben wurde. Ziel eines von der EU geförderten Projekts (MECBAD: „Mobile genetic elements' contribution to bacterial adaptability and diversity“) mit 45 Partnern aus 14 Ländern, das von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Bakterielle Antibiotika-Resistenzgene und horizontaler Gentransfer

Kornelia Smalla (Braunschweig)

Resistenzgene



(BBA) koordiniert wurde, war es, ein besseres Verständnis der Molekularbiologie und Ökologie des horizontalen Gentransfers von Bakterien zu erreichen.

Risikobewertung von Markergenen transgener Pflanzen

Gentechnisch veränderte (= transgene) Pflanzen besitzen häufig Antibiotika-Resistenzgene, die zusammen mit den eigentlich erwünschten genetischen Änderungen in die Pflanzen eingefügt wurden. Sie zeigen als so genannte Selektionsmarker an, ob die gentechnische Übertragung tatsächlich stattgefunden hat: Nur die Pflänzchen, die auf Antibiotika-haltigem Nährmedium überleben, sind transgen.

Dass solche Antibiotika-Resistenzgene durch horizontalen Gentransfer wieder zurück in Bakterien gelangen könnten, ist

in der Öffentlichkeit ein häufig heraufbeschworenes Risikoszenario. Was sind die wissenschaftlichen Fakten? Adsorbiert an Bodenpartikel kann Pflanzen-DNA über Wochen und Monate im Boden überdauern. 1998 konnte unsere Arbeitsgruppe erstmals zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen transgene Pflanzen-DNA von einem Bodenbakterium (*Acinetobacter sp.*) aufgenommen und stabil in das Bakteriengenom eingebaut werden kann. Ein solcher horizontaler Gentransfer konnte jedoch nur unter Laborbedingungen oder in sterilem Boden mit sehr geringer Häufigkeit beobachtet werden.

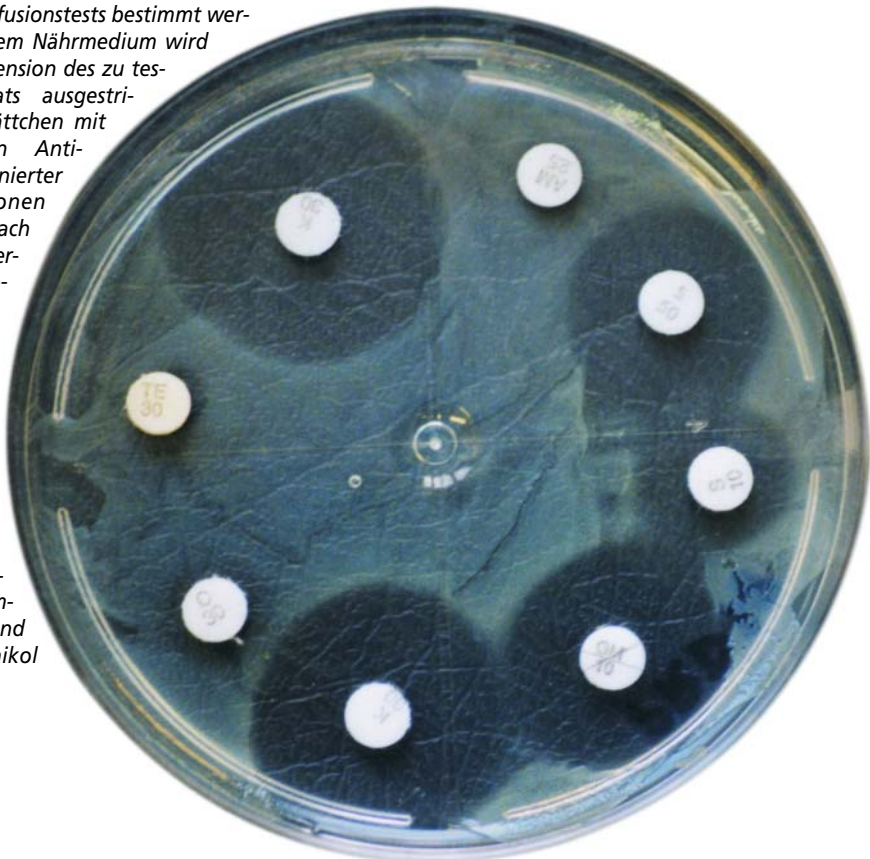
Die Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG schreibt fest, dass die Verwendung von Antibiotika-Resistenzmarkern mit klinischer Relevanz in vermarkteten transgenen Pflanzen ab 2005, in freigesetzten transgenen Pflanzen ab 2009 nicht mehr zulässig ist. Um das Risikopotenzial der unterschiedlichen Markergene wissenschaftlich fundiert bewerten zu können, müssen genaue Kenntnisse zum horizon-

talen Gentransfer vorliegen. Daneben muss auch das natürliche Reservoir der jeweiligen Antibiotikaresistenz, also die Verbreitung der entsprechenden Resistenzgene in „normalen“ Bodenbakterien, abgeschätzt werden.

Neue Verfahren ermöglichen Erkenntnisprung

Traditionell wurden Antibiotika-resistente Bakterien durch Kultivierung auf so genannten Selektivmedien, denen Antibiotika zugesetzt wurden, isoliert. Bakterien, die auf diesen Selektivmedien wachsen konnten, waren offensichtlich resistent. Die Antibiotika-Resistenzmuster von Bakterienisolaten werden häufig auch mit dem Plättchen-Diffusionstest ermittelt (Abb. 1). Welchen genetischen Hintergrund die Resistenz hatte, ließ sich damit allerdings nicht klären. Erst durch den Ein-

Abb. 1: Antibiotika-Resistenzmuster von Bakterien-Isolaten können mit Hilfe des Plättchen-Diffusionstests bestimmt werden. Auf einem Nährmedium wird eine Zellsuspension des zu testenden Isolats ausgestrichen und Plättchen mit verschiedenen Antibiotika definierter Konzentrationen aufgelegt. Nach Bebrütung werden Hemmhöfe um die Plättchen der Antibiotika sichtbar, gegen die das Bakterien-Isolat empfindlich ist. Das hier getestete Isolat ist gegen Tetracyclin, Ampicillin und Chloramphenikol resistent.



satz molekularbiologischer und biochemischer Methoden wissen wir heute, dass eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum durch ganz unterschiedliche Gene im Bakterium verursacht werden kann. So können Gene zum Beispiel die Bildung von Enzymen steuern, die zu einer Inaktivierung des Antibiotikums führen oder aber zur Modifizierung des Antibiotika-Bindungsortes.

Trotz der Bedeutung von Antibiotika-Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen war das Wissen über ihr Vorkommen in Umweltbakterien bis vor wenigen Jahren sehr gering. Untersuchungen wurden durch den Umstand erschwert, dass nur ein kleiner Anteil von Bakterien aus einer Umweltprobe mit traditionellen Kultivierungsbedingungen isoliert werden kann. So wird der Anteil der kultivierbaren Bakterien aus Meerwasser auf 0,0001–0,1 %, aus Süßwasser auf 0,25 %, aus Belebtschlamm auf 1–15 % und aus Boden auf 0,3 % geschätzt. Außerdem kann Umweltstress, zum Beispiel hohe Salzkonzentration oder UV-Strahlung, bei vielen normalerweise kultivierbaren Bakterien dazu führen, dass sie nicht mehr in der Lage sind, auf einem Nährmedium zu wachsen, obwohl sie lebensfähig sind. Aus den genannten Gründen haben verschiedene Arbeitsgruppen – auch aus der BBA in Braunschweig – in den letzten Jahren Methoden entwickelt, mit denen Umwelt-

proben auch ohne Kultivierungstechniken auf Antibiotika-Resistenzgene und mobile genetische Elemente untersucht werden können (s. Abb. 2).

So ist es in den 90er Jahren möglich geworden, DNA aus Umweltproben direkt zu extrahieren. Mit Hilfe der PCR (Polymerase-Chain-Reaction) lässt sich das Erbmaterial aller in einer Probe befindlichen Bakterien höchst empfindlich auf das Vorkommen von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen untersuchen, unabhängig davon, ob die Bakterien auf Agar kultivierbar sind oder nicht.

Mit den PCR-basierenden Nachweisverfahren lassen sich große Probenzahlen in relativ kurzer Zeit untersuchen. Daher sind sie für ein Umweltmonitoring besonders gut geeignet. Allerdings kann man auf diese Weise lediglich nachweisen, ob eine spezifische DNA-Sequenz in der Probe vorhanden ist – eine weitere Charakterisierung des entsprechenden mobilen genetischen Elements ist nicht möglich. Doch auch hier ist man mittlerweile weiter gekommen.

Ein elegantes Verfahren, mobile genetische Elemente, die Antibiotika-Resistenzgene tragen, unabhängig von der Kultivierbarkeit des ursprünglichen Wirts zu isolieren, nutzt leicht selektierbare Rezipienten-Stämme (= Stämme, die DNA aufnehmen). Diese werden mit den Bakterien einer Umweltprobe gemischt und

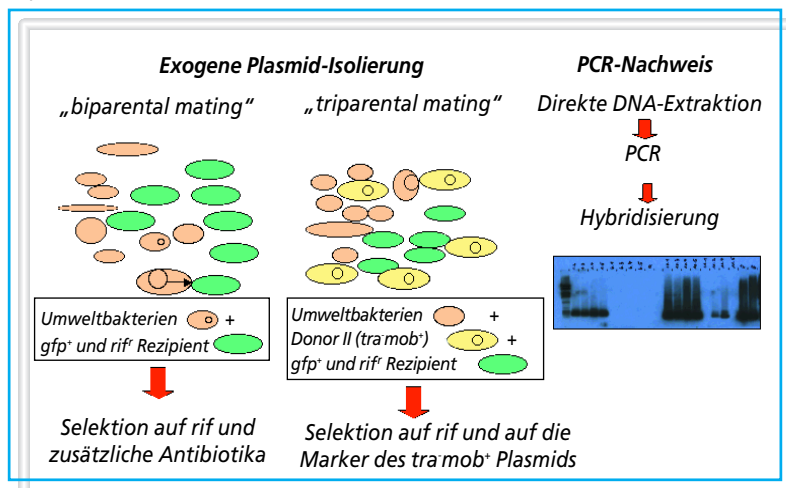
inkubiert. Nur wenn der Rezipienten-Stamm ein auf einem mobilen genetischen Element lokalisiertes Antibiotika-Resistenzgen aufgenommen hat, ist er in der Lage, nach dem so genannten „biparental mating“ auf dem Antibiotika-haltigen Selektivmedium zu wachsen (s. Abb. 2). Diese Methode erlaubt es, aus Umweltproben übertragbare Antibiotika-Resistenzen unabhängig von der Kultivierbarkeit des ursprünglichen Wirtsbakteriums zu fischen.

Ein weiteres Verfahren, mit dem man sogar mobile genetische Elemente aufspüren kann, die selbst keine Resistenzgene oder ähnliche charakteristische Sequenzen aufweisen, aber Gene zwischen Bakterien transportieren können, wurde von unserer Arbeitsgruppe zur Untersuchung von Böden und Gülle genutzt. Die Idee hinter dem so genannten „triparental mating“ ist folgende:

Man arbeitet mit drei „Partnern“: Ein Partner sind die Bakterien aus der zu untersuchenden Umweltprobe, bei denen unbekannte mobile genetische Elemente vermutet werden. Dazu kommt als zweiter Partner ein *E. coli*-Stamm mit einem selektierbaren, nicht-selbsttransferablen Plasmid, das eine Resistenz gegen ein Antibiotikum X bewirkt. Als Drittes kommt ein Rezipienten-Stamm ins Spiel, der gegen ein Antibiotikum Y resistent ist. Dieser Bakterien-Cocktail wird inkubiert und danach auf ein Selektivmedium ausgebracht, das die Antibiotika X und Y enthält. Kann der Rezipienten-Stamm dort wachsen, bedeutet dies, dass in der Umweltprobe Bakterien mit mobilen genetischen Elementen vorhanden waren, die das nicht-selbsttransferable Plasmid aus dem *E. coli*-Stamm in den Rezipienten-Stamm übertragen haben (s. Abb. 2). Auf diese Weise lässt sich mit dem „triparental mating“ die genmobilisierende Aktivität von Umweltproben untersuchen.

Abb. 2: Kultivierungsunabhängige Methoden zur Untersuchung des Vorkommens von Antibiotika-Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen.

gfp: Gen für das grün-fluoreszierende Protein; *rif*: Rifampicin-Resistenz als Selektionsmarker für den Rezipienten; *tra mob*: ein nicht selbsttransferables aber durch ein Helferplasmid mobilisierbares Plasmid



Erkenntnisse über Antibiotika-Resistenzgene in Umweltbakterien

Im Rahmen verschiedener EU-Projekte, an denen auch die Biologische Bundesanstalt beteiligt war, wurden diese neuen Nachweismethoden eingesetzt, um das

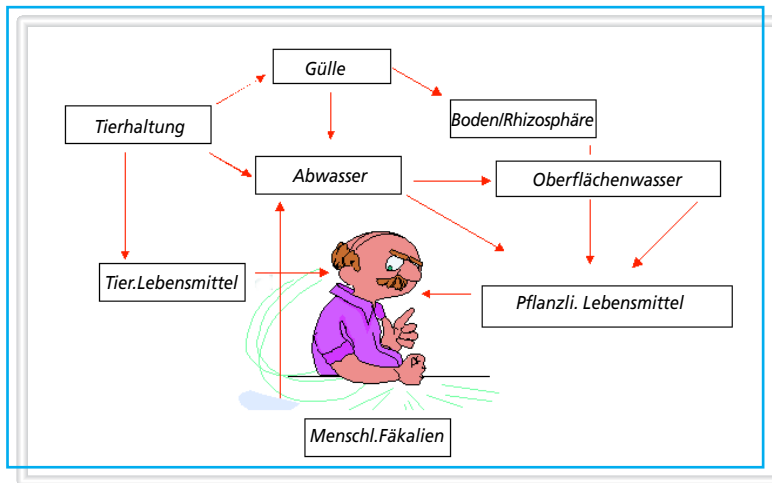


Abb. 3: Mögliche Verbreitungswege von Bakterien mit Antibiotika-Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen

Vorkommen und die Vielfalt von Antibiotika-Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen in Umweltbakterien zu untersuchen.

Überraschendes Ergebnis der Tests von Böden, Abwasser und Gülle war: Aus all diesen Proben konnten mobile genetische Elemente isoliert werden, die in der Lage sind, nicht-selbsttransferable DNA zu übertragen. Mit unseren Arbeiten konnten wir erstmals unter Feldbedingungen nachweisen, dass solche genomobilisierende Aktivität in begülltem, nicht aber in unbegülltem Boden vorhanden war.

Dass Gentransfer nicht nur unter optimalen Laborbedingungen, sondern auch unter Feldbedingungen in beträchtlichem Ausmaß stattfinden kann, zeigten zum Beispiel auch die Arbeiten von Mark Bailey aus Oxford. Er konnte nachweisen, dass ein *Pseudomonas fluorescens*-Stamm, der gezielt in den Boden eines Zuckerrübenfeldes ausgebracht worden war, dort Plasmide aufgenommen hatte, die ihn unempfindlich gegen Quecksilber-Belastung machten.

Übertragbare Resistenzgene gegen Streptomycin, Gentamycin und Tetracyclin konnten in Boden, Rhizosphäre (Wurzelsbereich von Pflanzen), Belebtschlamm, Gülle und Meerwasserproben nachgewiesen werden. Plasmide mit einem extrem breiten Wirtsbereich, die Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika vermitteln (IncP, IncQ-Plasmide), wurden besonders häufig aus Tiergülle oder Be-

lebtschlamm isoliert. So konnten wir in Schweinegülle mit Hilfe der PCR-Technik alle bekannten Gentamycin-Resistenzgene und Plasmide mit breitem Wirtsbereich nachweisen. Da solche Plasmide unter Umweltbedingungen effizient übertragen werden, dürfte ihnen eine wichtige Rolle bei der Verbreitung von Antibiotika-Resistenzgenen über Artgrenzen hinweg zukommen.

Bewertung im Kontext

Im Lichte der neuen Erkenntnisse lässt sich das Risiko, dass durch transgene Pflanzen Antibiotikaresistenz-Gene in die

Mehr über Antibiotika-Resistenzgene und mobile genetische Elemente können Sie in der im November 2002 erschienenen Sonderausgabe von FEMS Microbiology Ecology zum Thema „Mobile genetic elements' contribution to bacterial adaptability and diversity“ erfahren. Editoren: Kornelia Smalla (BBA Braunschweig) und John Fry (University of Wales, Cardiff). Informationen zu dem von der BBA koordinierten EU-Forschungsprojekt MECBAD („Mobile genetic elements' contribution to bacterial adaptability and diversity“) finden Sie im Internet unter <http://mecbad.bba.de>.

Umwelt ausgebracht und von Bakterien aufgenommen werden, relativieren. Zwar ist ein solcher Gentransfer auch unter Freilandbedingungen nicht gänzlich auszuschließen (und deshalb ist es auch sinnvoll, für künftige transgene Pflanzen andere Selektionsmarker als Antibiotika-Resistenzgene zu verwenden), die wahren Probleme liegen aber – wie die Untersuchung der Schweinegülle gezeigt hat – woanders.

Durch die neu entwickelten molekularbiologischen Untersuchungsmethoden lässt sich die Problematik der zunehmenden Antibiotika-Resistenz jetzt erstmals in einem größeren Zusammenhang sehen. Die geschilderten Ergebnisse haben deutlich gemacht, dass Bakterien mit Antibiotika-Resistenzgenen in den verschiedensten Habitaten weit verbreitet sind und zwischen diesen zirkulieren können (Abb. 3). Da sie oft auf mobilen genetischen Einheiten lokalisiert sind, können sie durch horizontalen Gentransfer leicht zwischen Bakterien verbreitet werden. Unter Selektionsdruck, wie er bei der häufigen Anwendung von Antibiotika besteht, haben die Bakterienpopulationen, die bereits mit entsprechenden Resistenzgenen ausgerüstet sind oder sie durch Gentransfer erwerben, einen Selektionsvorteil.

Wenn man vermeiden will, dass sich auch bei humanpathogenen Bakterien Stämme mit Mehrfachantibiotika-Resistenzen weiter ausbilden und durchsetzen, muss man vor allem im humanmedizinischen Bereich sehr sensibel mit der Verabreichung von Antibiotika umgehen. Daneben ist auch bei der Tierproduktion die Verwendung von Antibiotika auf das notwendigste Maß zu beschränken. ■



PD Dr. Kornelia Smalla,
Biologische Bundesanstalt
für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Pflanzenvirologie,
Mikrobiologie und biologische Sicherheit,
Messeweg 11–12, 38104
Braunschweig, E-mail:

k.smalla@bba.de

Die Autorin dankt Dr. Michael Welling für seine große Hilfe, das Manuskript allgemeinverständlich abzufassen.