

Technische Universität München

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

**Prävalenz und Biodiversität von
Listeria Spezies in limnischen Habitaten**

Evi Lang Halter

2011

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Prävalenz und Biodiversität von
Listeria Spezies in limnischen Habitaten

Evi Lang Halter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender Univ.-Prof. Dr. U. M. Kulozik

Prüfer der Dissertation

1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer

Die Dissertation wurde am 26.05.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.08.2011 angenommen.

Experimente scheitern nie.
Jedes Experiment ist Teil eines Lernprozesses,
das hat mir die Furcht vorm Scheitern genommen.

Francesca v. Habsburg-Thyssen

Danksagung

Diese Dissertation wurde in der Abteilung Mikrobiologie des ZIEL Weihenstephan an der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Siegfried Scherer angefertigt. Ich möchte mich bei Herrn Scherer für das in mich gesetzte Vertrauen und die gute Betreuung meiner Arbeit sehr herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Johann Bauer danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats.

Ich möchte mich bei der Vereinigung zur Förderung der milchwissenschaftlichen Forschung an der TU München in Freising-Weihenstephan e. V. bedanken, aus deren Mitteln diese Arbeit teilweise gefördert wurde.

Mein besonderer Dank gilt meiner ehemaligen Pathogendiagnostik-Arbeitsgruppe. Allen voran möchte ich mich herzlich bei Angela Felsl für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken. Allein hätte ich die vielen Probenansätze sowie die Handhabung von rund 5000 *Listeria*-Isolaten niemals bewältigen können.

Ein sehr herzliches Dankeschön geht überdies an Rita Festl, Petra Hartberger, Gertrud Huith, Gela Kempe, Hilde Meier und Anita Podolinsky für die unzähligen großen und kleinen Hilfestellungen und die stets gute Stimmung im Labor. Ihr wart für mich nicht nur in laborpraktischen und fachlichen Belangen eine wichtige Stütze. Vielen Dank!

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie für die stetige Hilfsbereitschaft und die durchwegs freundliche Arbeitsatmosphäre.

Von Herzen danke ich meinem Mann Jürgen Halter für die Schulter zum Anlehnen und die unbedingte Bereitschaft, diese Arbeit mitzutragen. Ihm war es sehr, sehr oft zu verdanken, dass unsere Söhne Jonas und Clemens warme Mahlzeiten erhielten.

Inhalt

Zusammenfassung.....	9
Summary.....	11
Abbildungsverzeichnis.....	13
Tabellenverzeichnis.....	15
Abkürzungsverzeichnis.....	17
1 EINLEITUNG.....	19
1.1 <i>L. monocytogenes</i> als Pathogen	19
1.1.1 Listeriose	19
1.1.2 Pathogenese.....	20
1.2 Taxonomie von Listerien.....	21
1.3 Isolierung und Subtypisierung von Listerien	24
1.3.1 Anreicherungsverfahren.....	24
1.3.2 Isolierung und Identifizierung von <i>Listeria</i> Spezies.....	27
1.3.3 Subtypisierung von Listerien	29
1.3.3.1 Phänotyp-basierte Typisierungsmethoden.....	29
1.3.3.2 PCR-basierte Typisierungsmethoden	30
1.3.3.3 Restriktionsbasierte Typisierungsmethoden	32
1.3.3.4 Sequenzbasierte Typisierungsverfahren.....	33
1.4 Vorkommen und Diversität von <i>Listeria</i> in natürlichen Habitaten	34
1.4.1 Vorkommen von Listerien in Böden und auf Pflanzen	35
1.4.2 Listerien in Wasser	38
1.4.3 Vorkommen und Diversität in landwirtschaftlichen Betrieben	39
1.4.4 Übertragungswege.....	41
1.5 Ziel der Arbeit.....	42
2 MATERIAL UND METHODEN.....	44
2.1 Medien	44
2.2 Methoden.....	46
2.2.1 Qualitativer Nachweis von Listerien	46
2.2.2 Bestimmung der Keimzahl von Listerien im MPN Verfahren	47

2.2.3	Identifizierung von Listerien auf Artebene	47
2.2.3.1	FTIR Spektroskopie.....	47
2.2.3.2	API- <i>Listeria</i>	48
2.2.3.3	Multiplex PCR.....	49
2.2.3.4	16S rDNA Sequenzierung	52
2.2.4	Subtypisierung von <i>Listeria</i> Isolaten.....	53
2.2.4.1	FTIR Clusteranalyse.....	53
2.2.4.2	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	53
2.2.4.3	(GTG) ₅ Typisierung.....	55
2.2.4.4	AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	55
2.2.5	Quantifizierung der Diversität von <i>Listeria</i> Populationen	58
2.2.5.1	Simpson Diversitätsindex D	58
2.2.5.2	Quotient aus Typenanzahl und Isolatanzahl Q	58
2.2.5.3	Abschätzung der gesamten Artenvielfalt.....	59
2.2.5.3.1	Akkumulation von Spezies und Kurvenextrapolation.....	59
2.2.5.3.2	Rang-Abundanz und Verteilungsfunktionen	60
2.2.5.3.3	Nicht-parametrische Abschätzung der Artenvielfalt.....	61
2.2.6	Methoden zur Beschreibung von neuen <i>Listeria</i> Spezies	63
2.2.6.1	Untersuchungen zu Morphologie und Phänotyp	63
2.2.6.2	Sequenzierung von weiteren Genloci.....	64
3	ERGEBNISSE.....	66
3.1	Vergleich von selektiven Anreicherungsmedien	66
3.1.1	Keimzahlen MPN / 10 g	66
3.1.2	Detektion von <i>Listeria</i> Spezies	67
3.1.3	Diversität von <i>Listeria</i> Isolaten aus unterschiedlichen Anreicherungsmedien	68
3.1.3.1	FTIR-Clusteranalyse.....	68
3.1.3.2	RAPD Typisierung.....	69
3.1.3.3	Vergleich der Typisierungsmethoden.....	70
3.1.3.4	Vergleich der Anreicherungsmedien	71
3.2	Prävalenz und Diversität von <i>Listeria</i> über einen jahreszeitlichen Verlauf	72
3.2.1	Vorkommen und MPN Keimzahlen	74
3.2.2	Speziesdifferenzierung von <i>Listeria</i> -Isolaten	76
3.2.3	Subtypisierung von <i>Listeria</i> Isolaten ausgewählter Probenahmen.....	78
3.3	Stratifikation von Sedimentproben.....	80
3.3.1	Keimzahlen MPN in unterschiedlichen Schichttiefen	81
3.3.2	Vorkommen von <i>Listeria</i> Spezies in unterschiedlichen Schichten	81
3.3.3	Subtypisierung von Isolaten aus unterschiedlichen Strata.....	82
3.3.4	Vergleich von Sedimentproben unterschiedlicher Probenahmen	83
3.4	Biodiversität von <i>Listeria</i>-Populationen.....	84
3.4.1	Biodiversität von <i>Listeria</i> auf <i>R. fluitans</i>	86
3.4.2	Biodiversität von <i>Listeria</i> in Sediment von einem Fließgewässer	88

3.4.3	Biodiversität von <i>Listeria</i> in Sediment von einem Standgewässer	90
3.4.4	Zusätzliche Typisierungsmethoden	91
3.4.4.1	AFLP	92
3.4.4.2	(GTG)5 Typisierung	93
3.4.5	Intragenerische Biodiversität von <i>Listeria</i>	94
3.4.5.1	Akkumulation von Subtypen	94
3.4.5.2	Abundanz von Subtypen	97
3.4.5.3	Abschätzung der gesamten RAPD-Typenvielfalt	99
3.4.6	Intraspezifische Biodiversität	102
3.4.6.1	Probenbezogene Diversität von <i>Listeria</i> Spezies	105
3.4.6.2	Biodiversität von <i>Listeria</i> Spezies auf <i>R. fluitans</i> und in Sediment	106
3.4.6.3	Gesamte Biodiversität von <i>Listeria</i> Spezies	108
3.4.6.4	Abschätzung der RAPD-Typenvielfalt auf Speziesebene	109
3.4.6.5	Abundanz von RAPD Typen	110
3.5	Beschreibung und Phylogenie von neuen <i>Listeria</i> Spezies	111
3.5.1	16S rDNA Sequenzierung	111
3.5.2	RAPD Typisierung von neuen <i>Listeria</i> Spezies	112
3.5.3	DNA-DNA Hybridisierung	113
3.5.4	Zell- und Koloniemorphologie	115
3.5.5	Zellaufbau	116
3.5.6	Physiologische Charakterisierung	117
3.5.7	Physiologische Variabilität von Isolaten neuartiger <i>Listeria</i> Spezies	119
3.5.8	Genetische Klassifizierung	120
4	DISKUSSION	123
4.1	Vergleich von selektiven Anreicherungsmedien	123
4.1.1	Keimzahlen	123
4.1.2	Detektion von <i>Listeria</i> Spezies	124
4.1.3	Typisierung	126
4.2	Prävalenz und Diversität von <i>Listeria</i> Spezies im jahreszeitlichen Verlauf	128
4.2.1	Inzidenz	128
4.2.2	Keimzahlen	129
4.2.3	Prävalenz von <i>Listeria</i> Spezies	130
4.2.4	Ursprung von <i>Listeria</i> Spezies auf <i>R. fluitans</i>	132
4.3	Vorkommen von Listerien im Sediment	134
4.3.1	Keimzahlen in unterschiedlichen Schichttiefen	134
4.3.2	Vorkommen von <i>Listeria</i> Spezies und -Subtypen	135
4.4	Biodiversität von Listerien in den untersuchten Habitaten	136

4.4.1	Probenanreicherung	136
4.4.2	(GTG)5 und AFLP Typisierung.....	137
4.4.3	Diversitätsindizes	139
4.4.4	Akkumulation von RAPD Typen.....	141
4.4.5	Diversität von <i>Listeria</i> im Vergleich zu anderen Populationen	142
4.4.6	Intraspezifische Diversität	143
4.4.7	Extrapolation der Biodiversität über Schätzmethoden	146
4.5	Beschreibung von neuen <i>Listeria</i> Spezies.....	149
4.5.1	16S rDNA Sequenzen.....	149
4.5.2	DNA-DNA Hybridisierung	150
5	LITERATUR	152
PUBLIKATIONEN UND POSTERPRÄSENTATIONEN.....		167
CURRICULUM VITAE.....		168

Zusammenfassung

Listeriose ist eine Erkrankung, die in der Regel über kontaminierte Lebensmittel übertragen wird und Letalitätsraten von bis zu 30 % aufweist. Der Erreger ist *Listeria monocytogenes*, ein gram-positives Stäbchenbakterium, das sowohl in der Umwelt als auch im lebensmittelverarbeitenden Produktionsumfeld vorkommt. Über Prävalenz und Biodiversität der Gattung *Listeria* in natürlichen Umwelthabitaten ist relativ wenig bekannt.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Sediment- und Wasserpflanzenproben wurden für den Nachweis und die Keimzahlbestimmung 3 unterschiedliche Anreicherungsmedien verglichen. Insgesamt war die Prävalenz von *Listeria* im Vergleich zu anderen Studien recht hoch. Die Keimzahlen lagen in der Regel bei < 100 MPN/g, wobei zwischen den 3 Selektivmedien kein wesentlicher Unterschied in Bezug auf die nachgewiesenen Keimzahlen oder die Akkumulation von Spezies und RAPD-Subtypen festgestellt werden konnte.

In 2 Fließgewässern und einem Standgewässer wurden monatlich Wasserpflanzen, Sediment und Wasser beprobt. Dabei wurden hauptsächlich die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri* sowie vereinzelt auch *L. ivanovii* isoliert. Insgesamt waren keine saisonalen Tendenzen in Bezug auf die Keimzahlen oder die Spezies-Zusammensetzung der *Listeria*-Populationen nachweisbar. Da bei den beiden Fließgewässern die getesteten Matrices stetig positiv auf *Listeria* getestet wurden, handelte es sich vermutlich um permanent besiedelte Habitate.

Listerien waren im Sediment bis zu einer Tiefe von 8 cm nachzuweisen, wobei die meisten Zellen aus den oberflächennahen Schichten isoliert werden konnten. Bemerkenswert war, dass die Diversität der *Listeria*-Populationen auf Speziesebene bei unterschiedlichen Beprobungen ähnlich war, während auf der Ebene der RAPD-Subtypen der Probenahmezeitpunkt und die unmittelbare Probenahmestelle einen großen Einfluss bezüglich der Detektion von Subtypen hatten.

Um die Biodiversität von *Listeria* Spezies auch quantitativ zu erfassen, wurden 20 g Sediment bzw. 40 g *R. fluitans* auf jeweils 0,1 g Portionen aufgeteilt und diese Probenfraktionen getrennt untersucht, so dass theoretisch weitgehend alle in einer Probe vorhandenen *Listeria*-Zellen einzeln angereichert wurden. Alle Isolate wurden

anhand von RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) typisiert. Die Biodiversität von *Listeria* war höher als vermutet, wobei die Simpson Diversitätsindizes von RAPD-Typen bei den Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri* auf *R. fluitans* und in Sediment sehr ähnlich waren. Insgesamt war im Vergleich zu *L. innocua* ($D = 0,971$) und *L. seeligeri* ($D = 0,971$) die Biodiversität von *L. monocytogenes* am niedrigsten ($D = 0,927$). Eine Auswahl von Isolaten wurde zusätzlich anhand von AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) bzw. (GTG)₅-PCR typisiert. Bei den unterschiedlichen Typisierungsmethoden wurden jeweils unterschiedliche Gruppierungen von Typen festgestellt. Bei Kombination von 2 Typisierungsmethoden konnten insgesamt mehr Subtypen abgegrenzt und somit eine noch höhere Biodiversität nachgewiesen werden. Beispielsweise konnten bei *L. innocua* von *R. fluitans* anhand RAPD ein Simpson-Diversitätsindex von $D = 0,964$ (21 Typen bei 31 Isolaten) und anhand AFLP Analyse ein Index von $D = 0,966$ (19 Typen bei 30 Isolaten) ermittelt werden. Bei Kombination der Typisierungsergebnisse resultierte ein Diversitätsindex von $D = 0,990$ (29 Typen bei 30 Isolaten).

Bislang sind 8 *Listeria* Spezies beschrieben. Es ist bemerkenswert, dass im Rahmen dieser Arbeit an allen 3 untersuchten Standorten neuartige Listerien nachgewiesen wurden, die mit großer Wahrscheinlichkeit unterschiedlichen Spezies angehören. Die Spezies *L. weihenstephanensis* wird im Rahmen dieser Arbeit in einem polyphasischen Untersuchungsansatz neu beschrieben. Die phylogenetisch nächst verwandte Art ist *L. rocourtiae*. Auf der Ebene von 16S rDNA beträgt die Homologie des Typstammes von *L. weihenstephanensis* zum Typstamm von *L. rocourtiae* rund 99 %. Anhand der Analyse von 4 Genloci mit höherer intraspezifischer Sequenzvariabilität ist jedoch die Verschiedenheit der Stämme eindeutig. Die untersuchten Genloci waren 2 housekeeping genes (*prs* und *recA*) sowie 2 Stressresistenzgene (*sigB* und *groEL*). Die gesamtgenomische Ähnlichkeit der beiden Typstämme basierend auf DNA-DNA Hybridisierungsanalysen liegt bei rund 22 %. Zwischen den Typstämmen von *L. rocourtiae* und *L. weihenstephanensis* sind bei der biochemischen Umsetzung von Substraten 7 Unterscheidungsmerkmale nachweisbar. Damit handelt es sich eindeutig um eine neue Spezies.

Summary

Listeria monocytogenes is a gram-positive, rod shaped pathogen responsible for severe food-borne infections. Listeriosis is accompanied by fatality rates of up to 30 %. Due to the importance of *L. monocytogenes* as a human foodborne pathogen most studies on the prevalence of *Listeria* in the environment have focused on food producing facilities and farm environments. In contrast, knowledge about prevalence and biodiversity of *Listeria* species in natural habitats is very limited.

In a first survey, sediment and water plant samples from a creek were examined for the presence of *Listeria*. Three different selective enrichment media were applied and compared. Isolates were identified and subtyped by RAPD analysis. MPN (Most Probable Number) cell counts were < 100 / g. No remarkable differences were observed regarding the cell counts attained. Moreover, no significant distinctions became apparent with respect to the accumulation of *Listeria* species or RAPD subtypes.

During a one year longitudinal period, sediment, water and water plant samples from two creeks and one pond were examined for the presence of *Listeria*. Sampling was conducted in monthly intervals. The predominant species observed were *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. seeligeri*. On two sampling sites, *L. ivanovii* was identified sporadically. Titers as well as species compositions did not vary significantly during the seasons. The retrieved data provide evidence that *Listeria* spp. in sediment and on water plants are regular inhabitants of these natural habitats.

By examining distinct layers of sediment, samples were tested *Listeria*-positive up to 8 cm in depth. The highest cell counts were found near the surface. At the species level, the composition of *Listeria* populations was quite similar in different stratified samples. In contrast, at the level of RAPD subtypes, the influence of the sampling date was as high as the point of sampling.

Biodiversity of *Listeria* species was quantified in 20 g of sediment and 40 g of *R. fluitans*, respectively. Sample matrices were partitioned á samples of 0,1 g and enriched separately. This enrichment procedure allowed for the nearly complete collection of all *Listeria* cells present in the samples. All isolates were subtyped by RAPD analysis (Randomly Amplified Polymorphic DNA). The overall biodiversity of *Listeria* was higher than expected. Simpson diversity indices (D) of *L.*

monocytogenes, *L. innocua* and *L. seeligeri* isolates of sediment and *R. fluitans* were very similar. Compared to the biodiversity of *L. innocua* ($D = 0,971$) and *L. seeligeri* ($D = 0,971$), biodiversity of *L. monocytogenes* was lowest ($D = 0,927$). A selection of isolates was additionally examined by AFLP or (GTG)₅ – PCR analysis. Applying different typing methods, different groupings of subtypes were observed. By the combination of two typing methods, more types were differentiated and biodiversity increased. For example, analysis of *L. innocua* isolates from *R. fluitans* obtained 21 RAPD ($D = 0,964$) and 19 AFLP subtypes ($D = 0,966$), respectively. Combining the groupings of the typing methods, a Simpson diversity index of $D = 0,990$ was calculated (29 subtypes).

To date the genus *Listeria* includes only 8 species. Surprisingly, in all habitats of the 3 tested sampling sites, novel *Listeria* were isolated, which probably do not belong to a single new species. In this work, the species *L. weihenstephanensis* sp. nov. is described applying a polyphasic approach. The phylogenetic next related species is *L. rocourtiae*. Alignment of 16S rDNA of the type strains of *L. rocourtiae* and *L. weihenstephanensis* yielded homology of ca. 99 %, but sequence analysis of 2 housekeeping genes (*prs* and *recA*) and 2 stress response genes (*sigB* and *groEL*) clearly delineated the strains. DNA-DNA hybridization analysis showed ca. 22 % analogy. Additionally, biochemical characterization of the 2 type strains revealed 7 distinguishing properties, confirming the classification of a new species.

Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel
1.1	Pathogenese von Listeriose
1.2	Phylogenetische Klassifizierung der Gattung <i>Listeria</i>
1.3	Genetische Abstammungslinien
1.4	Infektionsquellen und Übertragungswege von <i>L. monocytogenes</i>
2.1	Reaktionsmuster von <i>L. monocytogenes</i> beim API- <i>Listeria</i> Test
2.2	Konservierte und variable, speziesspezifische Bereiche beim <i>iap</i> -Gen von <i>Listeria</i>
2.3	Differenzierung von <i>Listeria</i> Spezies mit Hilfe von Multiplex PCR
2.4	Schematische Darstellung von AFLP Typisierung (Chial 2008).
2.5	Akkumulationskurve von Insekten-Spezies
2.6	a Darstellung der Rang-Abundanz. B Häufigkeitsverteilung bei logarithmischer Skalierung der Achsen
3.1	Vergleich von selektiven Anreicherungsmedien
3.2	Prozentuale Anteile von <i>Listeria</i> Arten, die mit Hilfe von unterschiedlichen Anreicherungsmedien aus Sediment und <i>R. fluitans</i> isoliert wurden
3.3	FTIR-Dendrogramm von <i>L. innocua</i> Isolaten
3.4	<i>L. monocytogenes</i> RAPD-Typen von <i>R. fluitans</i>
3.5	Gewässertemperaturen an 3 Probenahmestellen über einen jahreszeitlichen Verlauf
3.6	<i>Listeria</i> positiv getestete Proben (%) der Matrices Wasserpflanzen, Sediment und Wasser von 3 Standorten.
3.7	Durchschnittliche MPN Keimzahlen in den Habitaten Sediment, Wasserpflanzen und Wasser von 3 Probenahmeorten
3.8	Prozentuale Anteile von <i>Listeria</i> Spezies in den Habitaten Sediment und Wasserpflanzen an 3 Standorten über den Verlauf eines Jahres.
3.9	Durchschnittliche Anteile von <i>Listeria</i> Spezies in den Habitaten Wasserpflanzen und Sediment an 3 Standorten
3.10	RAPD Typen von <i>L. innocua</i> Isolaten, die zum selben Zeitpunkt am Standort Moosach aus Sediment und <i>R. fluitans</i> isoliert wurden.
3.11	RAPD Typen von zeitgleich aus Sediment und <i>R. fluitans</i> isolierten <i>L. monocytogenes</i> Isolaten
3.12	Durchschnittliche MPN Keimzahlen in 10 g Sediment in unterschiedlichen Sedimentschichten
3.13	Prozentuale Anteile von <i>Listeria</i> Spezies, die aus verschiedenen Schichttiefen isoliert wurden.
3.14	RAPD Bandenmuster von <i>L. seeligeri</i> Isolaten aus unterschiedlichen Schichttiefen von Sediment
3.15	Prozentuale Anteile (gerundet) von <i>Listeria</i> Spezies aus Sedimentproben, die an 2 Versuchstagen isoliert wurden.
3.16	Prozentuale Anteile von <i>Listeria</i> Spezies von 20 g <i>R. fluitans</i> (Fließgewässer)
3.17	Prozentuale Anteile von <i>Listeria</i> Spezies in 10 g Sediment (Fließgewässer).
3.18	Prozentuale Anteile von <i>Listeria</i> Spezies in 20 g Sediment (Standgewässer)

3.19	AFLP Bandenprofile von <i>L. monocytogenes</i>
3.20	Akkumulation von <i>Listeria</i> RAPD-Typen bei den 5 untersuchten Proben
3.21	Akkumulation von Typen bei den Isolaten der Proben, die anhand von zwei unterschiedlichen Methoden typisiert wurden.
3.22	Häufigkeiten von RAPD Typen in den Habitaten Sediment und <i>R. fluitans</i>
3.23	Häufigkeiten von RAPD Typen im Sediment vom Standgewässer
3.24	Häufigkeiten von <i>Listeria</i> -Subtypen in den Habitaten <i>R. fluitans</i> und Sediment (Fließgewässer) bei der Anwendung von zwei unterschiedlichen Typisierungsmethoden
3.25	Logarithmische Rang-Abundanzkurven von RAPD Typen bei den beiden <i>R. fluitans</i> – und den 3 Sedimentproben
3.26	RAPD Typen-Biodiversität von <i>Listeria</i> Spezies von den untersuchten Sediment- und <i>R. fluitans</i> – Proben bei unterschiedlichen Anreicherungsverfahren
3.27	Diversität von <i>Listeria</i> Spezies bei RAPD Typisierung in Sediment und auf <i>R. fluitans</i>
3.28	Abundanz von RAPD Typen der Spezies <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> und <i>L. seeligeri</i> bei MPN- bzw. bei 0,1 g Anreicherungen
3.29	16S rDNA Teilsequenzen (683 bp) von neuen <i>Listeria</i> Spezies und von <i>Listeria</i> Typstämmen
3.30	RAPD Profile von <i>Listeria</i> Spezies
3.31	Streuungsdiagramme zur Zellgrößenverteilung
3.32	Phylogenetische Position von den Isolaten WS 4560 und WS 4615 basierend auf 16S rDNA Gesamtsequenzen
3.33	Phylogenetische Position von den Isolaten WS 4560 und WS 4615 basierend auf konkatenierten Sequenzen

Tabellenverzeichnis

Tab.	Titel
1.1	Biochemische Differenzierung von <i>Listeria</i> Spezies
2.1	Primer für Multiplex PCR und Spezifische PCR
2.2	Ausgewählte Gen-Loci mit Primersequenzen für die Sequenzierung von housekeeping genes und Stressresistenzgenen
3.1	Anzahl der untersuchten Isolate aus den unterschiedlichen Anreicherungsmedien
3.2	Gegenüberstellung der anhand von FTIR- und RAPD-Typisierung ermittelten Simpson Diversitätsindizes
3.3	Anzahl von untersuchten und <i>Listeria</i> positiv getesteten Sediment-, Wasserpflanzen- und Wasserproben aus 3 Standorten.
3.4	Keimzahlen MPN / g von <i>Listeria</i> in den Habitaten Sediment, Wasserpflanzen und Wasser
3.5	Anzahl von analysierten Isolaten aus Sediment und Wasserpflanzen
3.6	Auswahl von Probenpaarungen, deren Isolate anhand von RAPD subtypisiert wurden
3.7	<i>Listeria</i> Keimzahlen MPN / 10 g Sediment in unterschiedlicher Schichttiefe
3.8	RAPD Typisierung von Sedimentisolaten von 2 unterschiedlichen Versuchstagen
3.9	Anzahl von positiv getesteten Ansätzen bei den Anreicherungsmedien ½ Fraser- und UVM II-Medium sowie Anzahl von identifizierten <i>Listeria</i> Isolaten bei <i>R. fluitans</i> Proben
3.10	Abundanz von <i>Listeria</i> RAPD Typen bei 2 Proben von <i>R. fluitans</i>
3.11	Anzahl von positiv getesteten Ansätzen bei den Anreicherungsmedien ½ Fraser- und UVM II-Medium sowie Anzahl von identifizierten <i>Listeria</i> Spezies bei Sedimentproben aus einem Fließgewässer
3.12	Abundanz von <i>Listeria</i> RAPD Typen bei 2 Sedimentproben aus einem Fließgewässer
3.13	Anzahl von positiv getesteten Ansätzen (½ Fraser- und UVM II – Medium) sowie identifizierte <i>Listeria</i> Spezies bei Sediment aus einem Standgewässer
3.14	Abundanz von <i>Listeria</i> RAPD-Typen bei Sediment von einem Standgewässer (Juni 2010).
3.15	Häufigkeiten von RAPD- bzw. AFLP Typen von <i>R. fluitans</i> (April 2010)
3.16	Anhand RAPD- und AFLP-Typisierung ermittelte Simpson Diversitätsindizes
3.17	Abundanz von <i>Listeria</i> Subtypen aus Sediment (RAPD-Typen bzw. (GTG)5-Typen)
3.18	Diversitätsindizes nach Simpson von <i>Listeria</i> Isolaten aus Sediment von einem Fließgewässer
3.19	Vergleich der intragenerischen Diversität
3.20	Abschätzung der gesamten Typenvielfalt in den untersuchten Habitaten
3.21	Abschätzung der Typenvielfalt anhand parametrischer sowie nicht-parametrischer Berechnungsmethoden bei 50 untersuchten Isolaten je Probe
3.22	Simpson Diversitätsindizes und Verhältniszahlen aus der Anzahl von RAPD-Typen / Isolatanzahl von <i>Listeria</i> Spezies bei den untersuchten Habitaten sowie bei den Standorten Moosach und Wolnzach (beides Fließgewässer)
3.23	Biodiversität von <i>Listeria</i> Spezies in den Habitaten <i>R. fluitans</i> und Sediment

3.24	Spezies-Biodiversität von <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> und <i>L. seeligeri</i>
3.25	Schätzung der gesamten Typenvielfalt nach Chao ACE
3.26	Gesamtgenomische Ähnlichkeiten ermittelt durch DNA-DNA Hybridisierung
3.27	% Anteile der zellulären Fettsäuren
3.28	Unterscheidungsmerkmale zwischen WS 4560 bzw. WS 4615 und <i>L. rocourtiae</i>
3.29	Biochemische Reaktionen bei den Isolaten WS 4560, WS 4615, WS 4548, WS 4557 und WS 4563, die im API 50CHB/E Test bei anaerober Bebrütung variabel getestet wurden
4.1	Bisher bekannte Serotypen bei <i>Listeria</i>
4.2	RAPD- und FTIR-Diversitätsindizes nach Simpson
4.3	Vorkommen von <i>Listeria</i> Spezies in natürlichen Umwelthabitaten
4.4	Studien zum Vergleich der Sensitivität von (GTG) ₅ und AFLP Typisierung
4.5	Simpson Diversitätsindizes von <i>L. monocytogenes</i> Isolaten bei unterschiedlichen Typisierungsmethoden.
4.6	Verhältnis von detektierten Typen zur Anzahl von untersuchten Isolaten
4.7	Diversitätsanalysen bei den Gattungen <i>Legionella</i> und <i>Salmonella</i> aus natürlichen Umwelthabitaten
4.8	Intraspezifische Diversität von <i>E. coli</i> aus natürlichen Umwelthabitaten
4.9	Homologien (%) von 16S rDNA Gesamtsequenzen (1400 bp) von WS 4560 und WS 4615 zu den Spezies <i>L. rocourtiae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. grayi</i> und <i>B. thermosphacta</i>
4.10	Ergebnisse von DNA-DNA Hybridisierungen bei <i>Listeria</i> Spezies

Abkürzungen

ACE	Abundance-based Coverage Estimator
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
Abb.	Abbildung
BHI	Brain Heart Infusion
bp	base pairs (Basenpaare)
cfu	colony forming units
D	Simpson Diversitätsindex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ELIX	entionisiertes Reinwasser
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
Fe	Eisen
FT-IR	Fourier-transform Infrarot
g	Gramm
<i>groeL</i>	Chaperonin (Hitzeschockprotein)
(GTG) ₅	Primersequenz GTGGTGGTGGTGGTG
h	Stunde
HCA	Hierarchische Clusteranalyse
kb	Kilobase(n)
kNN	Künstliches Neuronales Netz
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
M	molar
mg	Milligramm
MilliQ	mittels Millipore-Anlage gereinigtes Wasser
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MPN	Most Probable Number
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
<i>prs</i>	Phosphoribosyl Pyrophosphat Synthetase (housekeeping gene)
Q	Verhältnis aus der Anzahl von Typen / Anzahl von Isolaten
<i>R. fluitans</i>	<i>Ranunculus fluitans</i>
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic Desoxyribonucleinacid
rDNA	ribosomale Desoxyribonucleinsäure
<i>recA</i>	Rekombinase A (housekeeping gene)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Sediment
<i>sigB</i>	Stress response alternative Sigma Faktor B (Stressresistenzgen)
sp.	species
sp. nov.	species nova
Tab.	Tabelle
µm	Mikrometer
üNK	Übernachtkultur
V	Volt
WP	Wasserpflanzen
WS	Weihenstephaner Sammlung
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
16S	kleine Untereinheit am Ribosom

1 Einleitung

1.1 *L. monocytogenes* als Pathogen

1.1.1 Listeriose

Die humane Listeriose ist eine bakterielle Infektionserkrankung, die in der Regel über den Verzehr von mit *L. monocytogenes* kontaminierten Lebensmitteln übertragen wird. Dabei sind nicht alle Menschen gleichermaßen gefährdet, an Listeriose zu erkranken. Die besonders exponierten Zielgruppen sind Neugeborene und Kleinkinder, Senioren, schwangere Frauen sowie Personen mit einer Schwächung der T-Zellen vermittelten Immunantwort (Schuchat, Swaminathan et al. 1991). Aufgrund der verringerten Immunabwehr bei Krebspatienten sowie der Anwendung von Immunsuppressiva bei Personen mit Organtransplantationen sowie der fortschreitenden Ausbreitung des AIDS-Erregers ist der Anteil der Risikogruppe in der Bevölkerung tendenziell steigend. Dadurch, dass sich Listerien auch bei Kühllagerungstemperaturen vermehren können und insgesamt der Verzehr von „ready to eat food“ zunimmt, ist ein zusätzliches Erkrankungsrisiko gegeben. Lebensmittel, die am häufigsten im Zusammenhang mit Listerioseausbrüchen stehen, sind Milch und Milchprodukte (Ho, Lappi et al. 2007), Fisch und Fischerzeugnisse (Monfort, Minet et al. 1998; Fonnesbech Vogel, Huss et al. 2001; Miettinen and Wirtanen 2006), Fleisch und Fleischerzeugnisse sowie rohes Obst und Gemüse (Meng and Doyle 2002; Nightingale, Schukken et al. 2004; Nightingale, Fortes et al. 2005). Den Krankheitserregern kommt in zweifacher Hinsicht eine wichtige Bedeutung zu. Zum einen ist aus medizinischer Sicht die Therapie und Epidemiologie von Listeriose nach wie vor problematisch. Zum anderen stellt *L. monocytogenes* ein substanzielles Problem in der Lebensmittelindustrie dar. Durch die Tolerierung hoher Salzkonzentrationen, durch Wachstum bei ausgesprochen ausgedehnten Temperaturbereichen und durch die Fähigkeit zur Adaptation an Stressbedingungen wie beispielsweise pH-Absenkung (Gandhi and Chikindas 2007), unterscheiden sich Listerien von anderen lebensmittelbedingten Krankheitserregern deutlich. Diese Eigenschaften ermöglichen es dieser Keimgruppe, auch unter ungünstigen Milieubedingungen über lange Zeiträume zu persistieren oder sich sogar zu vermehren.

1.1.2 Pathogenese

Dadurch, dass Listerien und *L. monocytogenes* häufig im ländlichen und urbanen Umfeld nachgewiesen werden, ist die stete Exposition des Menschen nicht ungewöhnlich. Trotzdem treten invasive Listerieninfektionen verhältnismäßig selten auf, wobei die unterschiedliche Virulenz bei *L. monocytogenes*, die Suszeptibilität des Wirtsorganismus und die Zahl der aufgenommenen Keime die ausschlaggebenden Rollen spielen (Schuchat, Swaminathan et al. 1991; Schlech III 2000; Vazquez-Boland, Kuhn et al. 2001).

Die Pathogenese von Listeriose ist weitgehend aufgeklärt und erfolgt über mehrere Schritte (Abb. 1.1). Die Transmission dieses opportunistischen Krankheitserregers über die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln setzt zunächst die Penetration der intestinalen Mucosa mit Internalisierung der Bakterien in die Wirtszellen voraus. Dies geschieht über erregerinduzierte Endocytose der Keime mit nachfolgender Überwindung der natürlichen Schutzbarrieren und Abwehrmechanismen (Farber and Peterkin 1991). Über die Sekretion von listeriellem Hämolysin wird anschließend die das Phagosom umgebende Membran lysiert und die Vermehrung des Erregers im Cytoplasma ermöglicht.

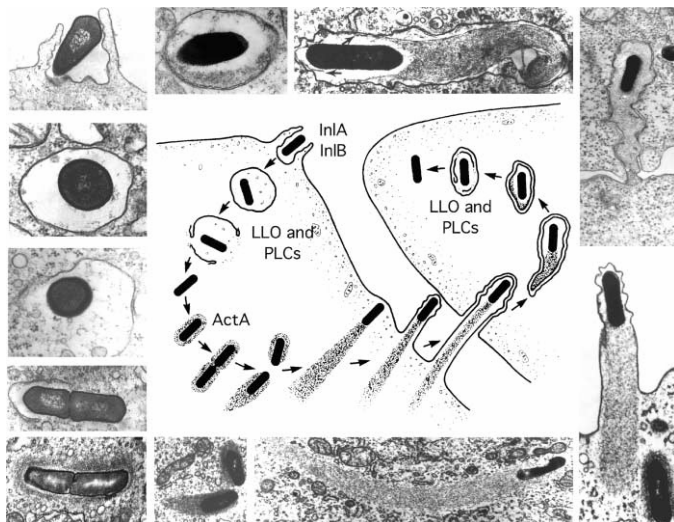


Abb. 1.1 Pathogenese von Listeriose (übernommen von Portnoy et al., (Portnoy, Auerbuch et al. 2002))

Etwa 2 h nach der Zellinfektion wird vom Invasor die Polymerisierung von Aktinfilamenten sowie deren polare Anordnung induziert (Tilney and Portnoy 1989). Mit Hilfe dieser Aktinfilamente wird den *Listeria*-Keimen die intrazelluläre Mobilität und schließlich über erneute induzierte Phagozytose in benachbarte Zellen die interzelluläre Ausbreitung ermöglicht. Die 6 wichtigsten beteiligten Virulenzgene (2

phosphatidyl-spezifische Phospholipasen *plcA* und *plcB*, Listeriolysin *hlyA*, eine zink-abhängige Metalloprotease *mpl*, das Protein zur Aktinpolymerisierung *actA* sowie die Internaline *inIA* und *inIB*) sind im Genom von *L. monocytogenes* in einer Pathogenitätsinsel (Virulenzgencluster) organisiert und werden vom Transkriptionsfaktor *prfA* reguliert (Roberts and Wiedmann 2003).

Die klinischen Symptome einer Listerioseerkrankung können sich verschiedenartig manifestieren. Während eine Listerioseinfektion mehr oder weniger inapparent oder in Begleitung influenzaähnlicher sowie gastrointestinaler Symptome verlaufen kann, sind auch generalisierte Entzündungserkrankungen möglich. Nichtinvasive Krankheitsverläufe mit einer Inkubationsdauer von 18 - 20 h sind von Gastroenteritis, Fieber, Durchfall und Erbrechen begleitet. Eine invasive Listerioseerkrankung mit einer Inkubationszeit von mehreren Wochen kann den Befall des zentralen Nervensystems, Endokarditis, Encephalitis, Meningitis oder Sepsis zur Folge haben (Roberts and Wiedmann 2003), wobei die Krankheiten mit Mortalitätsraten von bis zu 30 % einhergehen (Mead, Slutsker et al. 1999; Vazquez-Boland, Kuhn et al. 2001; Liu 2006). Dadurch, dass Listerien nicht nur die Blut-Hirn-Schranke sondern auch Placentagewebe überwinden können, ist bei schwangeren Frauen oft eine Fehlgeburt die Folge.

Nicht alle *L. monocytogenes* Stämme besitzen das selbe Pathogenitätspotential. Auf molekulargenetischer Ebene wird die Spezies in 3 Abstammungslinien unterteilt, wobei Isolate, die der Abstammungslinie I angehören, signifikant häufiger im Zusammenhang mit Listeriosen in Erscheinung treten. Innerhalb dieser Spezies gibt es daher möglicherweise weitere distinkte Fraktionen. Es ist bislang nicht bekannt, ob bei *L. monocytogenes* spezifische Marker auf molekularer oder zellulärer Ebene vorkommen, die die Differenzierung von Isolaten ermöglichen, die entweder gastrointestinale Erkrankungen verursachen oder invasive Verlaufsformen von Listeriose hervorrufen (Roberts and Wiedmann 2003).

1.2 Taxonomie von Listerien

Das Genus *Listeria* umfasst die Spezies *L. monocytogenes* (Skerman, McGowan et al. 1980), *L. innocua* (Seeliger 1981), *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, (Rocourt and Grimont 1983) *L. ivanovii* (Boerlin, Rocourt et al. 1992), *L. grayi* (Rocourt, Boerlin et al. 1992), *L. marthii* (Graves, Hessel et al. 2009) und *L. rocourtiae*

(Leclercq, Clermont et al. 2010) und wird zusammen mit *Lactobacillus*, *Erysipelothrix* und *Brochothrix* zu der Familie der Firmicutes, den nichtsporulierenden, grampositiven Stäbchenbakterien, klassifiziert (Brenner, Krieg et al. 2005). Die aktuell gültige, auf 16S rDNA Sequenzierungen und DNA-DNA Ähnlichkeit basierende taxonomische Position des Genus belegt die nächst verwandte Orientierung zum Genus *Brochothrix*. Weitläufiger verwandt sind die Gattungen *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* und *Streptococcus* (Yarza, Richter et al. 2008)(Abb. 1.2).

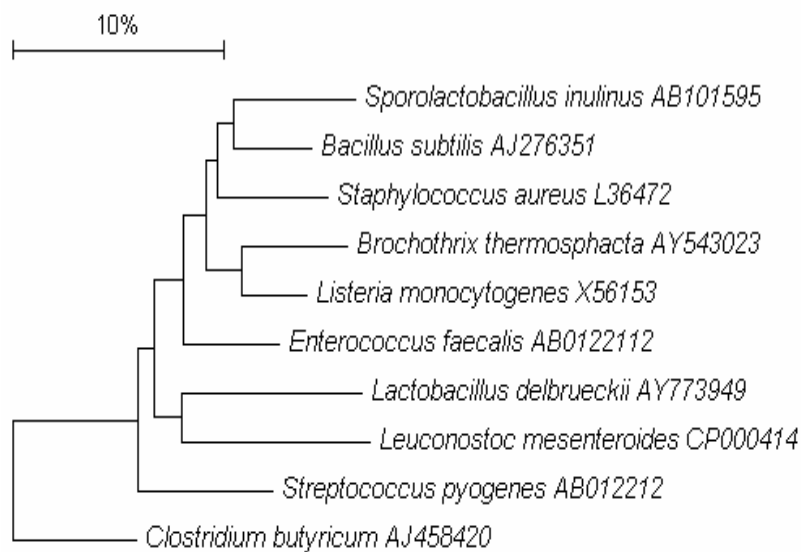


Abb. 1.2 Phylogenetische Klassifizierung der Gattung *Listeria* auf der Basis von 16S rDNA Sequenzen (1400 bp) von Typspezies. Die Grafik wurde mit Hilfe der Software Treecon (Van de Peer and De Wachter 1997) unter Anwendung des Algorithmus Neighbour Joining (Saitou and Nei 1987) erstellt. Der Balken indiziert 10 % Sequenzunterschiede.

Sowohl die intra- als auch die interspezifische Taxonomie dieser Gattung war über lange Zeit unklar. So wurde in der Literatur sehr lange über das monospezifische Genus *Listeria* mit *L. monocytogenes* als einzige Spezies berichtet (*L. monocytogenes* sensu lato). Erst im Zuge der Entwicklung von sensitiveren Techniken zur Isolatdifferenzierung als die der Serotypisierung wurden die weiteren Spezies abgegrenzt (Farber and Peterkin 1991).

Listerien sind grampositive, nicht sporenbildende, aerobe bzw. fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die in einem Temperaturbereich von -0,4 – 50 °C und einem pH Bereich von 4,5 – 9 wachsen können (Junttila, Niemela et al. 1988; Parish and Higgins 1989). Die Keime sind sehr salztolerant und können sich in 10 %igen

Salzlösungen vermehren. Die Zellen reagieren beim Katalase-Test positiv und beim Oxidase-Test negativ. Bei Wachstumstemperaturen von 20 – 30 °C sind die etwa 0,5 µm breiten und bis zu 2 µm langen Mikroorganismen peritrich begeißelt, weshalb im Mikroskop oft taumelnde Bewegungen beobachtet werden können (Brenner, Krieg et al. 2005). Bei höheren Wachstumstemperaturen ist die Flagellinproduktion bei *L. monocytogenes* dagegen deutlich reduziert (Peel, Donachie et al. 1988). Ein weiteres, typisches Merkmal ist die eisblaue Erscheinung von auf Nähragar kultivierten *Listeria*-Kolonien bei Begutachtung über einer Lichtquelle mit einem Strahlungseinfallswinkel von 45 ° (Henry Schräglicht) (Henry 1933).

Die Zellwände von Listerien weisen für grampositive Bakterien charakteristische Peptidoglycanstrukturen auf. Einen bedeutenden Anteil bilden dabei spezielle Lipoteichonsäuren, die über lange Zeit die entscheidende Grundlage zur Serotypisierung von Listerien bildeten (Donker-Voet 1972).

Ein wesentliches Charakteristikum ist die bei den Arten ungleich vorhandene Befähigung zur β -Hämolyse. Während *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* und *L. ivanovii* mit entsprechenden Pathogenitätsfaktoren ausgestattet sind, sind die übrigen Arten apathogen. Als Erreger der sogenannten Listerioseerkrankung kommt *L. monocytogenes* die größte Bedeutung zu. *L. ivanovii* gilt im Allgemeinen als tierpathogen, während *L. seeligeri* trotz entsprechender genetischer Ausstattung aus klinischer Sicht keine Rolle spielt.

Anhand der Charakterisierung einer Vielzahl von Isolaten mit Hilfe von unterschiedlichen Typisierungsmethoden ist die konsistente Gruppierung von *L. monocytogenes* in drei verschiedene, genetisch distinkte Abstammungslinien beschrieben (Piffaretti, Kressebuch et al. 1989; Wiedmann, Bruce et al. 1997; Ward, Gorski et al. 2004). Dabei umfasst Abstammungslinie I die Serotypen 1/2b, 3b, 3c und 4b, wobei es sich bei dieser Gruppe hauptsächlich um Isolate mit klinischer Historie handelt (Abb. 1.3). Abstammungslinie Linie II schließt die Typen 1/2a, 1/2c und 3a ein. Das Vorkommen dieser Typen ist hauptsächlich lebensmittel-assoziiert. Auch Isolate, die im Zusammenhang mit Listerioseausbrüchen bei Tieren standen, gehören dieser Gruppierung an. Der Abstammungslinie III gehören die Serotypen 4a, 4c und einige 4b-Isolate an (Wiedmann, Bruce et al. 1997). Isolate, die der Abstammungslinie I angehören, zeichnen sich zudem im Vergleich zu Isolaten der Abstammungslinie II durch ein signifikant erhöhtes Pathogenitätspotential aus. Isolate der Gruppierung III repräsentieren hauptsächlich nicht virulente Typen, die

eine Reihe verschiedener Anreicherungsverfahren und –medien zur Verfügung. Ein wichtiges Kriterium dabei ist die Selektivität des jeweiligen Nachweises, da das Wachstum der Zielkeime durch Suppression der Begleitflora gefördert werden soll. Dies wird über den Zusatz von verschiedenen selektiven Agenzien angemessener Konzentrationen erreicht. Die prominentesten Selektiva sind Acriflavin und Nalidixinsäure. Für den Keimnachweis spielt jedoch nicht nur die Zusammensetzung und Selektivität eines Nährmediums eine wichtige Rolle, sondern auch Anzahl und Konstitution der Zielkeime in einer Probe (Churchill, Lee et al. 2006).

Die meisten Methoden sind speziell auf den Nachweis von *L. monocytogenes* aus Lebensmittelproben ausgerichtet. Am häufigsten finden nachfolgende Methoden Anwendung:

- USDA – FSIS (US Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service) für den Nachweis von *L. monocytogenes* aus Fleisch und Geflügel,
- FDA (Federal Drug Administration) für den Nachweis von *L. monocytogenes* aus Milchprodukten, Obst, Gemüse und Fisch
- ISO-11290-1 (International Organization for Standardization) für den horizontalen Nachweis von *L. monocytogenes*

Diese Methoden sehen jeweils eine Bebrütungstemperatur von 30 – 37 °C vor. Die Unterschiede bei diesen Verfahren sind im Wesentlichen in Art und Konzentration der selektiven Supplemente begründet. Dadurch, dass sich Listerien auch bei Kühlschranktemperaturen mit einer Generationszeit von etwa 1,5 d vermehren, war über lange Zeit auch die Kälteanreicherung eine probate, für die Routineanalytik aber wenig praktikable Anreicherungsverfahren (Gray and Killinger 1966).

Die oben genannten Methoden gelten als spezies–spezifisch aber auch als unterschiedlich sensitiv (Lammerding and Doyle 1989). So ist beschrieben, dass durch die gleichzeitige Anwendung von mehreren Anreicherungsverfahren der Anteil von falsch negativen Resultaten deutlich vermindert werden kann (Churchill, Lee et al. 2006).

Der kulturelle Nachweis von Listerien hängt auch von Art und Umfang der kompetitiven Begleitflora in einer Probe ab. So wurden beispielsweise für den Listeriennachweis aus Klärschlamm und Fäzes spezielle Protokolle entwickelt (Doyle and Schoeni 1986; Erdogan, Cripps et al. 2002; Garrec, Sutra et al. 2003).

Nachweismethoden, die einen selektiven Anreicherungsschritt vorsehen, sind generell mit einer gewissen Problematik behaftet. In der Regel bieten Matrices wie

prozessierte Lebensmittel, die unter einem *Listeria*-feindlichen Herstellungsprozess erzeugt worden waren, keine optimalen Bedingungen für die Zielkeime. Beispielsweise werden sublethal geschädigte Zellen aufgrund des vorherrschenden Selektionsdruckes mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit nicht detektiert. Zudem ist bekannt, dass verschiedene Anreicherungsmedien für den Keimnachweis aus unterschiedlichen Probenmatrices unterschiedlich gut geeignet sind (Doyle and Schoeni 1986; Lammerding and Doyle 1989; Hayes, Graves et al. 1992; Curtis and Lee 1995). Auch Art und Beschaffenheit des untersuchten Probenotyps hat bei der Detektion von *Listeria* einen gewissen Einfluss. Es ist zudem beschrieben, dass manche *L. monocytogenes* Stämme den verschiedenen Anreicherungsprozeduren unterschiedlich sensitiv gegenüberstehen (Ryser, Arimi et al. 1996). Auch können im Zuge eines Anreicherungsverfahrens zwischen unterschiedlichen Spezies von *Listeria* kompetitive Hemmwirkungen auftreten (Bruhn, Vogel et al. 2005; Gorski, Flaherty et al. 2006). Es konnte z. B. gezeigt werden, dass die Vermehrung von *L. monocytogenes* durch Acriflavin stärker negativ beeinflusst wird als das Wachstum von *L. innocua* (Beumer and Hazeleger 2003). Zudem nehmen kulturelle Nachweismethoden mehrere Tage in Anspruch. Für den Nachweis von *L. monocytogenes* sind deshalb kulturunabhängige Verfahren auf molekularbiologischer Basis entwickelt worden. Bei einem PCR-basierten Nachweis wird die DNA einer Probe extrahiert und über den Einsatz von spezies-spezifischen Primern bestimmte Zielgene detektiert. Bei Amplifikation der Probe mit Hilfe eines Real time PCR-Gerätes kann in Echtzeit die Akkumulation von Ziel-DNA verfolgt werden. Für den Nachweis von Listerien anhand PCR wurden verschiedene Targets wie *Listeria*-Lysin *hlyA* (Ryser, Arimi et al. 1996), Invasion associated protein *iap* (Hein, Klein et al. 2001), Internalin B *inlB* (Jung, Frank et al. 2003) und 16S rRNA (Call, Borucki et al. 2003) ausgewählt. Nachteilig bei dieser Methodik ist unter anderem, dass die Zusammensetzung der Probenmatrix störend auf die PCR Reaktion einwirken kann. Beispielsweise können fett- oder stark proteinhaltige Proben Magnesium binden und dadurch die Aktivität der Taq Polymerase, die für den Ablauf einer PCR Reaktion erforderlich ist, inhibieren. Außerdem sind PCR-Nachweise angesichts der geringen Konzentration von Ziel-DNA unter Umständen zu wenig sensitiv, so dass unter Umständen doch eine Aufkonzentrierung der Zielkeime durch Anreicherung notwendig sein kann. Letzten Endes belegt ein positives Signal lediglich, dass Ziel-DNA in der Probe vorhanden ist. Ob es sich dabei um abgetötete oder um lebende

und damit infektiöse Keime handelt, bleibt ungeklärt. Aus rechtlicher Sicht aber ist die Anzahl der vorhandenen, wachstumsfähigen Keime für die Verkehrsfähigkeit eines Lebensmittels entscheidend. Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 müssen verzehrfertige Lebensmittel, die die Vermehrung von *L. monocytogenes* fördern können oder für Säuglinge bzw. für besondere medizinische Zwecke bestimmt sind, in 25 g frei von dieser Keimart sein. Bei Lebensmitteln wie z. B. in der Endverpackung wärmebehandelte Erzeugnisse, nicht zerkleinertes Obst und Gemüse, Brot, Zucker und Süßwaren oder bei Erzeugnissen mit einem pH Wert $\leq 4,4$ oder einem a_w Wert von $\leq 0,92$, die die Vermehrung von *L. monocytogenes* nicht begünstigen, gilt ein Grenzwert von 100 KbE/g.

1.3.2 Isolierung und Identifizierung von *Listeria* Spezies

Die Isolation der Zielkeime erfolgt durch Ausstrich auf selektive Festmedien. Am häufigsten finden dabei die Medien MMA (Modifizierter McBride Agar) (Lovett 1988), LPM Agar (Lithiumchlorid Phenylethanol Moxalactam Agar) (Lee and McClain 1986), PALCAM Agar (van Netten, Perales et al. 1989) und Oxford Agar (Curtis, Mitchell et al. 1989) Anwendung (Farber and Peterkin 1991). Alle *Listeria* Spezies zeichnen sich auf diesen Medien nach 48stündiger Bebrütung durch eine einheitliche, sehr charakteristische Koloniemorphologie aus, so dass eine weitere Differenzierung der Keime erforderlich ist. Neuere *Listeria*-Chromogenmedien (z. B. LAOA *Listeria* Agar nach Agosti und Ottaviani, Biorad) ermöglichen die Differenzierung von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* von anderen Spezies durch den Nachweis der phosphatidyl-inositol-spezifischen Phospholipase C, dessen Gen *plcA* nur bei diesen beiden Spezies vorkommt. Kolonien mit Phospholipase C-Aktivität wachsen auf LAOA Medium mit hell-türkisfarbener Einfärbung auf gelblich-transparentem Grund unter Ausbildung eines deutlich opaken Präzipitathofes. Phospholipase-C negative Isolate zeigen auf dem Medium kein Präzipitat (Coffey, Rombouts et al. 1996).

Die Differenzierung von Isolaten kann biochemisch anhand der Säurebildung aus unterschiedlichen Substraten erfolgen. Jeder *Listeria* Spezies ist dabei ein bestimmtes Stoffwechsellmuster eigen, so dass anhand einiger weniger Reaktionen die Speziesdifferenzierung in der Regel möglich ist. Ein gebräuchliches und zuverlässiges kommerzielles Testsystem ist API *Listeria* (bioMérieux) (Bille, Catimel

et al. 1992), das u. a. die Testung der in Tab. 1.1 aufgelisteten Stoffwechselaktivitäten vorsieht (Tab. 1.1).

Substrat / Reaktion	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. marthii</i>	<i>L. rocourtaiae</i>
Hämolyisin	+	-	+	+	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	+/-	-	-	+/-	+/-	-	+
D-Mannitol	-	-	-	-	-	+	-	+
D-Xylose	-	-	+	+	+	-	-	+
α -Methyl-Mannosid	+	+	-	-	+	+	+	+
Arylamidase	-	+	+	+	+	+	-	+

Tab. 1.1 Biochemische Differenzierung von *Listeria* Spezies. Die aufgelisteten Substrate sind Komponenten vom API *Listeria* Test (bioMérieux).

Die Differenzierung von *Listeria* auf Speziesebene ist zudem über FTIR-Spektroskopie möglich. Dabei werden Absorptionseigenschaften von Zellen fraglicher Isolaten analysiert und die Informationen in Form eines Absorptionsspektrums gespeichert. Zur Identifizierung werden diese Spektren mit den Spektren einer Referenzdatenbank verglichen (Rebuffo, Schmitt et al. 2006; Rebuffo-Scheer, Dietrich et al. 2008).

Weiters können *Listeria* Spezies über molekularbiologische Verfahren differenziert werden. Eine zuverlässige Untersuchungsmethode ist die auf dem *iap*-Gen (invasion associated protein) basierende Methode nach Bubert et al. (Bubert, Hein et al. 1999), wobei Genfragmente speziesspezifischer Größen generiert werden. Die Speziesidentifizierung anhand der Analyse von 16S DNA Sequenzen ist bei *Listeria* aufgrund sehr hoher Homologien nicht immer eindeutig möglich (Sallen, Rajoharison et al. 1996), jedoch ist beispielsweise ein Verfahren beschrieben, das *Listeria* Spezies über die Restriktion von 23S rRNA Fragmenten identifiziert (Paillard, Dubois et al. 2003).

Schließlich ist die Speziesidentifizierung auch über Microarray basierte Verfahren möglich. Volokhov et al. differenzierten die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* und *L. grayi* anhand der Virulenzgene

iap, *hly*, *inlB*, *plcA*, *plcB* und *clpE* über ein kombiniertes Verfahren aus Multiplex PCR und Oligonukleotid Microarray (Volokhov, Rasooly et al. 2002).

1.3.3 Subtypisierung von Listerien

Die Subtypisierung von pathogenen Isolaten ist speziell im Hinblick auf epidemiologische Fragestellungen von entscheidender Bedeutung. Bei entsprechender Charakterisierung können auf diese Weise der Ursprung oder die Ausbreitungswege einer Epidemie verfolgt werden. Wichtige Voraussetzungen bei der Subtypisierung von Stämmen sind die Typisierbarkeit, die Reproduzierbarkeit und die Fähigkeit eines Verfahrens, unterschiedliche Typen zu diskriminieren. Bezüglich der Typisierbarkeit ist es essentiell, dass alle fraglichen Isolate den Marker enthalten, anhand dessen die Typisierung vorgenommen werden soll. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Reproduzierbarkeit der Untersuchung, d. h. die Wiederholbarkeit der Resultate muss gewährleistet sein. Dies setzt sowohl eine gewisse Stabilität der untersuchten Marker als auch die Robustheit der Methode voraus. Schließlich ist das Vermögen zur Diskrimination von unterschiedlichen Typen bei jeder Typisierungsmethode ein wichtiges Kriterium. Speziell in epidemiologischer Hinsicht muss die Typisierungsmethodik sensitiv genug sein, um beispielsweise Isolate abzugrenzen, die nicht unmittelbar an einem Ausbruch beteiligt sind. Ein wichtiges Maß zur Quantifizierung der diskriminativen Fähigkeit ist der numerische Simpson Diversitätsindex (Hunter and Gaston 1988). Mit Hilfe dieses Indexes ist auch der Vergleich von unterschiedlichen Typisierungsmethoden hinsichtlich der jeweiligen Sensitivität möglich.

1.3.3.1 Phänotyp-basierte Typisierungsmethoden

Die Subtypisierung von Listerien ist über phänotypische oder genotypische Merkmale möglich, wozu jeweils eine Reihe von unterschiedlichen Methoden etabliert ist. Ein häufig zitiertes, phänotypisches Klassifizierungsmerkmal bei Listerien ist der jeweilige Serotyp (Seeliger and Hohne 1979). Nachteilig dabei ist, dass nicht alle Listerien anhand der verfügbaren Seren typisierbar sind. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit aufgrund variierender Qualität der Seren häufig

unzureichend und Typisierungsergebnisse zwischen unterschiedlichen Laboratorien oft zwiespältig (Schonberg, Bannerman et al. 1996). Am meisten hinderlich allerdings ist, dass bei *L. monocytogenes* lediglich 13 Serotypen unterschieden werden, wobei der überwiegende Anteil der klinischen Isolate den Serotypen 1/2b, 3b, 3c und 4b angehört. Die Diversitätsindizes sind bei dieser Methode entsprechend niedrig. Speziell unter epidemiologischen Gesichtspunkten gilt diese Typisierungsmethode als unzureichend sensitiv.

Ein weiteres, phänotyp-basiertes Verfahren ist die Phagentypisierung. Dabei können Listerien aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber eines Sets ausgewählter Listeriaphagen gruppiert werden (Audurier, Chatelain et al. 1979; Loessner and Busse 1990). Allerdings treten auch bei dieser Methode ähnliche Nachteile bezüglich Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Sensitivität auf wie bei der Serotypisierung.

Anhand MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) können verschiedene Isolate über die elektrophoretische Mobilität metabolischer Enzyme differenziert werden. Dabei werden wasserlösliche Enzyme vom Zellmaterial extrahiert und über Elektrophorese aufgetrennt. Da die zugrunde liegenden Gensequenzen die elektrostatische Ladung der exprimierten Enzyme bedingen, können Variationen in den Genen über die Mobilität dieser Proteine sichtbar gemacht werden. Dabei werden unterschiedliche, Isolat-spezifische Protein-Muster generiert. Insgesamt liefert diese Methode gute Ergebnisse bezüglich Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Diskriminierung von Subtypen, trotzdem wird auch diese Methode für epidemiologische Fragestellungen als zu wenig sensitiv eingestuft (Caugant, Ashton et al. 1996).

1.3.3.2 PCR-basierte Typisierungsmethoden

Für die Differenzierung von Listerien auf DNA Ebene stehen eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Verfügung. Im Prinzip spiegeln dabei die detektierten Polymorphismen den Verlust von Primerbindungsstellen durch Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen von genetischen Elementen wider. Ein vielfach eingesetztes Verfahren ist die RAPD Typisierung (Random amplified polymorphic DNA), die erstmals von Williams et al. beschrieben wurde (Williams, Kubelik et al. 1990). Bei dieser Methode werden meist sehr kurze, unspezifische Primer arbiträrer Sequenz eingesetzt, die an multiplen Stellen im Genom unter schwach stringenten

Bedingungen binden (Olive and Bean 1999). Erfolgt die Primerbindung in entsprechender Orientierung und innerhalb eines amplifizierbaren Abstandes zueinander, wird ein PCR Produkt generiert, dessen Größe der Distanz zwischen den beiden Primern entspricht (Mazurier and Wernars 1992; Lawrence, Harvey et al. 1993; Yoshida, Takeuchi et al. 1999). Anzahl und Lokation der Primerbindungsstellen können zwischen Stämmen einer Spezies variieren, sodass nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR Produkte über die Bandenmuster Differenzen auf Gesamtgenomebene sichtbar gemacht werden können. Die Sensitivität der Methode wird bei strikter Standardisierung als sehr gut eingestuft (Boerlin, Bannerman et al. 1995; Kerouanton, Brisabois et al. 1998).

Eine weitere, häufig eingesetzte Typisierungsmethode ist die AFLP Methode (Amplified Fragment Length Polymorphisms). Diese Restriktionsanalyse gilt als hochauflösend (Mueller and Wolfenbarger 1999) und wurde bereits vielfach für die Typisierung von *Listeria* eingesetzt (Vos, Hogers et al. 1995; Guerra, Bernardo et al. 2002). Anhand dieser Methode war die Erzielung eines Diskriminierungslevels möglich, das mit dem von PFGE Analysen vergleichbar war (Fonnesbech Vogel, Fussing et al. 2004). Im Prinzip wird dabei gereinigte DNA mit Hilfe von zwei Restriktionsenzymen geschnitten und über Ligation spezifische Adaptoren an die Schnittstellen platziert. Schließlich wird mit Primern, deren Sequenzen komplementär zu den Adaptoren sind, spezifisch ein Subset der generierten Fragmente amplifiziert. Die Unterscheidung von Isolaten schließlich erfolgt über den Vergleich der generierten Bandenmuster. Zudem, dass die Reproduzierbarkeit als sehr gut angesehen wird, wird diese Methodik sensitiver als Ribotyping eingestuft (Koeleman, Stoof et al. 1998).

REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic PCR) Typisierung wurde bereits mehrfach bei epidemiologischen Studien bei *Listeria* eingesetzt. Dabei werden sich wiederholende, nicht kodierende Gensequenzen adressiert, die sowohl bei grampositiven als auch bei gramnegativen Keimen über das gesamte Genom verteilt vorkommen (Jersek, Gilot et al. 1999). Ein weiteres von Jersek et al. etabliertes System ist ERIC PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) und wurde ebenfalls für die Typisierung von Listerien eingesetzt (Martinez, Rørvik et al. 2003). Anhand dieser Methoden konnten Diskriminierungsindizes erzielt werden, die mit den Ergebnissen von PFGE Typisierungen vergleichbar waren. Weitere, auf repetitiven Elementen basierende Typisierungssysteme sind MLVA (Multiple-Locus Variable-

number tandem repeats) und (GTG)₅ PCR (Versalovic, Koeuth et al. 1991; Versalovic, Schneider et al. 1994). Repetitive Elemente können phylogenetische Informationen enthalten, da speziell an diesen Stellen im Genom gehäuft evolutionäre Ereignisse wie Mutationen, Insertionen, Deletionen oder Rekombinationen stattfinden, wodurch Länge und Anzahl dieser Sequenzen verändert wird. Daher wird diesem Subtypisierungsverfahren zudem ein Informationsgehalt bezüglich der genetischen Relation von unterschiedlichen Isolaten zugesprochen (Miya, Kimura et al. 2008).

1.3.3.3 Restriktionsbasierte Typisierungsmethoden

Ribotyping ist eine bei Listerien sehr häufig eingesetzte Typisierungsmethode (Bruce, Hubner et al. 1995; Hubner, Cole et al. 1995; Swaminathan, Hunter et al. 1996). Dabei wird chromosomale DNA anhand eines Restriktionsenzymes verdaut und DNA Fragmente sehr kleiner Größe hergestellt. Anschließend werden diejenigen Fragmente über Southern Blotting analysiert, die einen Teil der ribosomalen RNA-Gene tragen. Dazu stehen automatisierte Verfahren zur Verfügung (automated ribotyping) (Allerberger and Fritschel 1999; Sauders, Fortes et al. 2003). Sowohl Reproduzierbarkeit als auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gelten als sehr gut, so dass anhand der generierten Bandenprofile auch eine netzbasierte Datenbank für *L. monocytogenes* etabliert wurde. Allerdings ist die Sensitivität im Vergleich zu anderen Methoden limitiert (Lukinmaa, Aarnisalo et al. 2004). Speziell bei der Typisierung von *L. monocytogenes* Isolaten der Serogruppe 4b gilt diese Methode als unzureichend diskriminativ (Sauders, Fortes et al. 2003; van Belkum, Tassios et al. 2007).

Speziell *L. monocytogenes* Isolate wurden bereits mehrfach über DNA Microarrays differenziert (Borucki, Krug et al. 2003; Call, Borucki et al. 2003; Borucki, Kim et al. 2004). Diese Verfahren haben den Vorteil, dass spezifische oder einzigartige Gene identifiziert werden können. Dabei wird gesamtgenomische Template DNA extrahiert, mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten und anhand dieser Fragmente Genbibliotheken erstellt. Ziel-DNA wird markiert und mit den Proben der Genbibliotheken hybridisiert. Alles in allem sind die Verfahren zur Erstellung der Genbibliotheken und die Auswertung von positiven Signalen sehr

komplex. Die erzielten Ergebnisse bezüglich der Sensitivität waren ähnlich (Borucki, Krug et al. 2003) oder sogar besser als bei PFGE Analytik (Borucki, Kim et al. 2004).

Die PFGE (Pulse field gel electrophoresis) Methode ist eine Fortentwicklung der RFLP Methode (Restriction Fragment Length Polymorphism) und gilt derzeit gemeinhin als der Goldstandard bei den Typisierungsverfahren. Dabei werden Polymorphismen innerhalb und zwischen Restriktionsschnittstellen detektiert. Da bei konventionellen Elektrophoresebedingungen große DNA Fragmente (über 30 kb) nicht akkurat aufgetrennt werden können, wird bei PFGE das elektrische Feld periodisch umorientiert. Dadurch wird auch die Auftrennung großer Genfragmente gewährleistet. Diese Methode liefert sehr gute Ergebnisse bezüglich Reproduzierbarkeit und Sensitivität (Lukinmaa, Aarnisalo et al. 2004). Auch für diese Methode wurde für *L. monocytogenes* eine Internetdatenbank erstellt (Graves and Swaminathan 2001; Swaminathan, Barrett et al. 2001), so dass der elektronische Austausch von Bandenmustern zwischen Laboratorien, die das Verfahren jeweils standardmäßig anwenden, stattfinden kann (Halpin, Garrett et al.; Martin, Jacquet et al. 2006). Nachteilig ist, dass dieses Verfahren im Vergleich zu anderen Methoden sehr arbeits-, zeit- und kostenintensiv ist.

1.3.3.4 Sequenzbasierte Typisierungsverfahren

Schließlich kann die Typisierung von *Listeria* Isolaten anhand der Gensequenzen ausgewählter Loci durchgeführt werden (Multi Locus Sequence Typing MLST). Der große Vorteil dieser Methoden besteht darin, dass reproduzierbar eindeutige, elektronisch portable und hoch informative Ergebnisse bezüglich der genetischen Verwandtschaft von Isolaten erzielt werden. Die Herausforderung dabei besteht darin, aus der Fülle von verfügbaren Gensequenzen Bereiche bzw. Loci auszuwählen, die entsprechend diskriminative Informationen beinhalten. Bei der Typisierung anhand MLST werden 6 – 14 Genloci ausgewählt, die gleichmäßig über das Genom verteilt lokalisiert sind und die für den Zellerhalt essentiell sind (housekeeping genes) (Salcedo, Arreaza et al. 2003; Meinersmann, Phillips et al. 2004). Bei jedem dieser Gene wird anhand eines Primerpaares eine Teilsequenz amplifiziert und von dem Fragment die Sequenz bestimmt. Die Typisierung schließlich erfolgt über den Vergleich der aneinander gehängten Sequenzfragmente (concatenated sequences). Auch für MLST Daten von *L. monocytogenes* wurde eine

netzgestützte Datenbank etabliert (Chan, Maiden et al. 2001). Housekeeping genes evolvieren langsam, weshalb diese Methodik sehr gut geeignet ist, Populationsstrukturen von Gesamtspezies aufzudecken. Für epidemiologische Fragestellungen jedoch gilt MLST als unzureichend diskriminativ. Daher beziehen weiterentwickelte Verfahren auch Virulenzfaktoren ein, die schneller als Housekeeping Genes evolvieren und deshalb ein höheres diskriminatives Potential beherbergen (Zhang, Jayarao et al. 2004; Chen, Zhang et al. 2005; Chen, Zhang et al. 2007). Anhand MVLST (Multi Virulence Sequence Typing) konnten Diskriminierungsindizes nach Simpson von bis zu 0,99 erreicht werden. Somit war dieses Verfahren diskriminativer als die PFGE Methodik. Im Gegensatz zu anderen Typisierungsmethoden, bei denen in der Regel die Kombination verschiedener Verfahren für das Erreichen einer adäquaten Sensitivität empfohlen wird, gilt MVLST als ein Verfahren, das ohne zusätzliche Analysen die höchst mögliche Diskriminierung von Isolaten ermöglicht (Chen, Zhang et al. 2007).

1.4 Vorkommen und Diversität von *Listeria* in natürlichen Habitaten

Listerien wurden aus einer Vielzahl unterschiedlicher Probenmatrices isoliert, weshalb sie in der natürlichen Umwelt als „ubiquitär verbreitet“ gelten (Ryser and Marth 2007). Die untersuchten Matrices waren dabei Bodenproben (Weis and Seeliger 1975), Wasser (Watkins and Sleath 1981; Colburn, Kaysner et al. 1990; Lyautey, Lapen et al. 2007), Pflanzenproben (Welshimer and Donker-Voet 1971), Klärschlamm (Colburn, Kaysner et al. 1990), Silagen bzw. Tierfutter und Proben vom landwirtschaftlichen Produktionsumfeld (Fenlon 1985; Skovgaard and Morgen 1988; Beumer, te Giffel et al. 1996; Wiedmann, Bruce et al. 1996; Ryser, Arimi et al. 1997) sowie Proben vom lebensmittelverarbeitenden Produktionsumfeld (Jacquet, Rocourt et al. 1993; Lawrence and Gilmour 1994; Rorvik, Caugant et al. 1995).

Im Vergleich zu anderen, nicht sporenbildenden Lebensmittelpathogenen hebt sich *L. monocytogenes* vor allem dadurch hervor, dass diese Keimart selbst unter sehr ungünstigen Umweltbedingungen über lange Zeiträume lebensfähig bleibt. Verschiedene regulatorische Mechanismen dazu sind bereits beschrieben (Gandhi and Chikindas 2007). Dadurch, dass sich *L. monocytogenes* im Umfeld von lebensmittelverarbeitenden Produktionsstätten etablieren und sehr lange persistieren kann, sind diese Fähigkeiten unter natürlichen Umweltbedingungen vermutlich

ähnlich ausgeprägt. Im Gegensatz zu *L. monocytogenes* ist bezüglich der Stressresistenz der weiteren *Listeria* Spezies wenig bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass die übrigen Spezies ähnlich robust gegenüber ungünstigen Temperatureinflüssen oder hohen Salz- bzw. Säurekonzentrationen sind, da auch diese Arten aus Lebensmitteln und Lebensmittelumfeldproben isoliert wurden (MacGowan, Bowker et al. 1994; Wilson 1995; Pinto and Reali 1996; Monfort, Minet et al. 1998; Chambel, Sol et al. 2007). Zudem ergaben Vergleichsstudien der Genomsequenzen von *L. monocytogenes* und *L. innocua*, dass ein großer Teil der Gene, die für Stressregulationssysteme codieren, bei beiden Spezies vorkommen (Glaser, Frangeul et al. 2001; Buchrieser, Rusniok et al. 2003).

1.4.1 Vorkommen von Listerien in Böden und auf Pflanzen

Bei verschiedenen Studien wurden Listerien in Bodenproben nachgewiesen (Welshimer and Donker-Voet 1971; Weis and Seeliger 1975; MacGowan, Bowker et al. 1994; Moshtaghi, Garg et al. 2003), wobei allerdings bei älteren Studien die Ergebnisse bezüglich der Speziesidentifizierung nicht immer zweifelsfrei sind. So wurde oftmals von der Spezies *L. monocytogenes sensu lato* berichtet, die jüngeren Erkenntnissen zufolge möglicherweise noch weitere Spezies umfasst haben könnte (Ryser and Marth 2007).

Weis et al. untersuchten Proben unterschiedlich beeinflusster Provenienzen, wobei die höchste Inzidenz bei Bodenproben festgestellt wurde, die von Feldern oder Wiesen stammten, die über Jahre weder bearbeitet worden waren noch als Weideflächen gedient hatten (Weis and Seeliger 1975). Zudem konnten bei dieser Studie aus einer Bodentiefe von 10 cm deutlich weniger Listerien isoliert werden als aus Proben von geringeren Schichttiefen. Auch Welshimer et al. detektierten Listerien bei 6 von 7 untersuchten Probenahmeorten, die nicht im Zusammenhang mit Viehhaltung standen (Welshimer and Donker-Voet 1971). Bei dieser Untersuchung war die Inzidenz bei Proben, die vom landwirtschaftlichen Umfeld stammten, jedoch ebenso hoch. Anhand Serotypisierung wurde außerdem festgestellt, dass Isolate, die aus Boden- bzw. Pflanzenproben desselben Probenahmeortes stammten, bezüglich ihrer Antigenstruktur divers waren.

Bei der Untersuchung von 130 Bodenproben von Weide- bzw. Ackerflächen wurden in rund 18 % der Proben Listerien nachgewiesen, wobei kein Unterschied

zwischen den unterschiedlich genutzten Böden festzustellen war (Moshtaghi, Garg et al. 2003). Während bei dieser Studie bei beiden Bodentypen die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. welshimeri* nachgewiesen wurden, konnte bei den als Weideflächen genutzten Bodenproben auch *L. ivanovii* detektiert werden.

MacGowan et al. untersuchten über den Zeitraum eines Jahres bei einer monatlichen Probenahme insgesamt 136 Bodenproben aus Hausgärten (MacGowan, Bowker et al. 1994). Dabei waren in rund 15 % der Proben Listerien nachweisbar, wobei neben *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. welshimeri* die Spezies *L. ivanovii* und *L. seeligeri* am häufigsten vorkamen. Bei dieser Studie waren zudem keine jahreszeitlich bedingten Einflüsse bezüglich der Detektion von bestimmten *Listeria* Spezies feststellbar.

Verschiedene Studien untersuchten die Überlebensfähigkeit von Listerien in unterschiedlichen Böden (Welshimer 1960; Botzler, Cowan et al. 1974). Dabei konnte gezeigt werden, dass das Überleben dieser Keime von Faktoren wie Bodentyp und Feuchtigkeitsgehalt abhing. Insgesamt scheinen Bodenmatrices mit einem gewissen Feuchtegrad und speziell in Anwesenheit von verrottendem Pflanzenmaterial Umgebungen darzustellen, in denen Listerien gut überleben und sich gegebenenfalls auch vermehren können. Trotzdem wird dieses Habitat nicht prinzipiell als ein natürliches Reservoir für *Listeria* angesehen (Ryser and Marth 2007).

Allgemein wird angenommen, dass die Kontamination von pflanzlichen Rohstoffen für die Herstellung von Lebensmitteln und Tierfutter in erster Linie entweder direkt durch die Ausbringung von Stallung als Düngemittel oder indirekt über den Kontakt mit kontaminierten Böden erfolgt. Ein Listerioseausbruch konnte beispielsweise auf den Verzehr von Weißkohlsalat zurückgeführt werden, der von einem Feld abgeerntet worden war, das mit Stallung von Schafen gedüngt worden war (Schlech, Lavigne et al. 1983). Bei älteren Studien wurden Listerien aus verschiedenen Pflanzenmatrices isoliert, wobei rund 58 %, 75 % bzw. 24 % der untersuchten Proben positiv getestet wurden (Welshimer 1968; Welshimer and Donker-Voet 1971; Weis and Seeliger 1975). Fenlon et al. isolierten *L. innocua*, *L. seeligeri* und *L. monocytogenes* aus Grasproben (Fenlon, Wilson et al. 1996).

Auch standen mehrfach wild lebende Tiere bezüglich der Verbreitung von Listerien im Blickfeld, jedoch wird diesem Reservoir insgesamt eine eher untergeordnete Bedeutung beigemessen (Weis 1974; Botzler, Cowan et al. 1975;

Weis and Seeliger 1975; Quessy and Messier 1992; Bouttefroy, Lemaitre et al. 1997). Fäkale Ausscheidungen von Möwen und Krähen könnten bei der Kontamination von Pflanzenmaterial, das für die Herstellung von Silagen verwendet wird, eine gewisse Rolle spielen. Dieser Kontaminationsgrad wird bei Durchführung einer sachgemäßen Silierprozedur, die in der Regel die Vermehrung der Kontaminanten wirksam verhindert, als epidemiologisch nicht relevant eingestuft (Fenlon 1985).

Im Bereich der Tierfuttermittelerzeugung stellen im speziellen Silagen schlechter Qualität ein erhöhtes Risiko dar, da Listerien während eines unzureichenden Silierprozesses Milieubedingungen vorfinden, bei denen hohe Keimzahlen erreicht werden können (Donald, Fenlon et al. 1995; Nightingale, Schukken et al. 2004). Der Zusammenhang zwischen Silagefütterung und durch „*Listerella*“ bedingte Enzephalitis bei Wiederkäuern wurde schon sehr früh erkannt (Gray 1960) und konnte durch eine Vielzahl weiterer Studien belegt werden (Gronstol 1979; Fensterbank, Audurier et al. 1984; Fenlon 1986; Gitter, Stebbings et al. 1986; Wiedmann, Czajka et al. 1994). Die saisonal bedingte höhere Prävalenz von *L. monocytogenes* im Fäzes von Wiederkäuern wurde mit der vermehrten Verfütterung von Silage in den Wintermonaten in Zusammenhang gebracht (Nightingale, Fortes et al. 2005). Bei Identifizierung von Isolaten aus Silagen konnten die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. welshimeri* identifiziert werden (Ryser, Arimi et al. 1997). Anhand Ribotyping konnten dabei bei den *L. innocua* Isolaten 5 Typen ($D = 0,591$) und bei den 5 *L. monocytogenes* Isolaten ebenfalls 5 Typen ($D = 1$) unterschieden werden, wobei einer der detektierten *L. monocytogenes* Typen bereits in Zusammenhang mit einem Listerioseausbruch stand.

Über die Diversität von *Listeria* Spezies in natürlichen Umwelthabitaten ist wenig bekannt. Sauders et al. untersuchten 907 Proben natürlicher Habitate (Boden, Pflanzen und Wasserproben) und konnten nur in ca. 1,5 % der Proben *L. monocytogenes* nachweisen. Bei den 13 untersuchten Isolaten konnten anhand Ribotyping 7 Typen mit einem Simpson Diversitätsindex von $D = 0,872$ ermittelt werden, während die Typisierung mit Hilfe von MLST einen Diversitätsindex von $D = 0,987$ ergab (Sauders, Durak et al. 2006).

1.4.2 Listerien in Wasser

Die Tatsache, dass Listerien in der Umwelt ubiquitär verbreitet sind, bedingt das insgesamt recht häufige Vorkommen von Listerien in Oberflächengewässern (Dijkstra 1982; Colburn, Kaysner et al. 1990; Arvanitidou, Papa et al. 1997; Lyautey, Lapen et al. 2007). Bei einer in Großbritannien durchgeführten Studie wurden aus verschiedenen Süßgewässern die Spezies *L. seeligeri*, *L. innocua* und *L. welshimeri* isoliert (Frances, Hornby et al. 1991), wobei *L. seeligeri* die am häufigsten detektierte Spezies war. Bei einer weiteren Studie konnte in Oberflächengewässerproben hauptsächlich *L. monocytogenes* aber auch *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* und *L. grayi* nachgewiesen werden (Bernagozzi, Bianucci et al. 1994).

Auch aus marinen Habitaten konnten Listerien isoliert werden. Beispielsweise wurden 81 % von untersuchten Salzwasserproben positiv auf Listerien getestet und dabei die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. welshimeri* differenziert (Colburn, Kaysner et al. 1990). Rodas-Suárez et al. konnten in 30,5 % der untersuchten Meerwasserproben Listerien nachweisen (Rodas-Suarez, Flores-Pedroche et al. 2006). Bei dieser Studie wurden die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* identifiziert. Bei einer weiteren Untersuchung wurden insgesamt 21 % von untersuchten Meerwasserproben positiv getestet, wobei hauptsächlich *L. monocytogenes* und *L. innocua* detektiert wurden (El-Shenawy and El-Shenawy 2006).

Bei einer 2007 publizierten Studie wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten 314 Wasserproben untersucht. Dabei wurden in 10 % der untersuchten Proben *L. monocytogenes* nachgewiesen, wobei ein statistisch signifikanter Einfluss zwischen dem saisonalen Vorkommen von *L. monocytogenes* und dem Ausbringen von Stalldung auf angrenzende Oberflächen festzustellen war. Bei dieser Untersuchung wurden 75 *L. monocytogenes* Isolate anhand Ribotyping und PFGE typisiert, wobei Simpson Diversitätsindizes von $D = 0,791$ (13 Ribotypen) bzw. $D = 0,885$ (21 Pulsotypen) kalkuliert werden konnten (Lyautey, Lapen et al. 2007).

Trotz des frequenten Vorkommens sind bislang keine Listerioseinfektionen bekannt, die auf den Verzehr von kontaminiertem Wasser zurückgeführt werden können. Es wird allgemein angenommen, dass in Gewässern im Normalfall die Zelldichte nicht die erforderliche Infektionsdosis erreicht. Detektierte Keimzahlen

betragen bei *L. monocytogenes* zwischen 3 - > 180 cfu/l (Watkins and Sleath 1981) oder zwischen 10 – 350 cfu/l (Fenlon, Wilson et al. 1996).

Eine besondere Bedeutung kommt der Verwendung von Abwasser und Klärschlamm zur Felderbewässerung bzw. -düngung zu, da bei diesen Matrices gehäuft Listerien nachgewiesen wurden (Watkins and Sleath 1981; Geuenich and Muller 1984; Paillard, Dubois et al. 2005). Bei einer dieser Studie wurden bei unbehandelten Klärabfällen *Listeria* Keimzahlen in einem Bereich von 10^3 - 10^5 cfu/ml detektiert (Geuenich and Muller 1984). Obwohl bislang anhand der Typisierung von *L. monocytogenes* Isolaten aus Abwässern und Klärabfällen keine eindeutige Verbindung zu humanen Listeriosen hergestellt werden konnte (Lozniewski, Humbert et al. 2001), kann deren Applikation auf Nutzflächen durchaus als Vektor für die Verbreitung von Listerien fungieren.

1.4.3 Vorkommen und Diversität in landwirtschaftlichen Betrieben

Erstmals wurde Listeriose bei Tieren 1926 beschrieben (Murray, Webb et al. 1926). Seither gelten Nutztierhaltung sowie das Umfeld landwirtschaftlicher Betriebe gemeinhin als Brennpunkte in Bezug auf das Vorkommen und die Verbreitung von *L. monocytogenes* (Nightingale, Fortes et al. 2005; Ho, Ivanek et al. 2007; Esteban, Oporto et al. 2009). Dabei stellen weniger mit Listeriose infizierte Tiere oder das unmittelbare agrartechnische Betriebsumfeld als vielmehr Erzeugnisse tierischen Ursprungs ein Infektionsrisiko dar.

Nightingale et al. untersuchten in einer breit angelegten Studie insgesamt 2.056 Proben (Fäzes, Bodenproben, Futtermittel und Wasserproben) von 52 Bauernhöfen (Nightingale, Schukken et al. 2004). Bei 24 der beprobten Höfe waren bereits Listeriosefälle aufgetreten, während die übrigen 28 Höfe unauffällig waren. Zwar war die Prävalenz von *L. monocytogenes* bei den Höfen mit Listeriosefällen mit rund 27 % positiv getesteten Proben signifikant höher als bei den Kontrollhöfen (etwa 14 % der Proben positiv), jedoch unterschieden sich die Hofstellen nicht in Bezug auf die Diversität der jeweiligen *L. monocytogenes* Populationen. Eine Auswahl von insgesamt 414 der detektierten Isolate wurde anhand von Ribotyping näher charakterisiert, wobei 51 Typen unterschieden werden konnten. Die ermittelten Simpson Diversitätsindizes lagen sowohl für die Höfe mit Listeriosefällen als auch für die Kontrollhöfe bei $D = 0,82$.

Eine weitere Studie hatte die Untersuchung der Biodiversität von *L. monocytogenes* Isolaten aus dem landwirtschaftlichen Produktionsumfeld von Schafhöfen im Focus (Gudmundsdottir, Aalbaek et al. 2004). Dazu wurden insgesamt 104 Isolate mit Hilfe von Ribotyping und PFGE typisiert, die aus Fäzes, Futtermitteln und aus dem landwirtschaftlichen Betriebsumfeld von 10 Farmen stammten. Bei 3 der untersuchten Farmen waren bereits Listeriosefälle aufgetreten. Über die Typisierung anhand von PFGE Analysen konnten 23 und anhand von Ribotyping 13 Profile diskriminiert werden, wobei manche Typen bei mehreren Farmen detektiert werden konnten. Bei Kombination der beiden Typisierungsmethoden wurden insgesamt 24 Genotypen unterschieden, was einem Simpson Diversitätsindex von $D = 0,845$ entsprach.

Ebenfalls anhand PFGE Analytik wurde die Diversität von *L. monocytogenes* Isolaten untersucht, die an zwei Probenahmezeitpunkten mit einem zeitlichen Abstand von 11 Monaten von einem Milchviehbetrieb isoliert worden waren (Borucki, Gay et al. 2005). Zum Zeitpunkt der ersten Probenahme waren 2 Listeriosefälle aufgetreten. An den beiden Untersuchungszeitpunkten wurden jeweils Proben unterschiedlicher Matrices untersucht (Silage, Futtermittel, Fäzes, Wasser, Einstreu). Bei den beiden Probenahmen wurden 247 bzw. 291 *L. monocytogenes* Isolate isoliert und typisiert. Insgesamt konnten 58 Pulsotypen differenziert werden, wobei die Diversität nach Simpson der Populationen zum Probenahmezeitpunkt 1 mit $D = 0,874$ niedriger war als zum Probenahmezeitpunkt 2 ($D = 0,912$).

Aus dem Betriebsumfeld lebensmittelverarbeitender Unternehmen stammende Listerien wurden mehrfach typisiert, wobei u. a. die Verarbeitung von Geflügelfleisch, von Fleisch und Fleischprodukten oder von Räucherfisch im Focus standen (Lawrence and Gilmour 1995; Nesbakken, Kapperud et al. 1996; Norton, McCamey et al. 2001). Bei Langzeitstudien wurde vom Vorkommen sowohl persistenter als auch transienter Typen im Umfeld von lebensmittelverarbeitenden Betrieben berichtet (Senczek, Stephan et al. 2000; Holah, Taylor et al. 2002). Obwohl sehr differente Listerienflore im lebensmittelverarbeitenden Produktionsumfeld vorkommen können, ist weitgehend ungeklärt, wie die Stämme in diese Habitate gelangen. Es ist jedoch beschrieben, dass klonale Gruppen von *Listeria*, die im Umfeld von landwirtschaftlichen Betrieben vorkamen, auch im Umfeld milchverarbeitender Unternehmen detektierbar waren (Arimi, Ryser et al. 1997).

1.4.4 Übertragungswege

Anhand der Typisierung von Isolaten konnte gezeigt werden, dass klinische Subtypen auch aus Matrices von natürlichen Habitaten nachgewiesen werden konnten, was darauf hindeutete, dass diese Typen in natürlichen Umgebungen ihren Ursprung haben könnten (Borucki, Kim et al. 2004; Sauders, Schukken et al. 2006). Andererseits ist eine vice versa Kontaminationsrichtung ebenfalls möglich. Durch die Prävalenz eines bestimmten Subtypen sowohl im landwirtschaftlichen Betriebsumfeld als auch im natürlichen ländlichen Umfeld ist auch der „Austrag“ von den Stallungen beispielsweise über Weidegang der Tiere vorstellbar (Sauders, Schukken et al. 2006).

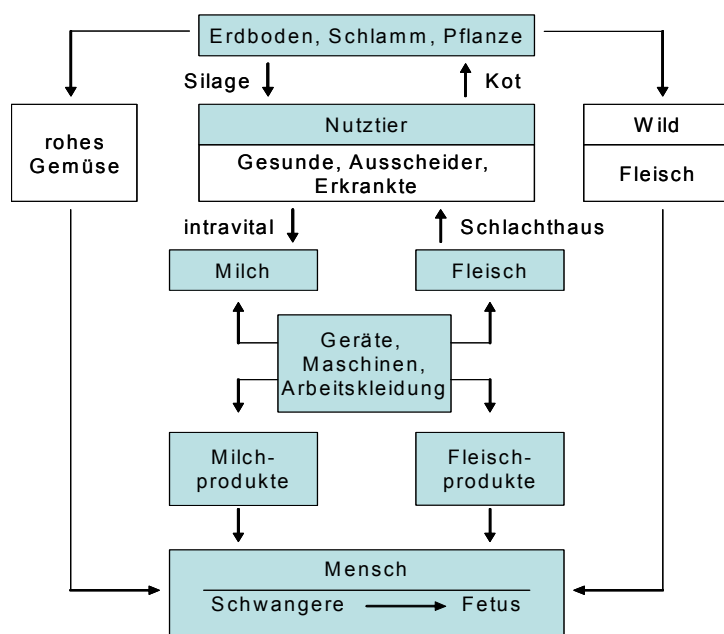


Abb. 1.4 Infektionsquellen und Übertragungswege von *L. monocytogenes* (Krämer 2007)

Über die Verfütterung von kontaminierten Silagen werden Listerien gewissermaßen einem Kreislauf zugeführt, wenn sie rektal ausgeschieden und zusammen mit sonstigen Stallabfällen als Düngemittel wieder auf die Felder ausgebracht werden (Husu 1990). Während insgesamt die Übertragungswege von Listerien aus dem natürlichen Umfeld über kontaminierte Futtermittel in die Nahrungskette weitgehend erkannt bzw. aufgeklärt sind (Abb. 1.4), sind die Kontaminationsrouten zwischen unterschiedlichen Ökosystemen und unterschiedlichen Bereichen innerhalb von lebensmittelverarbeitenden Betrieben weitgehend unbekannt.

Anhand verschiedener Typisierungstechniken konnte das Vorkommen von Pathotypen in verschiedenen landwirtschaftlichen, urbanen und auch natürlichen Habitaten belegt werden. Anhand der verfügbaren Daten ist die Rekonstruktion von Ausbreitungsrouten jedoch schwer abzuleiten. Möglicherweise spielen dabei auch bislang unerkannte Wirtsorganismen eine Rolle. So wäre beispielsweise denkbar, dass Protozoen ein Reservoir für *Listeria* darstellen und dazu dienen, die Virulenzfaktoren bei saprophytären Lebenszyklen beizubehalten (Ly and Muller 1989; Ly and Muller 1990).

1.5 Ziel der Arbeit

Über Prävalenz und Diversität von *L. monocytogenes* in landwirtschaftlichen Betrieben sowie im Umfeld von lebensmittelverarbeitenden Unternehmen wurde bereits vielfach berichtet (Vogel, Jorgensen et al. 2001; Aguado, Vitas et al. 2004; Gudmundsdottir, Aalbaek et al. 2004; Nightingale, Schukken et al. 2004; Borucki, Gay et al. 2005; Hansen, Vogel et al. 2006; Wulff, Gram et al. 2006; Chambel, Sol et al. 2007; Esteban, Oporto et al. 2009; Lomonaco, Decastelli et al. 2009). Demgegenüber ist über die Diversität von *Listeria* in natürlichen Umwelthabitaten speziell innerhalb der verschiedenen Spezies sehr wenig bekannt. Es ist weitgehend ungeklärt, wo die Keime, die beispielsweise Lebensmittelbetriebe besiedeln, originär vorkommen. Insbesondere weiß man nur wenig über das Vorkommen von Pathotypen in der Umwelt, die häufig in Zusammenhang mit Listerioseausbrüchen stehen und deshalb besonders gefährlich für den Menschen sind. Dabei hängt die Kenntnis über Ökologie und Ausbreitung von pathogenen Keimen maßgeblich von dem Vermögen ab, die Krankheitserreger zuverlässig aus verschiedenen Umweltmatrices zu detektieren, idealerweise zu quantifizieren und zu charakterisieren. Ziel dieser Arbeit waren die Untersuchung von Prävalenz und Diversität von Listerien in liminischen Lebensräumen. Dabei waren speziell die Habitate Sediment und Wasserpflanzen im Focus. Die zentralen Fragestellungen dabei waren: Wie ist der Einfluss von dem verwendeten Anreicherungsmedium in Bezug auf die Anreicherung von *Listeria* Spezies und -Subtypen? Wie dynamisch ist das Habitat Sediment in einem Fließgewässer hinsichtlich der Besiedelung mit *Listeria*? Inwieweit korreliert das Vorkommen und die Spezies-Komposition von

Listeria Populationen in diesen Habitaten mit jahreszeitlich bedingten Einflüssen?
Welche Spezies kommen in den Habitaten vor und wie divers sind jeweils die *Listeria* Populationen?

2 Material und Methoden

2.1 Medien

BHI Bouillon (Merck)

27,5 g	Hirn-, Herzextrakt, Pepton
2 g	D(+)-Glucose
5 g	NaCl
2,5 g	Di-Na-Hydrogenphosphat
1000 ml	ELIX-Wasser pH 7,4±0,2

Blutröhrchen für Hämolyse Test

1 ml	BHI Bouillon (Merck)
50 µl	in PBS Puffer gewaschene und in BHI Bouillon suspendierte Erythrozyten aus Schafsblut

½ Fraser Bouillon (Sifin)

Basisbouillon	5 g	Fleisch Pepton
	5 g	Caseinpepton
	5 g	Fleischextrakt
	5 g	Hefeextrakt
	20 g	NaCl
	12 g	di-Na-Hydrogenphosphat
	1,35 g	K-di-Hydrogenphosphat
	1 g	Äsculin
	3 g	Lithiumchlorid
	1000 ml	Aqua dest pH 7,2±0,2
Supplement	11,25 µg	Acriflavin-HCl
	450 µg	Ammonium-Fe(III)-Sulfat
	1,8 µg	Nalidixinsäure (Konzentration in der Anreicherung)

Glycerinlösung

16 g	Lactose-Monohydrat (Merck)
10 g	L-Glutaminsäure (AppliChem)
0,1 g	L+Ascorbinsäure (Merck)
1 g	Agar No 1 (Oxoid)
120 g	Glycerin flüssig (Merck)
880 g	Leitungswasser

MRVP (Methyl Rot-Voges Proskauer) Medium

7 g	Pepton
5 g	K ₂ HPO ₄
5 g	Glucose
1000 ml	Aqua dest

α-Naphtol Lösung

5 g	α-Naphtol
95 g	Ethanol

PBS Puffer

7,65 g	NaCl
724 mg	Na ₂ HPO ₄
210 mg	K ₂ HPO ₄
1000 ml	ELIX Wasser

pH 7,2

ONE Broth (Oxoid)

Basisbouillon	28 g	Pepton
	6 g	Kohlehydratmischung
	10 g	Salzmischung
Supplement		genaue Zusammensetzung unbekannt, enthält Cefalosporin

PALCAM Agar mod. (Sifin)

(Polymyxin-Acriflavin-Lithiumchlorid-Ceftazidim-Äsculin Agar)

	23 g	Pepton
	1 g	Stärke
	5 g	NaCl
	3 g	Hefeextrakt
	0,5 g	D-Glucose
	10 g	Mannit
	0,8 g	Äsculin
	0,5 g	Ammoniumeisen(III)-citrat
	15 g	Lithiumchlorid
	0,08 g	Phenolrot
	10 g	Agar
	5 g	Agar Agar No 1 (Oxoid)
	1000ml	ELIX Wasser (Millipore)
Supplement	10 mg	pH 7,2±0,2 Polymyxin-B-Sulfat
	20 mg	Ceftazidim
	5 mg	Acriflavin-Hypochlorid

PC Bouillon

	5 g	Pepton aus Casein (Oxoid)
	2,5 g	Hefeextrakt
	1 g	Glucose
	15 g	Agar Agar pH 7,0±0,2

Reagenz A (Nitratreduktion)

	0,02 g	N-(1-Naphthyl)ethylendiamin-Di-Hydrochlorid (Sigma)
	100 ml	1,5 N HCl

Reagenz B (Nitratreduktion)

	1 g	Sulfanilsäure
	100 ml	1,5 N HCl

TBE Puffer 10x

	242 g	Tris C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Roth)
	55 g	Borsäure (Roth)
	3,7 g	EDTAx2Nax(2H ₂ O) (Fluka)
		mit ELIX auf 1000 g auffüllen pH 8,0

TS Agar (CASO) (Oxoid)

	15 g	Trypton
	5 g	Sojapepton
	5 g	NaCl
	15 g	Agar Agar
	1000 ml	Aqua dest pH 7,3±0,2

UVM II Broth (Oxoid)

Basisbouillon	5 g	Proteose Pepton
	5 g	Caseinpepton
	5 g	Fleischextrakt
	5 g	Hefeextrakt
	20 g	NaCl
	12 g	di-Na-Hydrogenphosphat
	1,35 g	K-di-Hydrogenphosphat
	1 g	Äsculin
	1000 ml	Aqua dest
		pH 7,4±0,2
	Supplement (Konzentration in der Anreicherung)	
	50 µg	Cycloheximid
	15 µg	Acriflavin-HCl
	40 µg	Nalidixinsäure

2.2 Methoden**2.2.1 Qualitativer Nachweis von Listerien**

Der qualitative Nachweis von Listerien wurde in Anlehnung an L00.00-32 Horizontales Untersuchungsverfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* Teil 1 gemäß §64 LFGB (DIN EN ISO 11290-1 Januar 2005) geführt. Dieses kaskadenartig aufgebaute Referenzverfahren sieht eine zweistufige selektive Anreicherung unter Verwendung von halb-konzentrierter bzw. voll-konzentrierter Fraser Bouillon mit jeweilig anschließender Subkultivierung auf zwei unterschiedlichen selektiven Festmedien vor, wobei die Verwendung von *Listeria* Agar nach Agosti und Ottaviani vorgeschrieben ist (Ottaviani, Ottaviani et al. 1997; Vlaemynck, Lafarge et al. 2000). Diese Methode wurde in dieser Arbeit für die Untersuchung von Umweltproben insofern modifiziert, als dass nur ein selektiver Anreicherungsschritt in ½ Fraser Bouillon (Sifin) bei 30°C für 24 h durchgeführt und als selektives Festmedium lediglich PALCAM Agar (Sifin) verwendet wurde, wobei jeweils 50 µl der Anreicherungen gespatelt wurden. Das selektive Festmedium wurde bei 30°C für 48 – 72 h bebrütet. Präsumtive Kolonien wurden auf TS Agar (Trypton Soja Agar, Oxoid) subkultiviert und bei 30 °C 48 h bebrütet. Die Bestätigung dieser Ausstriche erfolgte durch Begutachtung unter Schräglicht nach Henry, mikroskopisch bzw. durch weitere Subkultivierung auf LAOA Agar (*Listeria* Agar nach Ottaviani und Agosti, Biorad). Alle *Listeria* Isolate wurden in 12 %iger Glycerinlösung bei -20 °C gelagert. Für die Durchführung der Untersuchungen erfolgte die Rekonstituierung von Isolaten aus den Stocklösungen auf TS Agar unter 2tägiger Bebrütung bei 30 °C

und sukzessiver Subkultivierung ebenfalls auf TS Agar. Dadurch sollte eine voll intakte Stoffwechselaktivität der Keime gewährleistet werden.

2.2.2 Bestimmung der Keimzahl von Listerien im MPN Verfahren

Die Abschätzung der wahrscheinlichsten Keimzahl (Most Probable Number MPN) erfolgte aufgrund von statistischen Berechnungen gemäß den Vorgaben von „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Allgemeine Anforderungen und Anleitung für mikrobiologische Untersuchungen“ DIN EN ISO 7218:2005. Dazu wurden wie unter „Qualitativer Nachweis von Listerien“ beschrieben von jeder Probenmatrix mehrere Teilproben sowohl parallel als auch in mehreren Verdünnungsstufen angereichert. Je nach erwarteter Keimzahl der Zielkeime wurden dabei die Verdünnungsstufen so gewählt, dass die Ansätze der höchsten Verdünnung zumindest teilweise negativ getestet wurden. Entsprechend ergab sich anhand von positiv und negativ getesteten Ansätzen eine Verteilungsmatrix, die in Form eines numerischen Zahlencodes ausgedrückt werden konnte. Basierend auf diesen Zahlencode wurde unter Berücksichtigung von vorgegebenen Konfidenzintervallen die wahrscheinlichste Keimzahl mit Hilfe von MPN Tabellen abgeschätzt. Für die Ermittlung der Keimzahlen sind in DIN EN ISO 7218:2005 MPN-Tabellen sowohl für den 3fachen als auch für den 5fachen Probenansatz verfügbar.

2.2.3 Identifizierung von Listerien auf Artebene

2.2.3.1 FTIR Spektroskopie

Fourier-Transformierte Infrarot Spektroskopie (FTIR) ist eine standardisierte physiko-chemische Methode um Mikroorganismen auf Zellebene zu charakterisieren bzw. zu identifizieren (Samelis, Bleicher et al.; Wenning, Buchl et al.; Lin, Schraft et al. 1998). Die Zellkomponenten absorbieren Licht im Infrarotbereich unterschiedlich, so dass ein Absorptionsspektrum generiert werden kann. Die Kalkulation eines Absorptionsspektrums erfolgt aus dem Verhältnis der Intensitäten des einwirkenden Infrarot-Lichtstrahles vor bzw. nach Passieren des Probenmaterials. Dabei kann das Absorptionsspektrum von mikrobiellem Zellmaterial in spektrale Bereiche unterteilt werden, denen bestimmte Zellbestandteile wie Proteine, Lipide und Polysaccharide

zugeordnet werden können. Das FTIR-Spektrum einer bakteriellen Probe ist somit das Abbild seiner kompletten chemischen Zellzusammensetzung, und ist für sehr viele Bakterienspezies charakteristisch. Oftmals werden zur Identifizierung von Isolaten lediglich bestimmte Teilbereiche des Spektrums herangezogen. Letztendlich wird die Identifizierung von unbekanntem Keimen über den Vergleich der Absorptionsspektren mit den Referenzspektren einer Datenbank ermöglicht (Helm, Labischinski et al. 1991; Holt, Hirst et al. 1995; Mariey, Signolle et al. 2001; Wenning, Seiler et al. 2002; Oust, Møretrø et al. 2004).

Eine Fortentwicklung stellt die Anwendung der FTIR Methodik in Verbindung mit selbstlernenden künstlichen neuronalen Netzen (KNN) dar (Udelhoven, Naumann et al. 2000; Wenning, Scherer et al. 2008). Neuronale Netze sind wie ihre biologischen Vorbilder aus Neuronen aufgebaut, die im Verlauf eines überwachten Lernprozesses insofern trainiert werden, dass Eingabedaten (z. B. das Absorptionsspektrum eines unbekanntem Isolates) in Relation zu vordefinierten Ausgabedaten stehen. Speziell für die Klassifizierung von Mikroorganismen bieten daher Neuronale Netze den Vorteil, dass zu jeder Eingabe die korrekte Ausgabe vorgegeben werden kann, wodurch das Klassifizierungspotential zur Differenzierung selbst von nah verwandten Arten maßgeblich gesteigert werden kann (Wenning, Scherer et al. 2008). In dieser Arbeit erfolgte die Vorgehensweise zur Identifizierung von *Listeria* Isolaten mit Hilfe von künstlichen neuronalen Netzen wie beschrieben von Rebuffo et al. unter Anwendung der dort etablierten Referenzdatenbank (Rebuffo, Schmitt et al. 2006). Von allen *Listeria* Isolaten wurden mindestens 2 voneinander unabhängige Kultivierungen im FTIR-Spektrometer gemessen und anhand der Datenbank identifiziert. Nur Spektren, die die vorgegebenen Qualitätskriterien erfüllten (Absorption 0,25 - 1,20, Verhältnis von Signal / Rauschen $< 1,5 \times 10^{-4}$ U und ein Wert beim Wassertest von $< 3 \times 10^{-4}$ U) sowie bei der hierarchischen Clusteranalyse eine spektrale Distanz von $< 0,2$ beim Algorithmus Average Linkage zeigten, wurden für die Auswertung verwendet. Schließlich erfolgte die Subtypisierung der Isolate mittels hierarchischer Clusteranalyse (HCA).

2.2.3.2 API-*Listeria*

API *Listeria* ist ein standardisiertes Testsystem zur Differenzierung von *Listeria* Isolaten (Bille, Catimel et al. 1992). Der kommerziell erhältliche Teststreifen

wurde gemäß Herstellerangabe beimpft und bebrütet. Die 10 im Teststreifen enthaltenen Mikroröhrchen beinhalten dehydrierte Substrate anhand derer für einzelne *Listeria* Spezies charakteristische Enzymaktivitäten nachgewiesen werden können. Je nach Metabolisierung dieser Substrate resultieren Reaktionsmuster, die in Form von numerischen Zahlenprofilen ausgedrückt werden können (Abb. 2.1). Diese Zahlenprofile können schließlich einer bestimmten *Listeria* Spezies zugeordnet werden.

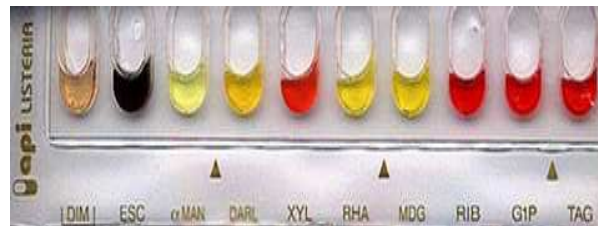


Abb. 2.1 Reaktionsmuster von *L. monocytogenes* beim API-*Listeria* Test. Die Reaktion DIM (DL-Alanin- β -Naphthylamid und D-Alanin-*p*-Nitroanilid) unterscheidet *L. monocytogenes* von anderen *Listeria* Spezies (Clark and McLaughlin 1997).

Zusätzlich wurde die hämolytische Aktivität von Isolaten in Flüssigkultur getestet. Dazu wurde BHI Bouillon, die zu 5% aus einer Erythrozytensuspension aus Schafsblut bestand, beimpft und bei 30 °C 24 h bebrütet. Bei jeder Untersuchung wurde sowohl ein hämolytischer Kontrollstamm als Positivkontrolle als auch ein unbeimpftes Röhrchen als Negativkontrolle mitgeführt. Die hämolytische Aktivität der Testkeime wurde dadurch sichtbar, dass durch Produktion von Hämolysin die Erythrozytenmembranen zerstört wurden, wodurch Hämoglobin aus den Zellen austrat. Aufgrund der geringeren Dichte von Hämoglobin war der rote Blutfarbstoff im Überstand der Übernachtskultur als klare Rotfärbung sichtbar. Nicht lysierte Erythrozytenzellen sedimentierten und der Überstand des Nährmediums behielt die originäre gelbliche Färbung des Nährmediums.

2.2.3.3 Multiplex PCR

Als weitere Methode zur Differenzierung von *Listeria* wurde das Multiplex PCR Verfahren nach Bubert et al. angewendet (Bubert, Hein et al. 1999). Identifizierungsgrundlage ist dabei das *iap* Gen, das artspezifische Abschnitte enthält (Abb. 2.2). Durch Einsatz von speziesspezifischen Primern können nach

Amplifikation und Auftrennung auf einem Agarosegel anhand der Größe der amplifizierten Fragmente die Spezies bestimmt werden.

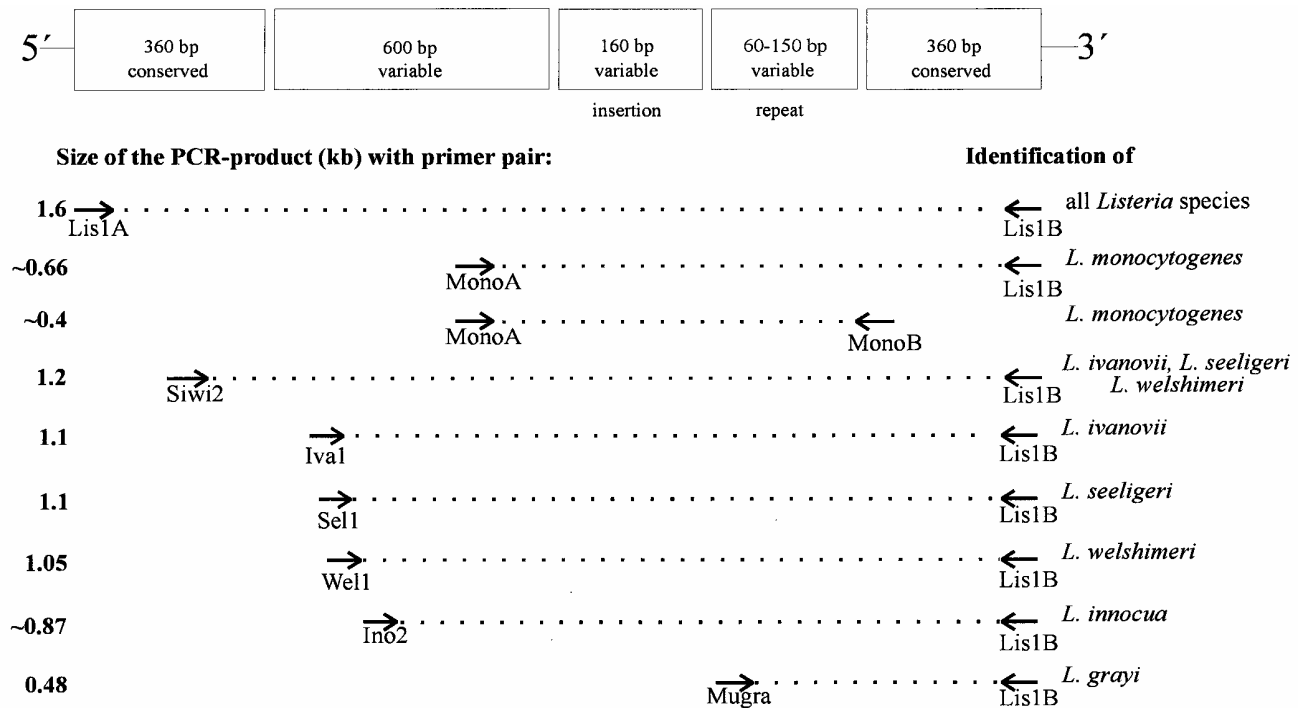


Abb. 2.2 Konservierte und variable, speziesspezifische Bereiche beim *iap*-Gen von *Listeria* (Darstellung übernommen aus Bubert et al. (Bubert, Hein et al. 1999)).

Zur Isolierung von DNA aus Listerienzellen wurde ca. eine Impföse von 2 - 6 Tage alten Kolonien von einem nichtselektiven Festmedium abgenommen und in 0,2 ml MilliQ suspendiert. Diesen Suspensionen wurden ca. 0,5 g Zirkonium/Silikat-Perlen (\varnothing 0,1 mm, Roth) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in einem Ribolyser (MP FastPrep-24) bei $6,5 \text{ m}^{-\text{s}}$ und $2 \times 45 \text{ s}$ aufgeschlossen. Im Anschluss wurden die Lysate für 5 min bei 95°C erhitzt (Thermoblock UNIEQUIP) und 10 min bei $14.000 \times g$ zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415 C). Die Überstände wurden weitere Untersuchungen verwendet.

Die Multiplex PCR Ansätze erfolgten wie bei Rebuffo et al. beschrieben (Rebuffo, Schmitt et al. 2006). Für die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* und *L. grayi* wurde der reverse primer Lis1B (5'-TTA TAC GCG ACC GAA GCC AAC-3') eingesetzt. Da die *iap*-Amplifikate der Spezies *L. seeligeri*, *L. ivanovii* und *L. welshimeri* auf dem Agarosegel wegen zu geringer Größenunterschiede nicht differenzierbar waren, wurde zunächst im Multiplex PCR Ansatz der forward primer Siwi2 eingesetzt, der für alle drei Arten

bindet (Tab. 2.1). Bei Erhalt eines Signals auf dieser Bandenhöhe wurde die Probe jeweils mit den 3 artspezifischen primern Sel1, Iva1 und Wel1 einzeln untersucht. Das Reaktionsvolumen bei den PCR-Ansätzen war jeweils 25 µl. Das Temperatur/Zeit Protokoll war: initiale Denaturierung bei 95 °C für 4 min, 30 Zyklen 95 °C für 1 min, 58°C für 30 s und 72 °C für 1min. Der finale Syntheseschritt fand bei 72 °C für 5 min statt. Das Protokoll für die spezifische PCR war bis auf die Temperatur beim Primerannealing bei 62 °C identisch.

<i>Listeria</i> spp.	forward primer	Fragmentgröße (kb)	Sequenz
<i>L. monocytogenes</i>	MonoA	0,66	5`-CAA ACT GCT AAC ACA GCT ACT-3`
<i>L. innocua</i>	Ino2	0,87	5`-ACT AGC ACT CCA GTT AAA-3`
<i>L. seeligeri</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>L. welshimeri</i>	Siwi2	1,2	5`-TAA CTG AGG TAG CGA GCG AA-3`
<i>L. seeligeri</i>	Sel1	1,1	5`-TAC ACA AGC GGC TCC TGC TCA AC-3`
<i>L. ivanovii</i>	Iva1	1,1	5`-CTA CTC AAG CGC AAG CGG CAC-3`
<i>L. welshimeri</i>	Wel1	1,05	5`-CCC TAC TGC TCC AAA AGC AGC G-3`
<i>L. grayi</i>	Mugra	0,48	5`-CCA GCA GTT TCT AAA CCT GCT-3`

Tab 2.1 Primer für Multiplex PCR und Spezifische PCR

Je 5 µl der Probenansätze wurden auf einem 1 %igen Agarosegel unter Zugabe von 1 µl Ladepuffer (6 x Loading Dye Solution 0,003 % Bromphenolblau, Fermentas) aufgetrennt (Abb. 2.3). Als Größenstandard diente dabei GeneRuler DNA Ladder-Mix 10.000 - 100bp (Fermentas). Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und unter UV Strahlung ausgewertet (Image Station 440CF Kodac). In Abb. 2.3 sind die Amplifikate, die die Differenzierung der verschiedenen Spezies ermöglichen, dargestellt. Die Fragmente für *L. seeligeri*, *L. ivanovii* und *L. welshimeri* hatten dabei jeweils eine Größe von etwa 1200 bp, weshalb diese drei Spezies beim Multiplex PCR-Ansatz nicht zu unterscheiden waren. Demgegenüber wurden bei den Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. grayi* Fragmente von eindeutiger, speziesspezifischer Größe generiert (660bp, 870 bp bzw. 480 bp, Abb. 2.3).

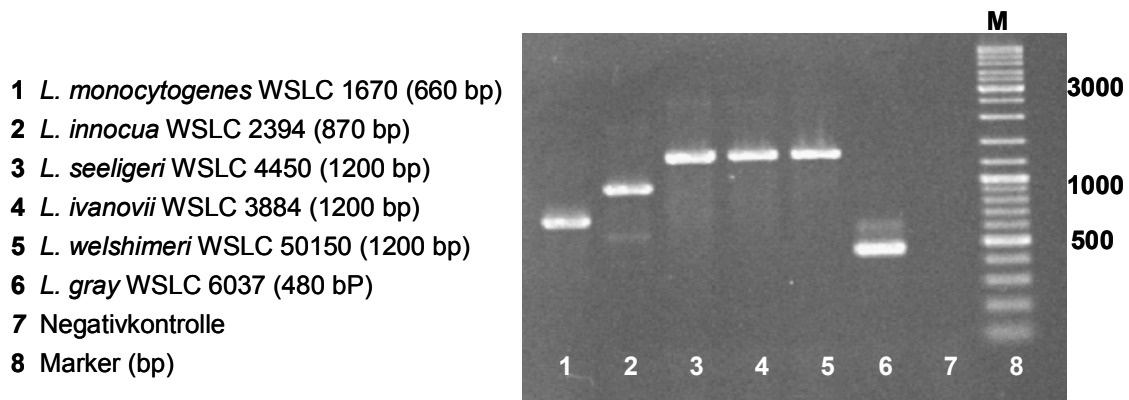


Abb. 2.3 Differenzierung von *Listeria* Spezies mit Hilfe von Multiplex PCR. Die Signale von *L. seeligeri*, *L. ivanovii* und *L. welshimeri* wurden jeweils gemäß Protokoll mit dem forward Primer Siwi2 generiert.

2.2.3.4 16S rDNA Sequenzierung

Während bei sehr vielen Gattungen die Speziesidentifizierung anhand von 16S rDNA Sequenzen sehr zuverlässig ist, ist dies bei *Listeria* aufgrund des sehr hohen Konservierungsgrades von deren 16S rDNA nicht eindeutig möglich (Collins, Wallbanks et al. 1991). In dieser Arbeit wurde die Sequenzierung von 16S rDNA Fragmenten dann angewandt, wenn Isolate weder mit Hilfe von FTIR-Spektroskopie noch mit Hilfe von Multiplex PCR identifiziert werden konnten, um Isolate auf Gattungsebene zu identifizieren bzw. die Zugehörigkeit zum Genus *Listeria* zu bestätigen. Dazu wurden die Zelllysate wie unter dem Methodenteil „Multiplex PCR“ beschrieben hergestellt. Die Amplifikation der Fragmente wurde wie beschrieben bei Wenning et al. (Wenning, Seiler et al. 2002) mit Hilfe der Primer 16Sf (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') und 16Sr (5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3') durchgeführt. PCR Produkte wurden mit Hilfe von einem DNA-Reinigungskit (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) gereinigt bzw. aufkonzentriert. Die Sequenz wurde schließlich von einem externen Sequenzierservice (GATC Konstanz) bestimmt. Die Auswertung bzw. die Identifizierung der Sequenzen erfolgte über den Abgleich mit Sequenzen aus der Internet Datenbank NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST>).

2.2.4 Subtypisierung von *Listeria* Isolaten

2.2.4.1 FTIR Clusteranalyse

FTIR-Spektren von Mikroorganismen beinhalten Informationen über die Zusammensetzung ihrer Zellbestandteile. Die Bausteine von Mikroorganismen wie Proteine, Polysaccharide, Lipide, DNA und RNA tragen mit ihren speziellen Eigenschaften zur Absorption von Infrarotstrahlung dazu bei, dass speziesspezifische bzw. individuelle Informationen über den Aufbau ihrer Zellen im FTIR-Spektrum abgelegt werden. Über den Vergleich der Spektren ist auch eine intraspezifische Typisierung von Isolaten möglich (Rebuffo, Schmitt et al. 2006; Wenning, Scherer et al. 2008). Hierarchische Clusteranalysen wurden anhand folgender Parameter durchgeführt:

- Analyse von spektralen Fenstern der Wellenlängen von 700-1.200 cm^{-1} , 1.500-1.800 cm^{-1} und 2.800-3.100 cm^{-1}
- Datenvorbehandlung mit der ersten Ableitung und Vektornormierung
- Normierung auf Replevel
- Algorithmus Average Linkage.

Für die Klassifizierung von Typen wurde als Grenzwert eine spektrale Distanz von maximal 0,2 beim Algorithmus Average Linkage festgelegt.

2.2.4.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD ist eine vielfach angewandte, PCR basierte Typisierungsmethode (Mazurier and Wernars 1992; Czajka, Bsat et al. 1993; Lawrence, Harvey et al. 1993; Farber and Addison 1994; Jersek, Gilot et al. 1999; Wagner, Maderner et al. 1999; Yoshida, Takeuchi et al. 1999). Dabei wird eine einzelne Primersequenz bei der PCR Reaktion eingesetzt. Die PCR läuft unter schwach stringenten Bedingungen ab, wodurch der Primer mehr oder weniger spezifisch an Ziel-DNA bindet. Die Amplifizierung von Genabschnitten kann stattfinden, wenn zwei Bindungsstellen nahe genug orientiert sind, wodurch ein Profil von Amplifikaten unterschiedlicher Größe generiert wird. Kritisch dabei ist, dass die Methodik vielerlei Einflussfaktoren unterworfen ist, was die Reproduzierbarkeit und die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laboratorien empfindlich erschwert. Diese Faktoren sind im

wesentlichen das DNA-Extraktionsprotokoll und die Konzentration von Ziel-DNA im Reaktionsansatz, das DNA/Primer-Verhältnis, die Konzentration von Mg^{2+} , die Konzentration und die Qualität der TaqThermonuclease, das Temperatur-Zeit Regime bei der PCR und nicht zuletzt das Amplifizierungsgerät selber (Tyler, Wang et al. 1997). Um reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können ist daher eine strikte Standardisierung des Verfahrens erforderlich.

Für die RAPD Analysen wurden die Zellysate wie unter „Multiplex PCR“ beschrieben hergestellt. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der DNA-Extraktionen wurden von jedem Isolat jeweils zwei Lysate von zwei unabhängigen Kultivierungen gewonnen. Die Messung der DNA-Gehalte in den Lysaten erfolgte am NanoDrop® ND-1000 Spektrometer mit Hilfe der software ND-1000 V3.5.2 (PeqLab). Als Positivkontrolle wurde bei jedem PCR-Lauf ein Isolat mit bekanntem Bandenmuster mitgeführt. Verschiedene Autoren empfehlen die Verwendung von mindestens 3 Primern bei der Typisierung von Listerien (Mazurier and Wernars 1992; Farber and Addison 1994; Kerr, Kite et al. 1995; Tyler, Wang et al. 1997; Vogel, Jorgensen et al. 2001; Martinez, Rørvik et al. 2003; Chambel, Sol et al. 2007). Außerdem kann durch den gleichzeitigen Einsatz von 2 Primern sowohl die Komplexität der Bandenprofile als auch die Reproduzierbarkeit der Methodik erhöht werden (Welsh and McClelland 1991; Micheli, Bova et al. 1993; Malak, Vivier et al. 2001). Für die Typisierung wurden in dieser Arbeit simultan die drei Primer M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') (Cocolin, Stella et al. 2005), Eric2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') (Martinez, Rørvik et al. 2003) und inIA.F (5'-CAG GCA GCT ACA ATT ACA CA-3') (Chambel, Sol et al. 2007) eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt, wobei 50 - 100 ng Proben-DNA, 3 µl 10 x PCR Puffer IV, 1 mM dNTP Mix, 3,5 mM $MgCl_2$, 6,25 pmol / µl von jedem Primer und 0,5 U Thermoprime Plus Taq Polymerase (alle Reagenzien von Thermo Fisher Scientific) eingesetzt wurden. Das Temperatur / Zeit Protokoll für die RAPD PCR war: initiale Denaturierung bei 94 °C für 2 min, 35 Zyklen 94 °C für 1 min, 35 °C für 1 min und 72 °C für 2 min. Der finale Syntheseschritt fand bei 72 °C für 5 min statt. Die Proben wurden unter Zugabe von Ladepuffer (6 x Loading Dye Solution 0,003 % Bromphenolblau, Fermentas) auf einem 1,6 %igen Agarosegel (rotiagarose, Roth) in TBE Puffer aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und unter UV Strahlung ausgewertet (Image Station 440CF Kodac). Als Größenstandard diente GeneRuler DNA Ladder-Mix

10.000 - 100 bp (Fermentas). Die Auswertung von Bandenprofilen wurde mit Hilfe der software TL120 (biostep) durchgeführt. Um die Bandenmuster mehrerer Gele miteinander vergleichen zu können, wurde mit Hilfe der software TL120DM (biostep) eine Datenbank erstellt. Dabei zeigten die Bandenmuster der Positivkontrollen im UPGMA Cluster eine Ähnlichkeit von > 90 %. Bandenprofile von Isolaten, die sich an einer Stelle im Bandenmuster unterschieden, wurden als unterschiedliche Typen klassifiziert.

2.2.4.3 (GTG)5 Typisierung

Dieser Typisierungsmethode liegt die Analyse von repetitiven Elementen in der bakteriellen Genomsequenz zugrunde. Zellysate für die Analysen wurden wie unter „RAPD PCR“ beschrieben hergestellt. Für die Typisierung wurde der Primer (GTG)₅ (5`-GTGGTGGTGGTGGTG-3`) (Versalovic, Schneider et al. 1994) eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt, wobei 50 ng Proben - DNA, 3 µl 10 x PCR Puffer IV, 1 mM dNTP Mix, 2,5 mM MgCl₂, 50 pmol Primer (GTG)₅ und 0,5 U Thermoprime Plus Taq Polymerase (alle Reagenzien von Thermo Fisher Scientific) eingesetzt wurden. Das Protokoll für die (GTG)₅ PCR lautete: initiale Denaturierung bei 94°C für 2 min, 30 Zyklen bei 94 °C für 1 min, 40°C für 1 min und 65 °C für 2min. Der finale Syntheseschritt fand bei 72 °C für 5 min statt. Die Analyse der Bandenprofile erfolgte wie unter „RAPD PCR“ beschrieben.

2.2.4.4 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Auch diese Typisierungsmethode wurde bereits vielfach angewandt und gilt gemeinhin als hochauflösend (Vos, Hogers et al. 1995; Mueller and Wolfenbarger 1999; Fannesbech Vogel, Fusing et al. 2004; Parisi, Latorre et al. 2009). Für diese Analysen wurde genomische DNA (Extraktion siehe „Multiplex PCR“) mit Hilfe eines DNA-Reinigungskits (GeneJET™ PCR Purification Kit, Fermentas) gereinigt und mit Hilfe von zwei Restriktionsenzymen verdaut. In dieser Arbeit wurden die Enzyme *EcoRI* und *MseI* verwendet. *EcoRI* ist ein Enzym, wofür im Genom die entsprechenden Schnittstellen „selten“ vorkommen, so dass große Teilfragmente

generiert wurden. *MseI* schnitt unter Bildung viel kleinerer Teilstücke deutlich häufiger (Abb. 2.4-1).

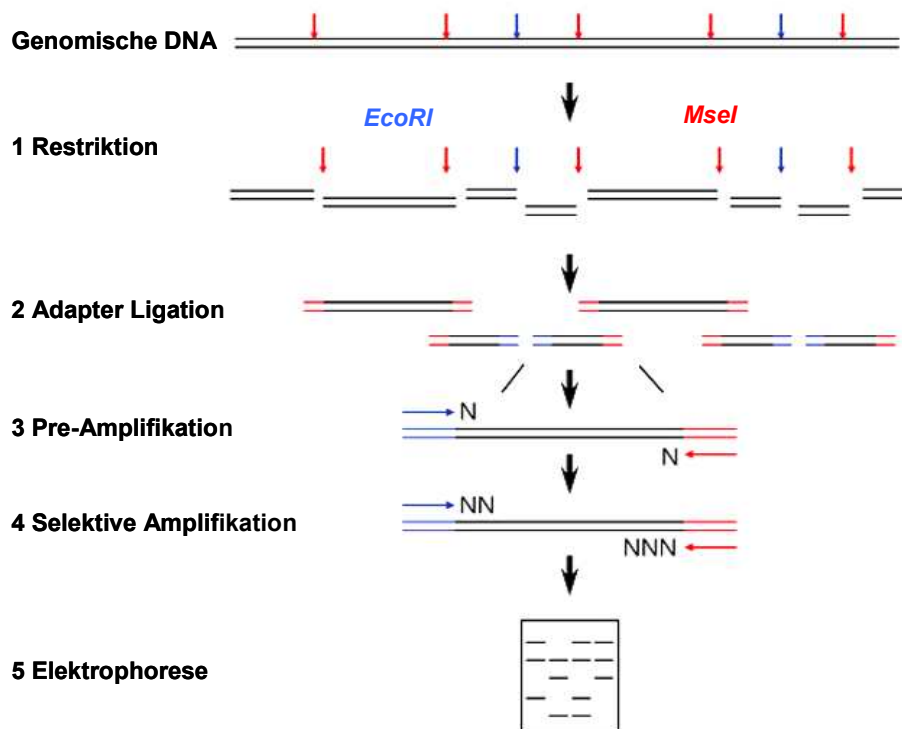


Abb. 2.4 Schematische Darstellung der AFLP Typisierungsmethode (Chial 2008).

Die Restriktionsenzyme schnitten den DNA-Doppelstrang mit überstehenden Enden, d. h. ein Strang lag mit einem kurzen Überhang vor. Auf diese Weise wurden 3 unterschiedliche Fragmenttypen generiert: Fragmente mit *EcoRI-EcoRI* Schnittenden, Fragmente mit *MseI-MseI* Schnittenden sowie Fragmente mit *EcoRI-MseI* Schnittenden. Im anschließenden Ligationsschritt wurden mit Hilfe von Ligase *EcoRI*- und *MseI*-Adaptoren an die Enden der Teilstücke angelagert. Die Adaptoren waren aus einem 15 bp langen DNA-Doppelstrang bekannter Sequenz sowie Endungen aufgebaut, die komplementär zu den Endungen der Restriktionsfragmente waren, so dass Fragmente hergestellt wurden, die im Kern aus dem jeweiligen Restriktionsfragment und 2 umgebenden Adaptoren bestanden. Da die Sequenzen der Restriktionsfragmente nicht bekannt waren, wurden somit über die Anlagerung von den Adaptersequenzen Primer-Bindungsstellen mit definierter Sequenz geschaffen. Die Adaptersequenzen bildeten daher die Matrizen für die nachfolgenden Amplifikationsreaktionen, d. h. die Gegensequenzen der Adaptoren wurden als Primer eingesetzt (Abb. 2.4-2). Bei der Pre-Amplifikation wurden die

Primer Pre-EcoRI (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') und Pre-MseI (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3') eingesetzt, die jeweils mit einem pre-selektiven Nukleotid am 3' Ende versehen waren. Diese Primer umfassten einen Teil der Adaptoren, die Schnittsequenzen sowie eines (von 4 möglichen) Nukleotiden des anschließenden, unbekanntes Fragmentes. Durch diese pre-selektiven Nukleotide wurden nicht alle Fragmente vervielfältigt sondern nur die, die an der korrespondierenden Stelle eine komplementäre Base aufwiesen (Abb. 2.4-3).

Beim selektiven Amplifizierungsschritt wurden die Primer EcoRI-G (5'-GAC TGC GTA CCA ATT CG-3') und MseI-AG (5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG-3') mit zusätzlichen selektiven Nukleotiden am 3' Ende eingesetzt (Abb. 2.4-4). Durch den Einsatz dieser Primer wurde wiederum lediglich ein Subset der vorhandenen Teilstücke amplifiziert, da ansonsten zu viele Amplifikate generiert worden wären, deren klare Auftrennung nicht möglich gewesen wäre (Abb. 2.4-5).

Für den Verdau und die Ligation wurde in dieser Arbeit das kommerzielle Testkit AFLP Template Preparation Kit (LI-COR Biosciences) nach Herstellerangabe verwendet. Die Ansätze für die Pre-Selektions PCR wurden einem Volumen von 25 µl durchgeführt, wobei 2,5 µl vom 1:10 verdünnten Ligationsmix, 3 µl 10 x PCR Puffer IV, 1 mM dNTP Mix, 2 mM MgCl₂, 25 pmol von jedem Primer und 0,5 U Thermoprime Plus Taq Polymerase (alle Reagenzien von Thermo Fisher Scientific) eingesetzt wurde. Die PCR Reaktionsbedingungen wurden laut Herstellerangabe gewählt. Die selektive Amplifikation wurde in einem Volumen von 10,5 µl angesetzt, wobei 2 µl vom 1:20 verdünnten Pre-Selektionsansatz, 1,3 µl 10x PCR Puffer IV, 1 mM dNTP Mix, 2 mM MgCl₂, 25 pmol/µl von jedem Primer und 0,5 U Thermoprime Plus Taq Polymerase (alle Reagenzien von Thermo Fisher Scientific) eingesetzt wurde. Die Amplifikate wurden unter Anwendung des kommerziellen Testkits Agilent DNA 1000 (Agilent) fluoreszenzmarkiert, auf die dafür vorgesehenen Probenträger aufgetragen und die Probenkomponenten mit Hilfe von einem Agilent 2100 Bioanalyser elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung der Bandenmuster erfolgte mit Hilfe der Auswertungssoftware TL120 (biostep) wie unter „RAPD PCR“ beschrieben. Zur Validierung der Methode wurden von 6 Isolaten Doppelbestimmungen von 2 je unabhängigen Kultivierungen durchgeführt.

2.2.5 Quantifizierung der Diversität von *Listeria* Populationen

2.2.5.1 Simpson Diversitätsindex D

Per Definition ist die Diversität in der Biologie ein Maß für die Artenvielfalt in einer Population oder in einem Lebensraum. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Quantifizierung der Diversität der Simpson Diversitätsindex D angewandt. Ursprünglich wurde dieser Index entwickelt, um die Biodiversität in einem Habitat zu beschreiben (Simpson 1949), die anhand einer bestimmten Methodik ermittelt wurde. Es wird dabei die Wahrscheinlichkeit ausgedrückt, mit der zwei willkürlich gewählte Individuen einer Population unterschiedlichen Kategorien bzw. unterschiedlichen Typen zugeordnet werden. Dieser Diversitätsindex wird auch vielfach angewandt, um die Sensitivität unterschiedlicher Typisierungsmethoden zu vergleichen, wobei im Prinzip die Fähigkeit einer Methode ausgedrückt wird, unterschiedliche Typen zu diskriminieren. Die Kalkulation der Simpson Divesitätsindizes erfolgte nach der Gleichung (Simpson 1949; Hunter and Gaston 1988)

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$$

mit

N = gesamte Anzahl der betrachteten Individuen

S = Anzahl der beobachteten Typen

n_j = Anzahl der Individuen, die einem bestimmten Typus angehören.

Die Werte liegen in einem Bereich von 0 bis 1. Je höher die Werte für D kalkuliert werden, desto höher ist die Biodiversität in einem untersuchten Habitat.

2.2.5.2 Quotient aus Typenanzahl und Isolatanzahl Q

Dieses sehr simple Verhältnis zwischen der Anzahl von detektierten Typen und der Anzahl von untersuchten Individuen kann mit

$$Q = \frac{n}{N}$$

ausgedrückt werden, wobei

n = Anzahl der Typen und

N = Anzahl der untersuchten Individuen (Chambel, Sol et al. 2007). Diese Kennziffer drückt die Diversität in einer Population unabhängig von der Abundanz der einzelnen Typen aus. Die ermittelten Werte liegen zwischen 0 und 1, wobei gilt, je höher der Quotient, desto mehr Typen pro untersuchter Anzahl von Individuen wurden gezählt.

2.2.5.3 Abschätzung der gesamten Artenvielfalt

2.2.5.3.1 Akkumulation von Spezies und Kurvenextrapolation

Nicht nur in mikrobiellen Populationen sind die einzelnen Spezies bzw. Subtypen in unterschiedlichen Häufigkeiten vertreten, wobei das Verhältnis zwischen untersuchter Probenanzahl und der Anzahl der detektierten Typen Aufschluss über die Diversität der Population gibt. Je weniger divers eine Population ist, desto weniger neue Arten werden bei fortschreitender Beprobung detektiert. Eine Möglichkeit zur grafischen Darstellung dieses Zusammenhangs sind Akkumulationskurven. Eine Spezies-Akkumulationskurve stellt die kumulative Anzahl von detektierten Typen in Bezug auf die Anzahl von untersuchten Proben oder Individuen dar, d. h. mit jeder zusätzlich untersuchten Probe werden die neu detektierten Typen aufaddiert (siehe Beispiel Abb. 2.5).

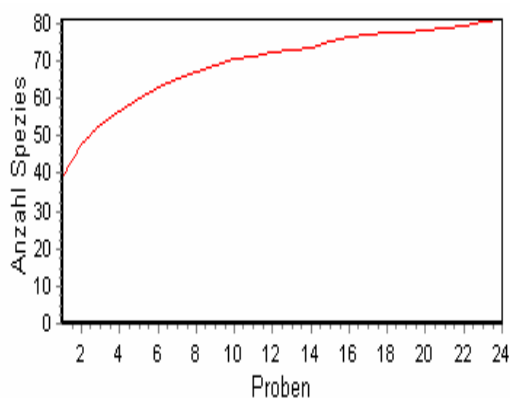


Abb. 2.5 Akkumulationskurve von Insekten-Spezies bei steigender Anzahl von untersuchten Proben (m^2). Zur Glättung des Grafen wurde anhand der Software SDR IV die Kurve unter Berechnung von 100 zufälligen Probenahmen (random samplings)

Der Verlauf einer Spezies-Akkumulationskurve gibt Aufschluss über die Artenvielfalt und die Abundanz der einzelnen Arten in dem untersuchten Habitat. Ein steiler Kurvenverlauf spiegelt ein sehr diverses Populationsgefüge wider. Da die Anzahl der Spezies in jeder Population endlich ist, würden bei fortschreitender Beprobung immer weniger neue Typen nachgewiesen werden, so dass sich die Akkumulationskurve einem asymptotischen Verlauf annähert (Hughes, Hellmann et

al. 2001). Insofern gibt der Akkumulationsgraf auch Auskunft darüber, wie „vollständig“ die Beprobung eines Habitates ist. Ausgehend von Spezies-Akkumulationskurven ist bei entsprechend profunder Beprobung einer Population die Abschätzung der totalen Artenvielfalt über Extrapolation des Akkumulationsgrafens beispielsweise über die Michaelis-Menten Konstante möglich (Raaijmakers 1987). In dieser Arbeit wurde die Extrapolation von Akkumulationskurven mit Hilfe der Software SDR-IV anhand der Hyperbelfunktion

$$S(n) = \frac{S_{\max} n}{B + n}$$

mit

n = Anzahl Typen und

S_{\max} und B als angepasste Konstanten modelliert und die gesamte Artenvielfalt in den untersuchten Habitaten kalkuliert.

2.2.5.3.2 Rang-Abundanz und Verteilungsfunktionen

Eine weitere Möglichkeit zur visuellen Darstellung der Beprobung eines Habitates sind Rang-Abundanzkurven. Dabei wird die jeweilige Häufigkeit der detektierten Typen beginnend mit dem Typus der höchsten Abundanz in abnehmender Reihenfolge gegen die Anzahl untersuchter Individuen aufgetragen (Abb. 2.6).

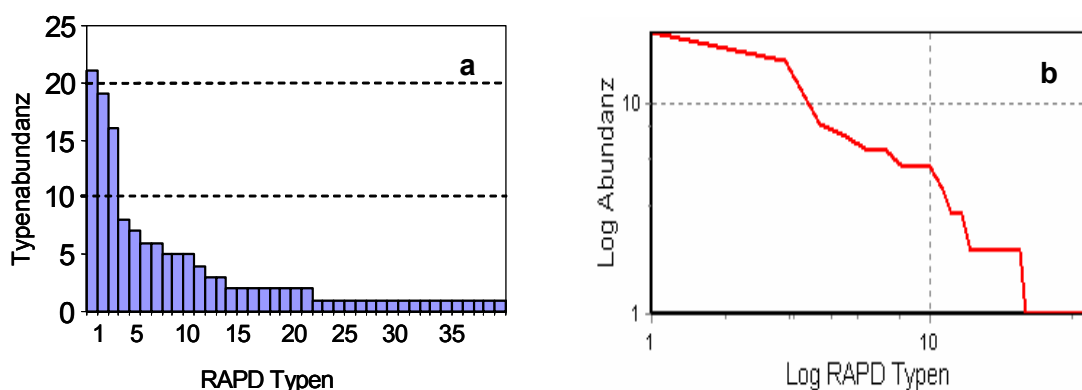


Abb. 2.6 a Darstellung der Rang-Abundanz von unterschiedlichen Spezies oder Typen in einem Habitat. b Häufigkeitsverteilung bei logarithmischer Skalierung der Achsen. Der gezeigte Graf spiegelt eine gestutzte lognormale Häufigkeitsverteilung wider.

Anhand von Rangabundanzkurven wird deutlich, wie die detektierten Spezies bzw. Typen in einem Habitat oder in einer Probe verteilt vorkommen. Die Beprobung gilt als vollständig, wenn alle Typen mindestens 2-mal aufgenommen wurden (Seaby and Henderson 2006). In der Regel gibt es in mikrobiellen Populationen jedoch einige wenige Arten bzw. Typen, die in höherer Abundanz vorkommen. Die meisten Arten aber kommen selten vor bzw. werden nur ein Mal detektiert (Gotelli and Colwell 2001; Hughes, Hellmann et al. 2001). Anhand der Verteilung, in der die verschiedenen Typen vorkommen, können „unvollständige“ Beprobungen trotzdem als Grundlage für die Abschätzung der gesamten Diversität dienen, indem entsprechende Verteilungsfunktionen (beispielsweise Poisson- oder logarithmische Normalverteilung) angepasst werden (Preston 1948; Bulmer 1974). Anhand der Software SDR IV kann geprüft werden, ob die Typenabundanz in einer Probe in einer Verteilung vorliegt, die die Abschätzung der nicht detektierten Typen zulässt.

2.2.5.3.3 Nicht-parametrische Abschätzung der Artenvielfalt

Eine weitere Möglichkeit zur Abschätzung der Artenvielfalt stellen nicht-parametrische Schätzfunktionen dar. In einer sehr diversen Population ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Typus mehr als 1mal aufgenommen wird, entsprechend gering. Die meisten Typen werden häufig von nur einem Vertreter repräsentiert. In einer Population mit geringem Differenzierungsgrad werden demgemäß die selben Typen im Verhältnis zur Probenzahl häufiger detektiert. In dieser Arbeit wurden für die Abschätzung der totalen Artenvielfalt 2 nicht-parametrische Methoden angewandt, wobei die Kalkulationen mithilfe der Software SDR IV durchgeführt wurden.

Chao 1

Diese Schätzmethode bezieht den Anteil von Typen oder Arten, die mehrfach detektiert wurden, im Verhältnis zu den nur 1mal detektierten Typen in die Kalkulation mit ein (Chao 1984). Dabei wird die totale Artenvielfalt mit

$$S_{Chao\ 1} = S_{obs} + \frac{n_1^2}{2n_2}$$

berechnet, wobei

S_{obs} = Anzahl der detektierten Typen

n_1 = Anzahl der Typen, die nur 1mal detektiert wurden

n_2 = Anzahl der Typen, die 2mal detektiert wurden.

Chao ACE

Ein weiterer, auf Typenabundanz basierter Berechnungsansatz, bezieht die Anzahl derjenigen Typen mit ein, die bis zu 10mal detektiert wurden. Diese als Chao ACE (Abundance-based Coverage Estimator) bezeichnete Schätzfunktion wird unter Einbeziehung des Korrekturfaktors γ_{ACE} berechnet mit

$$S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{F_1}{C_{ACE}} \gamma_{ACE}^2$$

S_{abund} = Typen mit einer Abundanz > 10

S_{rare} = Typen mit einer Abundanz ≤ 10

$$C_{ACE} = 1 - \frac{F_1}{N_{rare}}$$

F_1 = Anzahl der Arten mit i Vertretern und

$$N_{rare} = \sum_{i=1}^{10} iF_i$$

Schließlich wird anhand der Berechnung des folgenden Koeffizienten die Varianz von F_i miteinbezogen

$$\gamma_{ACE}^2 = \max \left[\frac{S_{rare} \sum_{i=1}^{10} i(i-1)F_i}{C_{ACE} (N_{rare})(N_{rare} - 1)} - 1, 0 \right]$$

2.2.6 Methoden zur Beschreibung von neuen *Listeria* Spezies

2.2.6.1 Untersuchungen zu Morphologie und Phänotyp

Zur Charakterisierung von neuartigen *Listeria* Spezies wurden folgende morphologische, phäno- und genotypische Untersuchungen durchgeführt. In der Regel wurden dafür die Isolate auf TS Agar kultiviert und bei 30 °C 48 h bebrütet. Zur Bestimmung morphologischer Eigenschaften wurden die Zellen in BHI Bouillon angezüchtet und bei 30 °C bebrütet. Die Bestimmung der Zellgrößen erfolgte nach 24 h Bebrütung in Flüssigkultur an einem Leitz Laborlux S Mikroskop und einer Leica DFC 280 Fotokamera unter Zuhilfenahme eines Objektmikrometers (Wild). Dazu wurden die Zellen bei der Vergrößerung 1,6 x 520 fotografiert und mit Hilfe einer Skala entsprechender Auflösung die Zellgrößen bestimmt. Von jeder untersuchten Spezies wurden 100 Zellen vermessen.

Zur Bestimmung des Wachstumstemperaturbereiches wurden die Isolate auf TS Agar angeimpft und bei 4, 15, 22, 27, 30, 37, 42 und 44°C bebrütet. Die Katalase-Aktivität wurde mit Hilfe von 3 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung und der Oxidase Test anhand von kommerziellen Teststäbchen (Oxoid) gemäß Herstellerangabe getestet. Die Mobilität der Keime wurde bei unterschiedlichen Temperaturen (15, 22, 30 und 37°C) in BHI Medium mit 0,2 % Agar untersucht. Der Einfluss vom pH Wert in der Nährlösung wurde bei 30 °C in einem Bereich von 3 - 5 und 7 - 9 und die Salztoleranz in BHI Medium bei 10 und 20 % NaCl-Gehalt getestet. Die hämolytische Aktivität der Keime wurde in BHI Medium mit suspendierten Erythrozyten aus Schafsblut untersucht. Anaerobes Wachstum wurde durch Anzucht der Isolate auf TS Agar in einem Anaerobentopf (Oxoid) getestet, wobei anaerobe Bedingungen durch die Verwendung von Anaerocult A (Merck) hergestellt wurden. Zur biochemischen Charakterisierung der Keime wurden die kommerziellen Teststreifen API *Listeria* und API 50CH (bioMérieux) laut Herstellerangabe verwendet. Der Methylrot- und Voges-Proskauer-Test wurde wie bei Seeley et al. bzw. Gerhardt et al. beschrieben durchgeführt (Gerhardt, Murray et al. 1994; Seeley, VanDemark et al. 1997). Der Abbau von Nitrat zu Nitrit wurde in PC Bouillon mit 0,1 % KNO₃ und 0,17 % Agar unter Zugabe von Reagenz A und Reagenz B (siehe Medienliste) getestet (Seeley, VanDemark et al. 1997). Als Positivkontrolle wurde *E. coli* und als Negativkontrolle *B. sphaericus* mitgeführt.

Folgende Untersuchungen wurden vom Identifikationsservice der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) durchgeführt:

- Bestimmung von G+C Gehalt anhand von HPLC Analysen (Cashion, Holder-Franklin et al. 1977; Tamaoka and Komagata 1984; Mesbah, Premachandran et al. 1989)
- Analyse der Quinone erfolgte durch Dr. B. Tindall, Identifizierungsdienst DSMZ (Altenburger, Kampfer et al. 1996)
- Aufbau der Peptidoglycanstruktur (Rhuland, Work et al. 1955)
- Isolierung und Aufreinigung von DNA für DNA-DNA Hybridisierungsanalysen (De Ley, Cattoir et al. 1970; Cashion, Holder-Franklin et al. 1977) unter Berücksichtigung der Modifikationen nach Huss et al. (Huß, Festl et al. 1983)
- Analyse der zellulären Fettsäuren (Verbarg, Fruhling et al. 2008).

2.2.6.2 Sequenzierung von weiteren Genloci

Die Ähnlichkeiten der Isolate wurden anhand von Sequenzanalysen der 16S rDNA Gesamtsequenz sowie von aneinandergelagerten Sequenzfragmenten der Gene *prs*, *recA*, *sigB* und *groEL* bestimmt. Die 16S rDNA Sequenzen wurden wie unter „16S rDNA Sequenzierung“ beschrieben hergestellt. Die für die Amplifikation der weiteren Genfragmente verwendeten Primersequenzen sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Gen	Primer	Primersequenz 5'→3'
<i>prs</i>	prs 3F prs 3R	TYAAYATTGAAGAAAGTATCCG GYTTRTCAATRATHGCRATYGGYGC
<i>recA</i>	recA 2F recA 2R	TGATCGTCAAGYRGCHTTAGAYCA TGHGMRTCDCCCATYTGCCTTC
<i>sigB</i>	sigB 2F sigB 2R	ATYGCMNGHAARTATTCYCAAGG GAYACRTGCATTTGHGAWATATC
<i>groEL</i>	HSP60 F HSP60 R	GAATTCGAIIIIIGCIGGIGA(TC)GGIACIACIAC CGCGGGATCC(TC)(TG)(TC)(TG)ITCICC(AG)AAICCGGIGC(TC)TT

Tab 2.2 Ausgewählte Gen-Loci mit Primersequenzen für die Sequenzierung von housekeeping genes (*prs* und *recA*) und Stressresistenzgenen (*sigB* und *groEL*).

Die PCR Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt. Die Ansätze enthielten 1 µl unverdünntes Probenlysat, 3 µl 10 x PCR Puffer IV, 1 mM dNTP Mix, 2 mM MgCl₂ (alle Reagenzien von Thermo Fisher Scientific), 12,5 pmol von jedem Primer sowie 0,5 µl Taq Polymerase (Abgene). Für die Amplifikation der Fragmente *prs*, *recA* und *sigB* lautete das PCR Protokoll: initiale Denaturierung bei 95 °C für 1 min, 30 Zyklen bei 95 °C für 20 s, 50 °C für 30 s und 72 °C für 1min. Der finale Syntheseschritt erfolgte 72 °C für 5 min. Die Reaktionsansätze für *groEL* wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter Verwendung von 1 µl unverdünnter Template-DNA, 25 µl Puffer A (FailSafe™ PreMix Selection Kit, Epicentre Biotechnologies) 2 µl 5 mM dNTPs (Thermo Fisher Scientific), 50 pmol von jedem Primer sowie 0,5 µl Taq Polymerase. Das PCR Protokoll für die Amplifikation von *groEL* lautete: initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min, 40 Zyklen bei 94 °C für 1min, 50 °C für 2min und 72 °C für 5 min. Der finale Syntheseschritt fand bei 72 °C für 10 min statt. Die Amplifikate wurden auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft und mit Hilfe eines DNA-Reinigungskits (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden Deutschland) gereinigt bzw. aufkonzentriert. Anschließend wurden die Proben von einem externen Sequenzierservice analysiert (GATC Konstanz bzw. Agowa Berlin).

Die DNA Sequenzen wurden zusammen mit Sequenzen von *Listeria*-Typstämmen aus der Internetdatenbank NCBI BLAST unter Verwendung der Software CLUSTAL_X 2.0 (Thompson, Gibson et al. 1997) bündig angeordnet. Anschließend wurden Distanzmatrices zwischen den einzelnen Sequenzen mit Hilfe der Software Treecon (Van de Peer and De Wachter 1997) kalkuliert. Nach Korrektur der Sequenzdistanzen nach Jukes und Cantor und Anwendung des Algorithmus Neighbour Joining (Saitou and Nei 1987) wurden unter 500facher Stichprobenwiederholung Dendrogramme mit dem Typstamm der Spezies *Brochothrix thermosphacta* als Außengruppe generiert.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich von selektiven Anreicherungsmedien

Um die Effektivität verschiedener Medien zur selektiven Anreicherung von Listerien aus Umweltproben zu untersuchen, wurden die drei Anreicherungsmedien 1/2 Fraser Bouillon (Sifin), ONE Broth (Oxoid) und UVM II Broth (Oxoid) eingesetzt. Die untersuchten Matrices waren Sediment und *R. fluitans* und stammten aus einem Fließgewässer (Moosach beim Veitshof in Freising). Sedimentproben wurden bis zu einer Tiefe von etwa 5 cm entnommen und mit Hilfe von Einweghandschuhen in sterile Plastikbeutel gegeben. Der wässrige Überstand wurde abgegossen. Wasserpflanzenproben wurden mit Einweghandschuhen entnommen und in sterilen Plastikbeuteln transportiert. Die Proben wurden bei Umgebungstemperatur ins Labor gebracht und umgehend bearbeitet.

Zur Bestimmung der MPN Keimzahl wurden die Proben im 5fachen Ansatz untersucht. Dazu wurden von den beiden Proben jeweils 5 x 10 g, 5 x 1 g und 5 x 0,1 g Probenmaterial in den drei Selektivmedien angereichert. Ziel der Untersuchung war der Vergleich der Medien in Bezug auf die Detektion der *Listeria*-KZ sowie in Bezug auf die Detektion von Spezies und Subspezies. Von jeder positiv getesteten Anreicherung wurden (sofern vorhanden) 5 präsumtive Kolonien gepickt und auf TS Agar bei 30 °C 48 h subkultiviert. Die Isolate wurden mit Hilfe von FTIR-Spektroskopie bzw. Multiplex PCR identifiziert und mittels HCA von FTIR-Spektren sowie RAPD subtypisiert. Die Auswertung der RAPD Bandenprofile erfolgte mit Hilfe der Software TL120 (biostep). Die Sensitivität der beiden Typisierungsmethoden wurde anhand der Kalkulation von Diversitätsindizes nach Simpson (Hunter and Gaston 1988) verglichen.

3.1.1 Keimzahlen MPN / 10 g

Aus beiden Habitaten (Sediment und *R. fluitans*) konnten mit allen drei Selektivmedien Listerien angereichert werden. Die dabei im 5fachen MPN Ansatz ermittelten Keimzahlen sind in Abb. 3.1 dargestellt. Der mit ONE Broth bestimmte MPN Titer von Sediment lag bei 0,5 / 10 g. Ansonsten waren die ermittelten *Listeria*

MPN Titer mit 35 (1/2 Fraser Bouillon) bzw. 54 / 10 g (UVM II Medium) in der Sedimentprobe und 92 (1/2 Fraser Bouillon), 54 (ONE Broth) und 35 / 10 g (UVM II) in der *R. fluitans*-Probe recht ähnlich.

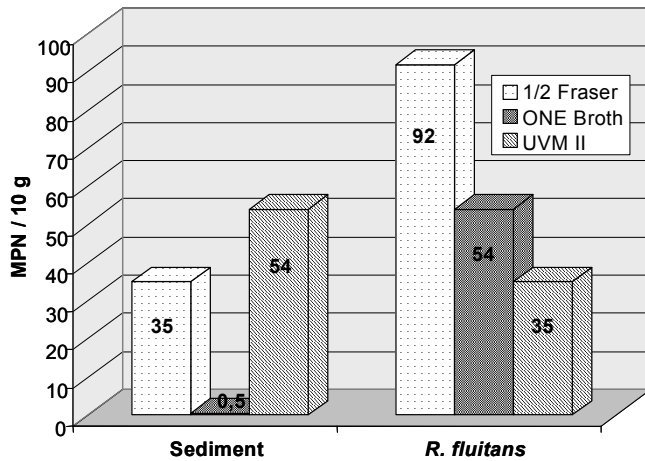


Abb. 3.1 Vergleich von selektiven Anreicherungsmedien für die Bestimmung der Keimzahlen von *Listeria* (MPN / 10 g) in Sediment und auf *R. fluitans*.

3.1.2 Detektion von *Listeria* Spezies

Von jedem positiv getesteten MPN Ansatz wurden bis zu 5 Kolonien gepickt, identifiziert und typisiert. Von der Sedimentprobe wurden insgesamt 123 und von der *Ranunculus* Probe 180 Isolate differenziert. Mit allen drei Anreicherungsmedien konnten aus beiden Matrices die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri* nachgewiesen werden (Abb. 3.2).

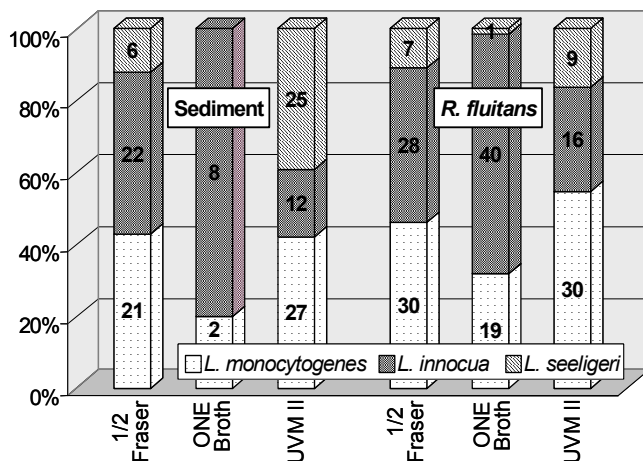


Abb. 3.2 Prozentuale Anteile von *Listeria* Arten, die mit Hilfe von unterschiedlichen Selektivmedien aus Sediment und *R. fluitans* isoliert wurden. Die Ziffern in den Balken geben die absolute Anzahl der untersuchten Isolate wieder.

Anhand ONE Broth waren bei der Sedimentprobe insgesamt nur 2 der fünf 10-g-Ansätze positiv getestet worden, weshalb nur 10 Isolate aus diesem Ansatz

untersucht wurden. In Tab. 3.1 ist die Anzahl der jeweils untersuchten Isolate aus den unterschiedlichen Anreicherungsmedien aufgelistet. Die Auflistung gibt die Differenzierungsergebnisse von Multiplex PCR und 16S Sequenzierung wider, da beobachtet werden konnte, dass die Identifizierung mit Hilfe von FTIR-Spektroskopie nicht bei allen Isolaten eindeutig bzw. zutreffend war.

Während aus den ONE Broth-Anreicherungen in beiden Matrices hauptsächlich *L. innocua* isoliert wurde (80 % in Sediment und 66 % in *R. fluitans*), war die Verteilung der Spezies aus ½ Fraser- und UVM II-Anreicherungen speziell in der *R. fluitans*-Probe recht ähnlich (Abb. 3.2). In der Sedimentprobe konnte sowohl mit ½ Fraser Bouillon als auch mit UVM II Medium *L. monocytogenes* zu je sehr ähnlichen Anteilen isoliert werden. Beim ½ Fraser Medium war der Anteil an *L. innocua* Isolaten (45 %) höher als bei der UVM II Anreicherung (19 %). Bei den Isolaten aus UVM II Medium war der Anteil an *L. seeligeri* höher (39 % gegenüber 12 % bei den Isolaten aus ½ Fraser).

3.1.3 Diversität von *Listeria* Isolaten aus unterschiedlichen Anreicherungsmedien

3.1.3.1 FTIR-Clusteranalyse

Die Subtypisierung von Isolaten innerhalb einer Spezies kann anhand der Distanzberechnung zwischen FTIR-Spektren erfolgen und mit Hilfe von einem Dendrogramm visuell dargestellt werden. Zur Kalkulation der Distanzen können dabei unterschiedliche mathematische Ansätze wie Average Linkage oder Ward's Algorithmus angewendet werden. Die Wahl des angewandten Algorithmus beeinflusst die Darstellung eines Dendrogrammes entscheidend (Wenning, Scherer et al. 2008). Prinzipiell zeichnen sich sehr ähnliche FTIR-Spektren durch eine geringe spektrale Distanz aus und clustern deshalb in einem Dendrogramm entsprechend eng. Dadurch kann die Differenzierung selbst von Subtypen innerhalb einer Spezies möglich sein.

In dieser Arbeit wurden von jedem Isolat jeweils mindestens 2 FTIR-Spektren aufgenommen und die Spektren anhand von Clusteranalysen klassifiziert, wobei die Cluster unter Verwendung des Algorithmus Average Linkage erstellt wurden. In Abb.

3.3 ist das Dendrogramm von *L. innocua* Isolaten aus den UVM II Anreicherungen der Sedimentprobe mit der Gruppierung in Subtypen dargestellt.

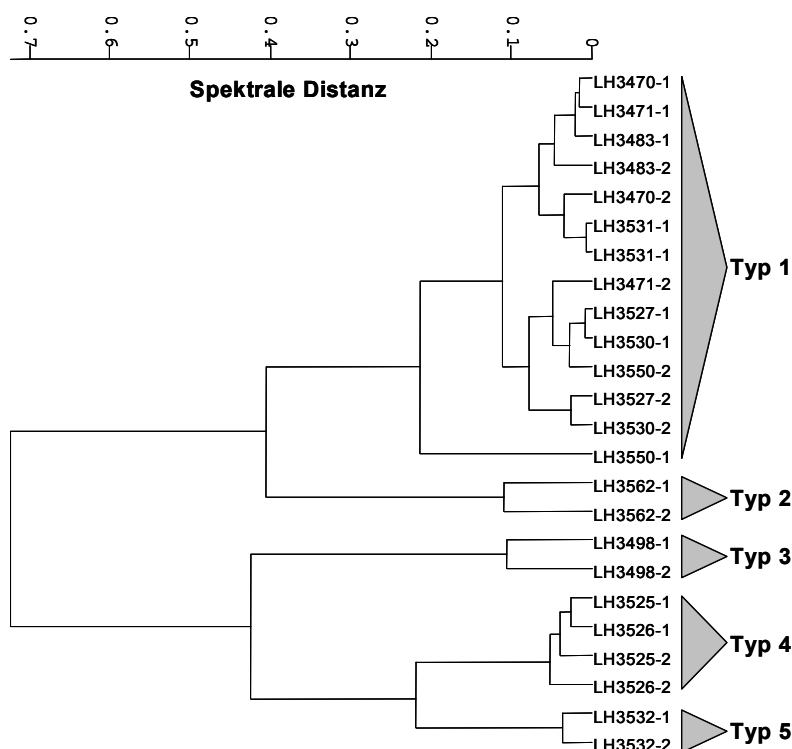


Abb. 3.3 FTIR-Dendrogramm von *L. innocua* Isolaten aus den UVM II Anreicherungen der Sedimentprobe.

In Tab. 3.1 ist aufgelistet, wie viele FTIR-Typen je Matrix und Anreicherungsmedium bei den verschiedenen *Listeria* Spezies bei einer cut off Distanzgrenze von 0,1 differenziert werden konnten.

3.1.3.2 RAPD Typisierung

Die RAPD Bandenprofile der Doppelbestimmungen waren nahezu immer identisch. Bei den wenigen Proben, deren Bandenmuster unterschiedlich waren, wurde die Analyse wiederholt. Die detektierten RAPD Profile waren speziesspezifisch, d. h. keines der Profile war unterschiedlichen *Listeria* Spezies gemein. In Abb. 3.4 sind exemplarisch die 9 *L. monocytogenes* RAPD Typen dargestellt, die aus ½ Fraser Bouillon von *R. fluitans* isoliert wurden.

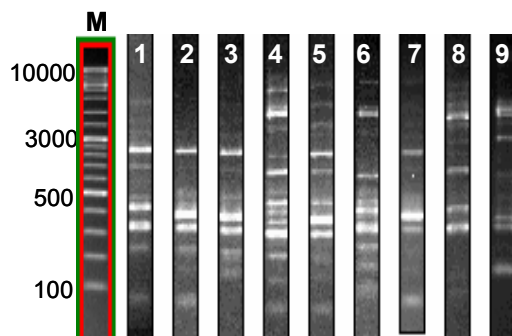


Abb. 3.4 *L. monocytogenes* RAPD-Typen von *R. fluitans* aus 1/2 Fraser Anreicherungen.

In Tab. 3.1 ist die Anzahl der untersuchten Isolate je Habitat und Spezies und die jeweils detektierte Anzahl an RAPD Typen aufgelistet.

Medium	Spezies	Anzahl Isolate		FTIR Typen		RAPD Typen	
		S	R	S	R	S	R
1/2 Fraser Medium	<i>L. monocytogenes</i>	21	30	4	3	8	9
	<i>L. innocua</i>	22	28	5	5	6	11
	<i>L. seeligeri</i>	6	7	3	3	4	4
ONE Broth	<i>L. monocytogenes</i>	2	19	1	4	2	9
	<i>L. innocua</i>	8	40	3	8	2	14
	<i>L. seeligeri</i>	0	1	0	1	0	1
UVM II Broth	<i>L. monocytogenes</i>	27	30	4	2	10	11
	<i>L. innocua</i>	12	16	5	5	4	3
	<i>L. seeligeri</i>	25	9	5	6	8	6

Tab. 3.1 Anzahl der untersuchten Isolate aus den unterschiedlichen Anreicherungsmedien und Anzahl der jeweils detektierten FTIR- und RAPD-Typen.

Lediglich bei 6 der 61 positiv getesteten Ansätze (ca. 10 %) zeigten alle gepickten Isolate identische RAPD Profile. In rund 75 % der Anreicherungen konnten 2 bis 4 Typen unterschieden werden und bei 9 Anreicherungen (ca. 15 %) zeigten alle gepickten Isolate einer Anreicherung unterschiedliche RAPD Profile. In 48 der positiv getesteten Anreicherungen (ca. 79 %) konnte mehr als eine *Listeria* Spezies nachgewiesen werden.

3.1.3.3 Vergleich der Typisierungsmethoden

Die Sensitivität einer Typisierungsmethode kann anhand der Ermittlung von Simpson Diversitätsindizes erfasst und auf diese Weise mit der diskriminativen

Fähigkeit weiterer Typisierungsmethoden verglichen werden (Hunter and Gaston 1988). Anhand FTIR-Clusteranalyse und RAPD Typisierung konnten bei den beiden untersuchten Proben unterschiedlich viele Typen detektiert werden, d. h. die Methoden waren unterschiedlich sensitiv. Die jeweils ermittelten Diversitätsindizes sind in Tabelle 3.2 gegenübergestellt, wobei die Kalkulation der Indizes speziesunabhängig, d. h. bezogen auf die gesamte Anzahl der detektierten Subtypen erfolgte. Generell konnten anhand der RAPD Methode mehr unterschiedliche Typen klassifiziert werden als anhand von FTIR-Clusteranalyse. Entsprechend unterschiedlich sind die Diversitätsindizes im direkten Vergleich. Lediglich bei den anhand ONE-Broth angereicherten Sedimentisolaten konnten bei der FTIR-Clusteranalyse geringfügig mehr unterschiedliche Typen definiert werden ($D = 0,777$ gegenüber $D = 0,733$ bei RAPD Typisierung). Insgesamt jedoch war die RAPD Typisierung bei den hier untersuchten Isolaten die eindeutig sensitivere Methode.

Diversitätsindizes D	Sediment		<i>R. fluitans</i>	
	FTIR	RAPD	FTIR	RAPD
½ Fraser Medium	0,903	0,938	0,709	0,943
ONE Broth	0,777	0,733	0,890	0,933
UVM II Broth	0,857	0,938	0,793	0,911

Tab. 3.2 Gegenüberstellung der anhand von FTIR- und RAPD-Typisierung ermittelten Simpson Diversitätsindizes je Habitat und Anreicherungsmedium. Die Indizes wurden speziesunabhängig je Medium berechnet.

3.1.3.4 Vergleich der Anreicherungsmedien

Insgesamt wurden rund 64 % der RAPD Typen nur bei einem der 3 Anreicherungsmedien nachgewiesen, während ca. 16 % der Typen bei allen 3 Medien detektiert werden konnten. Die verbleibenden rund 20 % der Typen waren aus unterschiedlichen Kombinationen von 2 Medien isoliert worden. Dies kann auf eine Korrelation zwischen der Anreicherung von Subtypen und der Selektivität des jeweiligen Anreicherungsmediums hindeuten. Allerdings waren 29 der Profile (rund 43 %) nur 1mal nachgewiesen worden, weshalb diese recht große Fraktion zwangsläufig mit dem jeweiligen Anreicherungsmedium in Zusammenhang stand.

Von den singulären Typen waren 12 (ca. 41 %) aus ½ Fraser Bouillon, 9 aus ONE Broth (ca. 31 %) und 8 (ca. 28 %) aus UVM II Medium nachgewiesen worden. Insofern kamen einzelne Typen bei allen 3 Medien relativ ähnlich oft vor. Es kann daher nicht geschlossen werden, ob ein bestimmtes Medium die Akkumulation von bestimmten Typen begünstigt.

3.2 Prävalenz und Diversität von *Listeria* über einen jahreszeitlichen Verlauf

Ziel dieser Studie war die Untersuchung von Vorkommen und KZ von Listerien über einen jahreszeitlichen Verlauf. Dazu wurden in monatlichen Abständen an 3 Standorten Wasser-, Sediment- und Wasserpflanzenproben untersucht, wobei Sedimentproben bis zu einer Tiefe von etwa 5 cm entnommen wurden. Zusätzlich wurden von 5 Probenahmezeitpunkten Isolate der Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri* RAPD typisiert. Die Probenahmeorte waren 2 Fließgewässer (die Moosach bei Freising, ein Seitenarm der Isar im Landkreis Freising sowie die Wolnzach in Wolnzach, ein Seitenarm der Ilm) sowie ein Standgewässer (der Postweiher bei Wolnzach). Die beiden letzteren Probenahmeorte lagen im Landkreis Pfaffenhofen. Der Probenahmeort Moosach war umgeben von Grünflächen, die seit etwa 15 Jahren nicht mehr beweidet worden waren, während auf einer angrenzenden Wiese am Fließgewässer Wolnzach in den Sommermonaten Rinder gehalten wurden. An den Probenahmeort Postweiher grenzten ein bebautes Privatgrundstück, eine Nebenverkehrsstraße sowie ein Sportplatz an. Dieser Weiher wurde von zwei unterirdischen Quellen gespeist. Die Wasserstandtiefen an diesem Gewässer waren über den jahreszeitlichen Verlauf sehr variabel, so dass an mehreren Zeitpunkten die Beprobung von Sediment nicht möglich war.

Die untersuchte Pflanzenmatrix von den beiden Fließgewässern war ausschließlich *Ranunculus fluitans* während die Flora am Probenahmeort Postweiher den jahreszeitlichen Vegetationsperioden entsprechend variierte. Daher bestand das untersuchte Pflanzenmaterial aus den Arten *Lemna trisulca* und *Ceratophyllum* im Oktober und Juli, *Lemna trisulca* im April, Juni, August und September, *Mentha x piperita* im Februar und März, *Carex spec.* im Januar und *Nymphaeaceae* im Mai. Bei jeder Probenahme wurde die Wassertemperatur gemessen und an zwei Probenahmen der pH-Wert von Sediment und Wasser von der Probenahmestelle

Moosach gemäß den Methoden nach VDLUFA bestimmt (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten).

Über die 12 monatige Probenahmeperiode lag die Temperatur bei den Fließgewässern zwischen 6 °C in den Wintermonaten und 14 °C in den Sommermonaten. Das Gewässer Postweiher war in den Monaten Januar und Februar zugefroren und erreichte in den Sommermonaten eine Temperatur von 18 °C (Abb. 3.5). Die ermittelten pH-Werte in den Habitaten Sediment und Wasser waren an beiden Untersuchungszeitpunkten sehr ähnlich und betragen $7,80 \pm 0,03$ bei den Wasserproben und $7,49 \pm 0,02$ bei den Sedimentproben.

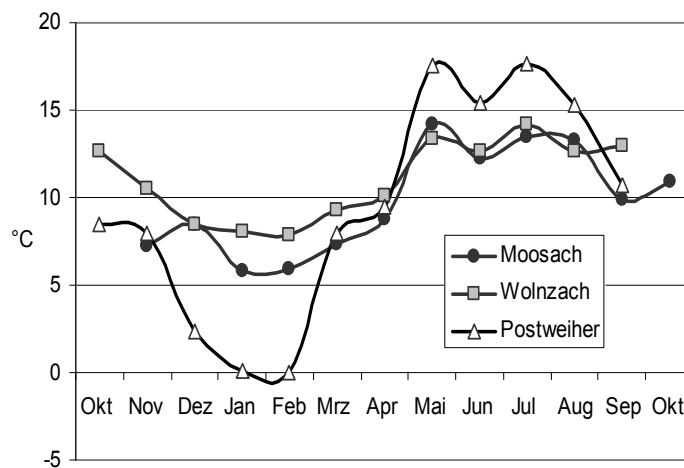


Abb. 3.5 Gewässertemperaturen an 3 Probenahmestellen über einen jahreszeitlichen Verlauf

Insgesamt wurden 36 Wasser-, 30 Sediment- und 30 Wasserpflanzenproben untersucht. Von allen Proben wurden die MPN Keimzahlen im 3fachen Ansatz (3 x 10 g, 3 x 1 g und 3 x 0,1 g) unter Verwendung von $\frac{1}{2}$ Fraser Bouillon als Anreicherungsmedium bestimmt, wobei Pflanzenproben mit Hilfe von einem Ultraturaxstab (Janke Kunkel) zerkleinert wurden. Von jedem positiv getesteten Ansatz wurden präsumtive Kolonien auf TS Agar subkultiviert. Die Bestätigung der Isolate erfolgte in der Regel unter Begutachtung im Schräglicht nach Henry. Atypische Isolate wurden mikroskopisch und durch Ausstrich auf LAOA Agar begutachtet. Die Spezies der *Listeria*-Isolate aus den Matrices Sediment und Wasserpflanzen wurden mit Hilfe von Multiplex PCR und 16S rDNA Sequenzierung bestimmt. Des Weiteren wurden Isolate ausgewählter Probenahmen RAPD subtypisiert. Dazu wurden *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri* Isolate von

den Standorten Moosach und Wolnzach ausgewählt, die zum selben Probenahmezeitpunkt aus Sediment und *R. fluitans* isoliert worden waren.

3.2.1 Vorkommen und MPN Keimzahlen

Die Probenahme fand an der Moosach von November 2007 bis September des Folgejahres statt. Die Standorte Wolnzach und Postweiher wurden von Oktober 2007 bis September 2008 beprobt. Insgesamt konnten 27 Sedimentproben (90 %), 26 Wasserpflanzenproben (84 %) und 24 Wasserproben (67 %) positiv auf das Vorhandensein von Listerien getestet werden (Tab. 3.3).

Probenahmeort	Sediment (S)		Wasserpflanzen (WP)		Wasser	
	Anzahl Proben	<i>Listeria</i> positiv	Anzahl Proben	<i>Listeria</i> positiv	Anzahl Proben	<i>Listeria</i> positiv
Moosach	12	11	12	10	12	11
Wolnzach	12	11	9	9	12	10
Postweiher	6	5	10	7	12	3
gesamt	30	27	31	26	36	24

Tab. 3.3 Anzahl von untersuchten und *Listeria* positiv getesteten Sediment-, Wasserpflanzen- und Wasserproben aus 3 Standorten.

Verglichen mit den *Listeria* positiven Wasserproben der beiden Fließgewässer (92 % bzw. 83 %), war das Vorkommen der Zielkeime in den Wasserproben des Standgewässers mit 25 % relativ gering (Abb. 3.6). Im Durchschnitt wurden 87,5 % der Moosach-Proben, 96 % der Wolnzach-Proben und 80,5 % der Postweiher-Proben *Listeria*-positiv getestet.

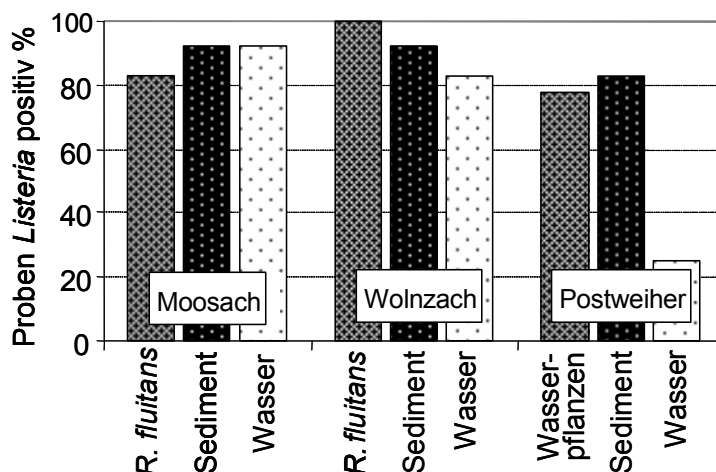


Abb. 3.6 *Listeria* positiv getestete Proben (%) von 3 Probenmatrices aus 3 Standorten.

Die ermittelten MPN Keimzahlen von *Listerien* in den Matrices Sediment, Wasserpflanzen und Wasser sind in Tab. 3.4 aufgelistet. Bei insgesamt 8 Proben konnten keine *Listerien* nachgewiesen werden (MPN < 0,3 / g).

Matrix	Standort	MPN / g												
		Okt	Nov	Dez	Jan	Feb	Mar	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt
Sediment	Moosach	n. u.	15	24	21	4,3	4,3	2,3	9,3	<0,3	46	4,3	15	0,7
	Wolnzach	0,7	2,1	0,9	15	0,7	0,4	<0,3	0,9	7,5	>110	46	110	n. u.
	Postweiher	0,4	>110	<0,3	>110	n. u.	n. u.	4,3	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	46	n. u.
Wasserpflanzen	Moosach	n. u.	24	2,3	15	<0,3	2,3	21	3,6	0,9	4,3	2,1	<0,3	110
	Wolnzach	46	>110	9,3	n. u.	n. u.	n. u.	21	15	93	>110	>110	46	n. u.
	Postweiher	>110	n. u.	n. u.	4,3	<0,3	15	<0,3	<0,3	2,0	24	15	24	n. u.
Wasser	Moosach	n. u.	46	4,3	2,3	<0,3	9,3	0,4	0,9	0,4	1,5	0,3	0,7	46
	Wolnzach	0,9	9,3	<0,3	24	0,4	<0,3	0,4	0,9	0,4	9,3	4,3	2,3	n. u.
	Postweiher	<0,3	4,3	<0,3	4,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	2,3	<0,3	n. u.

n. u. nicht untersucht (entweder waren Pflanzenmatrices nicht verfügbar oder Sediment aufgrund von zu hohen Wasserständen nicht zugänglich)

Tab. 3.4 Keimzahlen MPN / g von *Listeria* in den Habitaten Sediment, Wasserpflanzen und Wasser von zwei Fließgewässern (Moosach und Wolnzach) und einem Standgewässer (Postweiher) über einen jahreszeitlichen Verlauf.

Bei den meisten Proben lagen die ermittelten *Listeria*-Keimzahlen relativ konstant zwischen < 0,3 und 46 MPN / g. Allerdings konnten auch an einigen Probenahmezeitpunkten in Sediment- und Wasserpflanzenproben Keimzahlen von > 110 MPN / g detektiert werden. Derart hohe Titer konnten bei den getesteten Wasserproben über den Jahresverlauf dagegen nie nachgewiesen werden.

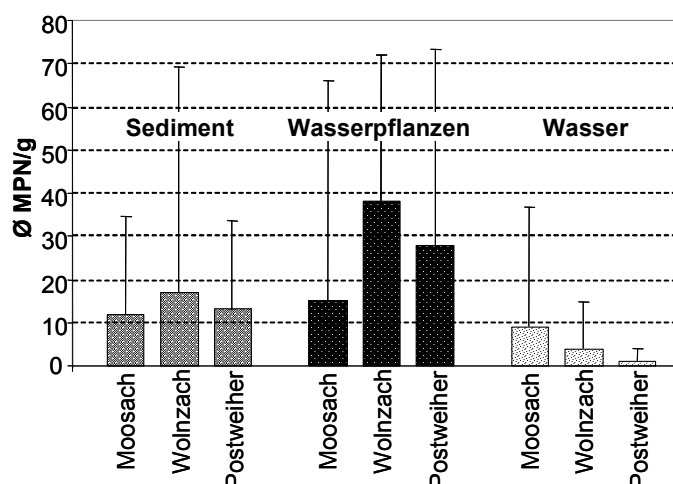


Abb. 3.7 Durchschnittliche MPN Keimzahlen in den Habitaten Wasserpflanzen, Sediment und Wasser von 3 Standorten über einen jahreszeitlichen Verlauf bei monatlicher Probenahme.

Aufgrund dieser sporadisch sehr hohen Keimzahlen waren die ermittelten Standardabweichungen speziell im Sediment und auf den Wasserpflanzen extrem hoch, weshalb die Keimzahlen keine konklusive Aussage darüber erlauben, ob in einem dieser getesteten Habitate die Prävalenz von *Listeria* im gesamten Jahresverlauf tatsächlich höher war. Bei den Wasserproben hingegen waren die Keimzahlen tendenziell über den gesamten Untersuchungszeitraum am niedrigsten (Abb. 3.7).

3.2.2 Speziesdifferenzierung von *Listeria*-Isolaten

Von allen positiv getesteten Proben wurden im Durchschnitt 20 präsumtive Kolonien identifiziert. Insgesamt wurden 531 Sediment-Isolate und 607 Isolate von *R. fluitans* bzw. Wasserpflanzen untersucht (Tab. 3.5). An allen Standorten konnten die Spezies *L. monocytogenes* (ca. 24 %), *L. innocua* (ca. 41 %), *L. seeligeri* (ca. 27,5 %), und einige Vertreter von neuen, noch nicht beschriebenen *Listeria* Spezies identifiziert werden (ca. 6 %). Aus Proben von der Wolnzach und dem Postweiher konnte zusätzlich *L. ivanovii* isoliert werden (ca. 1,5 %).

Probenahmeort	Anzahl Isolate		<i>Listeria</i> Spezies									
			<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. innocua</i>		<i>L. seeligeri</i>		<i>L. ivanovii</i>		neue Spezies	
	S	WP	S	WP	S	WP	S	WP	S	WP	S	WP
Moosach	234	213	62	74	138	123	32	14	0	0	2	2
Wolnzach	225	222	62	62	65	102	81	48	12	2	5	8
Postweiher	72	172	0	16	23	12	31	107	2	0	16	37
gesamt	531	607	124	152	226	237	144	169	14	2	23	47

Tab. 3.5 Anzahl von analysierten Isolaten aus Sediment S und Wasserpflanzen WP aus 3 Standorten sowie Anzahl von identifizierten *Listeria* Spezies.

Das Vorkommen von *Listeria* Spezies in den einzelnen Monaten ist in Abb. 3.8 dargestellt. Während in den beiden Fließgewässern die Spezies *L. innocua* und *L. monocytogenes* über den Beobachtungszeitraum konstant isoliert werden konnten und auch den dominanten Anteil der Listerienflora darstellten, waren die detektierten Listerienpopulationen im Standgewässer deutlich variabler. *L. seeligeri* konnte an allen 3 Standorten nachgewiesen werden und war beim Standgewässer die

überwiegende Art. *L. ivanovii* war nur an den Standorten Wolnzach und Postweiher mit einigen wenigen Vertretern nachgewiesen worden.

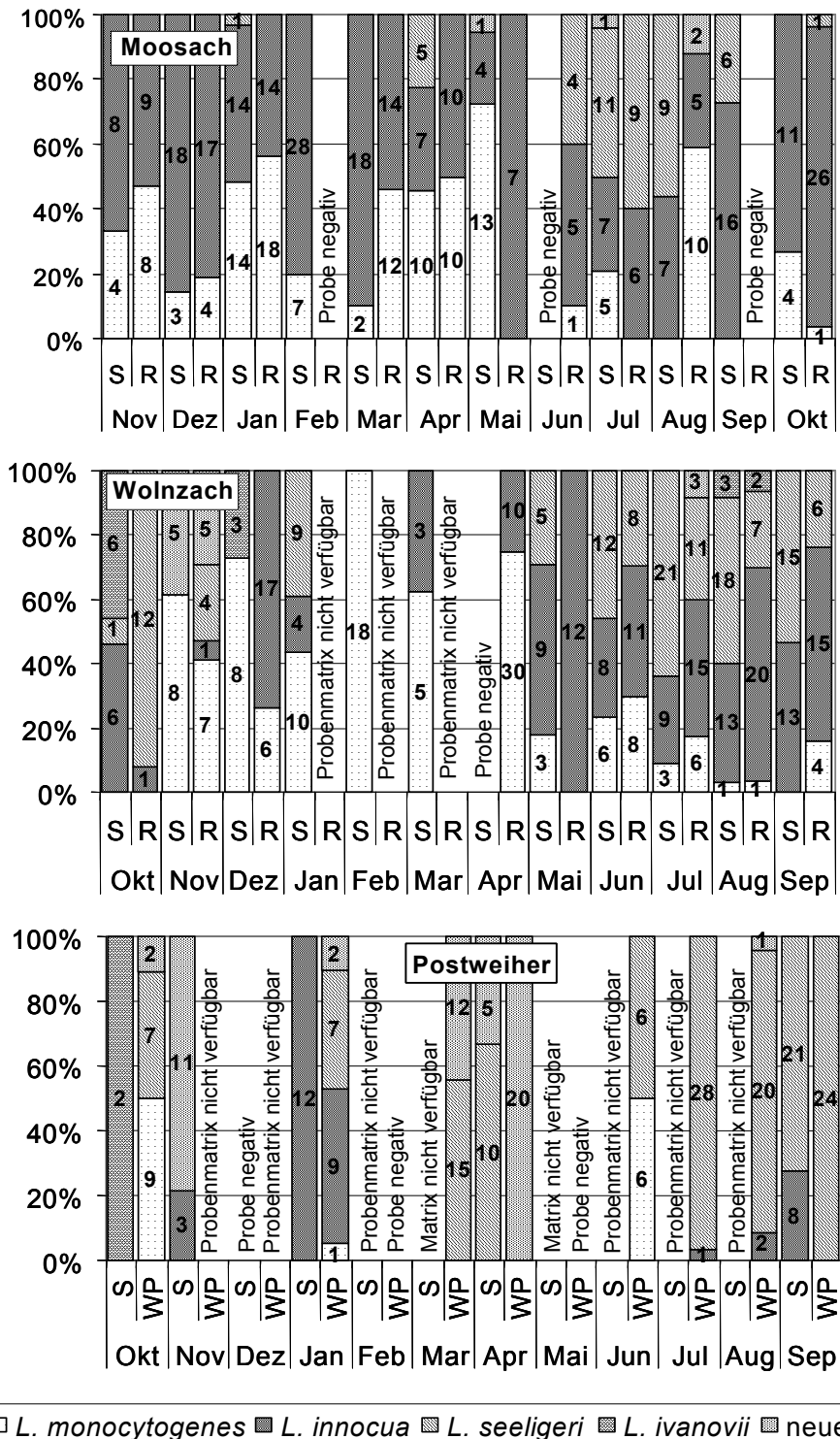


Abb. 3.8 Prozentuale Anteile von *Listeria* Spezies in den Habitaten Sediment und Wasserpflanzen an 3 Standorten über den Verlauf eines Jahres. Die Zahlen in den Balken beziffern die absolute Anzahl identifizierter Isolate.

Während bei den Sedimentproben der Fließgewässer *L. monocytogenes* häufig vertreten war, war diese Art in keiner der getesteten Sedimentproben des Standgewässers nachweisbar. Zudem konnten an allen 3 Standorten in jeweils beiden getesteten Matrices *Listeria* Keime nachgewiesen werden, die keiner bisher beschriebenen Spezies zugeordnet werden konnten.

3.2.3 Subtypisierung von *Listeria* Isolaten ausgewählter Probenahmen

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die durchschnittliche Verteilung von *Listeria*-Spezies in Sediment und auf *R. fluitans* insbesondere beim Probenahmeort Moosach sehr ähnlich war (Abb. 3.9). Daher wurde getestet, ob *Listerien*, die auf *R. fluitans* nachgewiesen wurden, ursprünglich aus dem Sediment stammten, aus dem die Pflanzen wachsen.

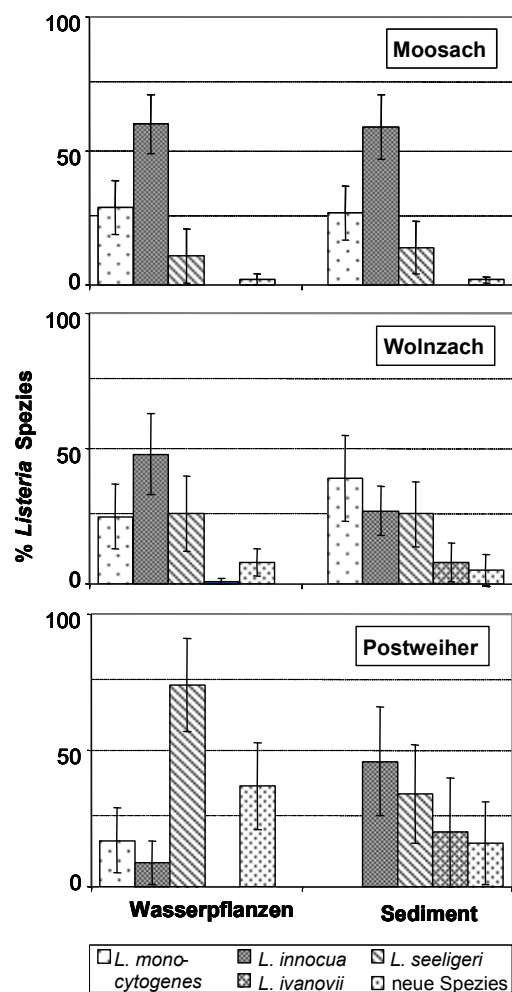


Abb. 3.9 Durchschnittliche Anteile von *Listeria* Spezies in den Habitaten Wasserpflanzen und Sediment von 3 Standorten bei einem Probenahmezeitraum von einem Jahr. Die Proben wurden in monatlichen Abständen untersucht.

Ein Teil der isolierten Keime wurde anhand von RAPD PCR subtypisiert, wobei Isolate von Probenahmen aus den beiden Fließgewässern ausgewählt wurden, die zum selben Zeitpunkt aus Sediment bzw. *R. fluitans* gewonnen worden waren. Die jeweiligen Probenpaarungen mit der Anzahl untersuchter Isolate und der Anzahl detektierter RAPD Typen sind in Tab. 3.6 aufgelistet.

Spezies	Standort	Datum	Isolate aus		RAPD Typen		RAPD Typen aus R und S
			R	S	R	S	
<i>L. monocytogenes</i>	Moosach	Jan 08	14	14	3	4	1
		Apr 08	10	10	2	3	0
	Wolnzach	Nov 07	7	4	1	2	1
		Jun 08	8	6	3	4	1
<i>L. innocua</i>	Moosach	Dez 07	16	18	7	12	4
		Mär 08	14	18	4	6	0
	Wolnzach	Aug 08	16	13	7	5	1
		Sep 08	15	13	2	1	1
<i>L. seeligeri</i>	Moosach	Jul 08	9	11	3	8	0
	Wolnzach	Jul 08	11	21	7	12	1

Tab. 3.6 Auswahl von Probenpaarungen, deren Isolate anhand von RAPD subtypisiert wurden. Aufgelistet sind jeweils die Anzahl untersuchter Isolate aus *R. fluitans* (R) und Sediment (S), die Anzahl detektierter RAPD Typen in den jeweiligen Proben und die Anzahl von identischen Typen, die zum selben Probenahmezeitpunkt aus beiden untersuchten Matrices isoliert worden waren.

Insgesamt wurden 248 Isolate mit Hilfe von RAPD subtypisiert. Bei den 73 *L. monocytogenes* Isolaten konnten 15, bei den 123 *L. innocua* Isolaten 32 und bei den 52 untersuchten *L. seeligeri* Isolaten 26 RAPD Typen differenziert werden. In Abb. 3.10 sind die Bandenmuster von *L. innocua* Isolaten dargestellt, die im März 2008 aus den Matrices Sediment und *R. fluitans* isoliert worden waren. Keiner der 10 RAPD Typen konnte bei beiden Habitaten nachgewiesen werden.

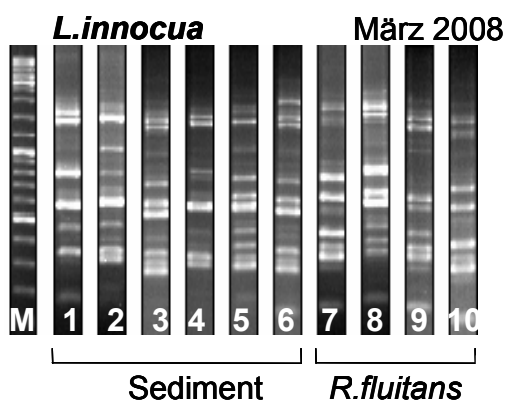


Abb. 3.10 RAPD Typen von *L. innocua* Isolaten, die zum selben Zeitpunkt am Standort Moosach aus Sediment und *R. fluitans* isoliert wurden. Profile 1 – 6 sind RAPD Typen aus Sediment, Profile 7 – 10 sind RAPD Bandenmuster von *R. fluitans* Isolaten.

In Abb. 3.11 sind die Bandenmuster von *L. monocytogenes* Isolaten abgebildet, die im Januar aus den Matrices Sediment und *R. fluitans* isoliert worden waren. Von den 6 detektierten RAPD Typen konnte ein Typus in beiden Habitaten nachgewiesen werden (Bandenprofil 5 und 6).

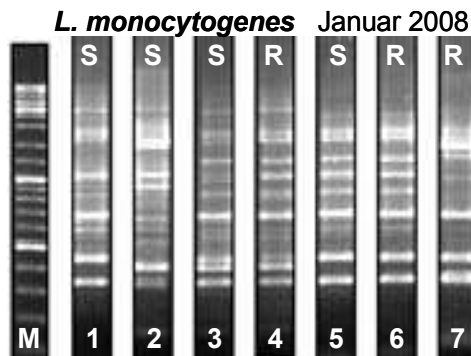


Abb. 3.11 RAPD Typen von zeitgleich aus Sediment und *R. fluitans* isolierten *L. monocytogenes* Isolaten. Profil 1 – 3 sind Isolate aus Sediment S, Profil 4 Isolat von *R. fluitans*, Profile 5 + 6 sind identische RAPD Typen aus Sediment bzw. *R. fluitans*, Profil 7 stammt von einem *R. fluitans* -Isolat.

3.3 Stratifikation von Sedimentproben

Bei diesen Versuchen sollte Vorkommen und Diversität von *Listeria* in unterschiedlichen Schichttiefen von Sediment untersucht werden. Dazu wurden an 2 Versuchstagen jeweils 2 Sedimentproben entsprechend fraktioniert und untersucht. Mithilfe von transparenten Zylindern aus Kunststoff (\varnothing ca. 10 cm) und Edelstahlplatten (ca. 12 x 20 cm) wurde Sediment aus einem Fließgewässer (Moosach) bis zu einer Tiefe von ca. 10 cm entnommen. Dazu wurde ein Zylinder im Sediment versenkt und mit Hilfe einer Edelstahlplatte von unten verschlossen, so dass eine definierte Sedimentsäule entnommen werden konnte. Anschließend wurde mit Hilfe weiterer steriler Edelstahlplatten durch Anheben des Zylinders das Probenmaterial in Schichtdicken von 1 bis 3 cm unterteilt. Von den einzelnen Strata wurde die Keimzahl im 3fachen MPN Verfahren bestimmt, wobei $\frac{1}{2}$ Fraser Bouillon als Anreicherungsmedium verwendet wurde. Von jedem positiv getesteten Ansatz wurden mindestens 5 präsumtive Kolonien gepickt und auf TS Agar subkultiviert. Die Isolate wurden anhand von Multiplex PCR bzw. 16S rDNA Sequenzierung identifiziert und über RAPD subtypisiert. Die Auswertung der Bandenprofile wurde mit Hilfe der Software TL120 (biostep) durchgeführt.

3.3.1 Keimzahlen MPN in unterschiedlichen Schichttiefen

Dadurch, dass die Beschaffenheit des Sedimentes in dem Fließgewässer überwiegend sandig war, war die Probenahme bzw. die Unterteilung in die verschiedenen Schichten gut durchführbar. In Tabelle 3.7 sind die ermittelten MPN Titer in den einzelnen Sedimentschichten aufgelistet.

Schichttiefe cm	Versuchstag 1		Versuchstag 2	
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
0 - 1	24	1,5	9,3	46
1 - 3	2,3	2,3	3,8	9,3
3 - 5	4,3	2,3	1,5	0,74
5 - 8	2,3	< 0,3	0,74	< 0,3
8 - 10	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3

Tab. 3.7 *Listeria* Keimzahlen MPN / 10 g Sediment unterschiedlicher Schichttiefe.

Die meisten Keime konnten in einer Schichttiefe bis etwa 1 cm nachgewiesen werden. In einer Tiefe von 1 – 5 cm waren bereits deutlich weniger und ab einer Tiefe von 8 cm waren keine *Listerien* mehr nachweisbar. In Abb. 3.12 sind die Ergebnisse der 4 Probenuntersuchungen zusammengefasst dargestellt.

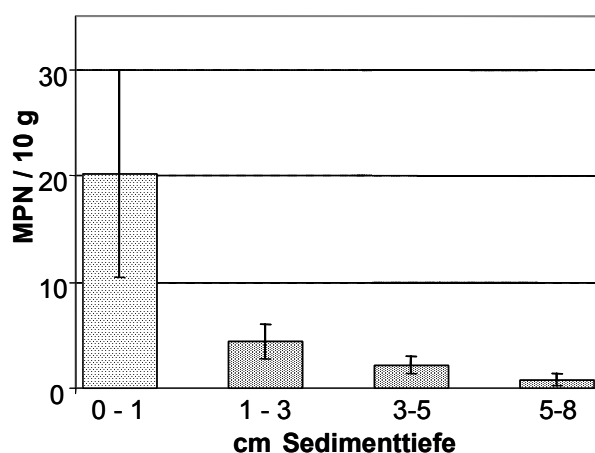


Abb. 3.12 MPN Keimzahlen in 10 g Sediment in den unterschiedlichen Schichttiefen. Stratifizierung von Sediment wurde 4fach durchgeführt.

3.3.2 Vorkommen von *Listeria* Spezies in unterschiedlichen Schichten

Insgesamt wurden 267 Isolate gepickt und identifiziert. Von der obersten Schicht wurden 123, von der zweiten 82, von der dritten 49 und von der untersten

positiv getesteten Schicht 13 Kolonien ausgewählt. Vierundzwanzig der Isolate (etwa 9 %) wurden als *L. monocytogenes* identifiziert, 133 (ca. 50 %) waren *L. innocua*, 79 waren *L. seeligeri* (rund 30 %) und 1 Isolat wurde als *L. grayi* identifiziert. Bei 30 Isolaten konnte weder mit Multiplex PCR noch mit API *Listeria* ein Identifizierungsergebnis erzielt werden. Der Abgleich der 16S rDNA Teilsequenzen in der NCBI BLAST Internetdatenbank schließlich ergab, dass es sich mit einer Ähnlichkeit von 94 – 95 % um Keime der Gattung *Listeria* noch nicht beschriebener Spezies handelte.

Bezüglich des Vorkommens von *Listeria* Spezies in den unterschiedlichen Strata wurde festgestellt, dass die Spezies *L. monocytogenes* und *L. innocua* bis zu einer Tiefe von maximal 5 cm isoliert werden konnten (Abb. 3.13). Das *L. grayi* Isolat war aus der obersten Sedimentschicht isoliert worden (nicht in Grafik 3.13 aufgeführt), während *L. seeligeri* in allen positiv getesteten Schichttiefen nachgewiesen wurde. Auch die noch nicht beschriebenen *Listeria* Spezies waren bis zu einer Tiefe von etwa 8 cm nachweisbar.

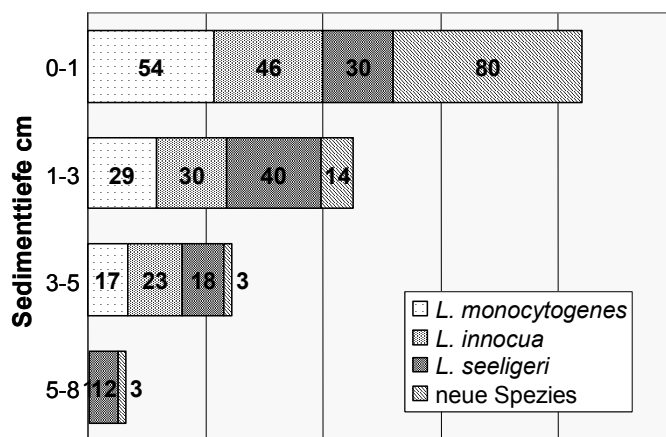


Abb. 3.13 Prozentuale Anteile von *Listeria* Spezies, die aus verschiedenen Schichttiefen isoliert wurden.

3.3.3 Subtypisierung von Isolaten aus unterschiedlichen Strata

Insgesamt konnten bei Subtypisierung der Isolate anhand von RAPD PCR 47 Typen unterschieden werden. Bei *L. innocua* konnten 20, bei *L. monocytogenes* 6, bei *L. seeligeri* 8 und bei den neuen Spezies 13 Typen unterschieden werden. Rund 51 % der Typen wurden lediglich 1- bzw. 2mal isoliert, während ca. 30 % öfter als 5mal identifiziert wurden. Sowohl Typen, die mehrfach vorkamen als auch Typen, die

nur 1mal aufgenommen wurden, konnten aus allen Schichttiefen isoliert werden. In Abb. 3.14 ist exemplarisch ein RAPD Profil von *L. seeligeri* Isolaten dargestellt, das in allen 4 positiv getesteten Sedimentfraktionen nachgewiesen wurde.

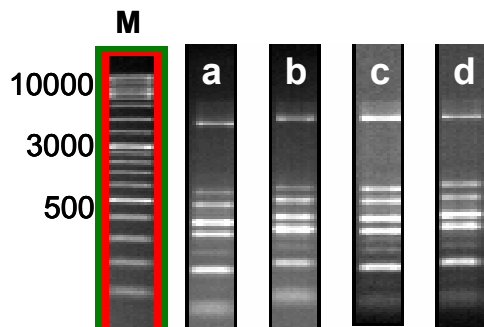


Abb. 3.14 RAPD Bandenmuster von *L. seeligeri* Isolaten aus unterschiedlichen Schichttiefen von Sediment: a 0-1 cm, b 1-3 cm, c 3-5 cm, d 5-8 cm.

3.3.4 Vergleich von Sedimentproben unterschiedlicher Probenahmen

Die 4 Proben wurden an zwei Versuchstagen an der selben Probenahmestelle einem Areal von etwa 1,5 m² in entnommen und untersucht, wobei das zeitliche Intervall 3 Wochen betrug. Innerhalb von einem Versuchstag unterschieden sich die Spezies-Anteile in den Proben jeweils nicht wesentlich, während die Anteile an detektierten Spezies an den beiden Untersuchungstagen z. T. verschoben waren. Während die Anteile an *L. monocytogenes* und *L. innocua* bei beiden Versuchstagen relativ ähnlich waren, waren die Anteile bei den Spezies *L. seeligeri* und neuen *Listeria* Spezies unterschiedlich (Abb. 3.15). *L. grayi* war bei einer Probe von Versuchstag 2 isoliert worden.

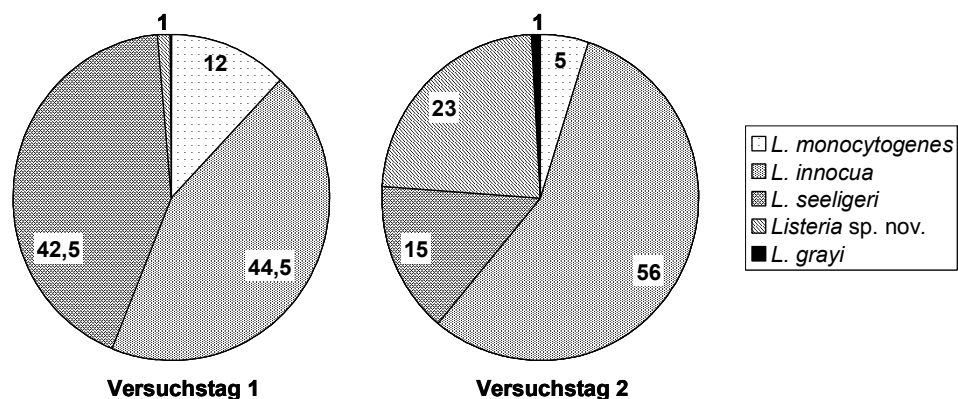


Abb. 3.15 Prozentuale Anteile (gerundet) von *Listeria* Spezies aus Sedimentproben, die an 2 Versuchstagen mit einem zeitlichen Abstand von 3 Wochen isoliert wurden.

Anhand RAPD Subtypisierung konnten Typen differenziert werden, von denen einige sowohl aus beiden Proben als auch an beiden Versuchstagen isoliert werden konnten (Tab. 3.8).

Versuchstag	Probe	Anzahl RAPD Typen	Anzahl von RAPD Typen, die bei beiden Proben nachgewiesen wurden	Anzahl von RAPD Typen, die an beiden Versuchstagen nachgewiesen wurden
1	1	22	9 (41 %)	12 (36 %)
	2	20		
2	3	19	8 (42 %)	
	4	15		

Tab. 3.8 RAPD Typisierung von Sedimentisolaten von 2 unterschiedlichen Versuchstagen. Alle *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* RAPD Typen konnten an Versuchstag 2 erneut detektiert werden, während bei *L. innocua* 6 Typen nach 3 Wochen wieder isoliert wurden. Keiner der Typen von neuen *Listeria* Spezies war wiederholt aufgefunden worden.

Innerhalb von einem Versuchstag konnten jeweils gut 40 % der Typen bei beiden Proben isoliert werden. In dem beprobten Areal von ca. 1,5 m² konnten nach 3 Wochen rund 36 % der Typen von Versuchstag 1 erneut isoliert werden. Demgemäß war der Einfluss der unmittelbaren räumlichen Probenahmestelle in Bezug auf die Detektion von unterschiedlichen Typen ähnlich groß wie der zeitliche Abstand zwischen den Probenahmen.

3.4 Biodiversität von *Listeria*-Populationen

Zur Quantifizierung der Biodiversität von *Listeria* in den Habitaten Sediment und *R. fluitans* wurde mit 2 unterschiedlichen Anreicherungsmedien angereichert (1/2 Fraser- und UVM II- Medium). Dabei wurde 10 bzw. 20 g Probenmaterial auf Teilproben zu je 0,1 g aufgeteilt. Aus Vorversuchen war bekannt, dass die Keimzahl in 1 g Probenmaterial in der Regel < 100 ist. Ziel dieser Untersuchungen war es, das Probenmaterial so weit zu portionieren, dass pro Anreicherung möglichst nur eine Listerienzelle vorhanden war, um so kompetitive Hemmwirkungen zwischen Listerien zu umgehen. Da bei *R. fluitans* die Keimzahl erwartungsgemäß geringer war, wurden je Anreicherungsmedium 20 g Probenmaterial untersucht, da zur Erfassung der Biodiversität eine gewisse Anzahl von Isolaten erforderlich ist.

Bei den Keimzahluntersuchungen von Wasserpflanzen im jahreszeitlichen Verlauf waren bei allen 3 Standorten mehrfach insofern unplausible 3stellige MPN Codes ermittelt worden, dass in den niedrigen Verdünnungen weder Listerien noch Begleitflora nachgewiesen wurde. Erst bei höheren Verdünnungsstufen waren die Anreicherungen bewachsen. Das war speziell bei Jungpflanzen in den Monaten März bis Juni beobachtet worden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei der Zerkleinerung pflanzeneigene Substanzen freigesetzt wurden, die während der Anreicherung hemmend auf mikrobielles Wachstum wirkten. Es wurde vermutet, dass in dieser Wachstumsperiode die Bildung von Gerb- oder Bitterstoffen zum Schutz vor Fraßfeinden erhöht sein könnte und dass sich diese Stoffe bei der Anreicherungsprozedur auch inhibierend auf das Wachstum von Mikroorganismen auswirken könnten. Für die Erfassung der Diversität von *Listeria* auf *R. fluitans* wurde daher das Pflanzenmaterial nicht zerkleinert. Da nicht bekannt ist, wie Listerienzellen an der Oberfläche von Wasserpflanzen anhaften, wurden verschiedene Methoden getestet, um Listeriazellen von den Pflanzenoberflächen zu lösen (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden bei den Versuchen mit $\frac{1}{4}$ Ringerlösung unter 3minütiger Beaufschlagung mit Ultraschall und anschließendem Vortexen für 5 min die höchsten Keimzahlen in den Probenüberständen nachgewiesen.

Für die Quantifizierung der Diversität von *Listeria* auf *R. fluitans* wurden 50 g Probenmaterial (Pflanzenteile von den Wurzeln bis zu den Spitzen) in 450 g $\frac{1}{4}$ -Ringerlösung eingewogen, mit Ultraschall beaufschlagt und gevortext. Von Sedimentproben wurden je 40 g in 360 g $\frac{1}{4}$ Ringerlösung eingebracht, die Ansätze 3 min mit Ultraschall beaufschlagt und ebenfalls 5 min gevortext. Jeweils 1 ml dieser Suspensionen wurde in 9 ml $\frac{1}{2}$ Fraser Bouillon bzw. in 9 ml UVM II Medium überführt. Sedimentproben wurden je Anreicherungsmedium 100fach und *R. fluitans*-Proben 200fach angesetzt. Dies entsprach insgesamt in etwa 200 x 0,1 g Sediment bzw. 400 x 0,1 g *R. fluitans*. Die Ansätze wurden anschließend wie beschrieben bebrütet und weiter bearbeitet.

Von den positiv getesteten Ansätzen wurde jeweils eine Kolonie gepickt und auf TS Agar subkultiviert. Die Isolate wurden mit Hilfe von Multiplex PCR identifiziert und anhand von RAPD Analysen subtypisiert. Insgesamt wurde dieser Versuchsansatz 2mal für Sediment und 2mal für *R. fluitans* aus der Moosach (Fließgewässer) sowie 1mal für Sediment aus einem Standgewässer (Weiher bei Oftelfing) durchgeführt. Ein Teil der Isolate einer *R. fluitans* Probe wurden zusätzlich anhand von AFLP

Analytik und ein Teil der Isolate einer Sedimentprobe aus dem Probenahmeort Moosach anhand von (GTG)5 PCR typisiert.

3.4.1 Biodiversität von *Listeria* auf *R. fluitans*

Die Untersuchungen zur quantitativen Erfassung der Biodiversität von *Listeria* auf *R. fluitans* wurden im September 2009 und im April 2010 durchgeführt. Bei der Septemberprobe wurden 71 von 200 der 0,1g Ansätze bei Anreicherungen in ½ Fraser Medium und 70 von 200 bei den Anreicherungen in UVM II Medium positiv auf Listerien getestet. Dies entsprach jeweils einer Keimzahl von in etwa 35 / 10 g. Bei der im April entnommenen Probe waren 50 der ½ Fraser- und 52 der UVM II-Anreicherungen positiv, was in etwa einer Keimzahl von 25 / 10 g entsprach. Bei beiden Proben konnten die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* sowie neue *Listeria* Spezies nachgewiesen werden. Bei der im April untersuchten Probe konnten außerdem 2 Isolate als *L. grayi* identifiziert werden (Tab. 3.9).

<i>R. fluitans</i> Fließgewässer	Oktober 2009		April 2010	
	½ Fraser	UVM II	½ Fraser	UVM II
0,1 g Ansätze <i>Listeria</i> positiv (von 200)	71	70	50	52
<i>L. monocytogenes</i>	10	14	26	22
<i>L. innocua</i>	57	50	10	21
<i>L. seeligeri</i>	3	5	4	1
<i>L. grayi</i>	0	0	2	0
neue <i>Listeria</i> Spezies	1	1	8	8

Tab. 3.9 Anzahl von positiv getesteten Ansätzen bei den Anreicherungsmedien ½ Fraser- und UVM II-Medium sowie Anzahl von identifizierten *Listeria* Isolaten bei *R. fluitans* Proben.

Während im Oktober 2009 mehrheitlich *L. innocua* (107 Isolate) detektiert werden konnte, war der Hauptanteil der Listerienflora im April 2010 *L. monocytogenes* (48 Isolate). Die gesamten prozentualen Anteile der differenzierten *Listeria* Spezies bei den beiden Proben sind in Abb. 3.16 dargestellt.

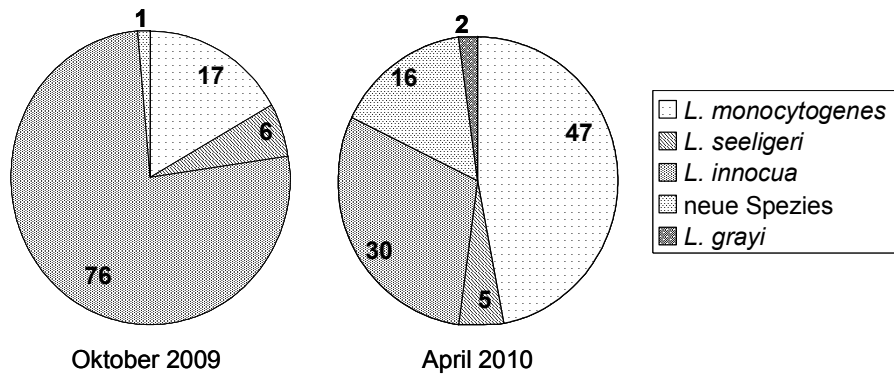


Abb. 3.16 Prozentuale Anteile von *Listeria* Spezies von 20 g *R. fluitans* (Fließgewässer).

Die Subtypisierung der Isolate der beiden Proben erfolgte mit Hilfe von RAPD PCR. Bei den 141 Isolaten der Oktoberprobe konnten insgesamt 27 RAPD Typen diskriminiert werden. Sieben der detektierten RAPD Typen konnten nur aus $\frac{1}{2}$ Fraser und 11 Typen nur aus UVM II Medium isoliert werden, während 9 Typen bei beiden Medien nachzuweisen war. Bei den 24 *L. monocytogenes* Isolaten konnten 5, bei 8 *L. seeligeri* Isolate 4, bei 107 *L. innocua* Isolaten 16 und bei 2 Isolaten von neuen *Listeria* Spezies 2 RAPD Typen unterschieden werden. Die einzelnen RAPD Typen kamen jeweils in unterschiedlichen Häufigkeiten vor (Tab. 3.10).

<i>R. fluitans</i> Oktober 2009 141 Isolate		<i>R. fluitans</i> April 2010 104 Isolate	
RAPD Typ	Anzahl Isolate	RAPD Typ	Anzahl Isolate
1	31	1	18
2	25	2	15
3	24	3	10
4	12	4 - 5	4
5	8	6	3
6	7	7 - 19	2
7	5	20 - 44	1
8	4	---	---
9 - 14	2	---	---
15 - 27	1	---	---

Tab. 3.10 Abundanz von *Listeria* RAPD Typen bei 2 Proben von *R. fluitans*. Die Proben wurden im Oktober 2009 und im April 2010 untersucht. Bei beiden Proben wurden mehr als die Hälfte der diskriminierten Typen nur 1mal nachgewiesen.

Bei der *R. fluitans* Probe vom April 2010 konnten insgesamt 44 RAPD Typen abgegrenzt werden. Bei den 48 *L. monocytogenes* Isolaten konnten 11, bei 5 *L. seeligeri* Isolaten 3, bei 33 *L. innocua* Isolaten 21, bei den beiden *L. grayi* Isolaten 2 und bei den 16 Isolaten von neuen *Listeria* Spezies 7 RAPD Typen unterschieden werden. Ebenfalls in Tab. 3.10 sind die Typenabundanzen – unabhängig von den jeweiligen *Listeria* Spezies – der April Probe aufgelistet.

3.4.2 Biodiversität von *Listeria* in Sediment von einem Fließgewässer

Die Diversitätsanalysen von Sediment in einem Fließgewässer wurden im September 2009 und im März 2010 durchgeführt. Bei der Septemberprobe wurden mit ½ Fraser 59 der 0,1 g Portionen positiv getestet, was einer Keimzahl von 59 / 10 g entsprechen würde. Bei den UVM II Anreicherungen waren 63 der Anreicherungen positiv, was einem Vorkommen von 63 cfu / 10 g entsprach. Die Anzahl der positiv getesteten 0,1 g Portionen der Sedimentprobe vom März 2010 war bei beiden Anreicherungsmedien geringer (36 bei ½ Fraser und 31 bei UVM II). Dies wäre unter der Annahme, dass 0,1 g Probenmaterial eine oder keine *Listeria*zelle enthält, eine Keimzahl von 36 bzw. 31 / 10 g. Die Zusammensetzung der *Listeria*populationen unterschieden sich bei den beiden Sedimentproben, die im Abstand von etwa einem halben Jahr gezogen und untersucht wurden, wesentlich (Tab. 3.11, Abb. 3.17).

Sediment Fließgewässer	September 2009		März 2010	
	½ Fraser	UVM II	½ Fraser	UVM II
0,1 g Ansätze <i>Listeria</i> positiv (von 100)	59	63	36	31
<i>L. monocytogenes</i>	8	2	10	10
<i>L. innocua</i>	0	0	26	20
<i>L. seeligeri</i>	3	2	0	1
neue <i>Listeria</i> Spezies	47	59	0	0

Tab. 3.11 Anzahl von positiv getesteten Ansätzen bei den Anreicherungsmedien ½ Fraser- und UVM II-Medium sowie Anzahl von identifizierten *Listeria* Spezies bei Sedimentproben aus einem Fließgewässer.

Während der Hauptanteil der Septemberprobe noch nicht beschriebenen *Listeria* Spezies angehörten (87 %), konnten auch *L. monocytogenes* und *L.*

seeligeri in untergeordneter Anzahl nachgewiesen werden (9 bzw. 4 %). Bei der Probe, die im März 2010 entnommen wurde, war der dominante Anteil *L. innocua* (69 %). Auch *L. monocytogenes* (30 %) und *L. seeligeri* (1 %) konnten identifiziert werden (Abb. 3.17).

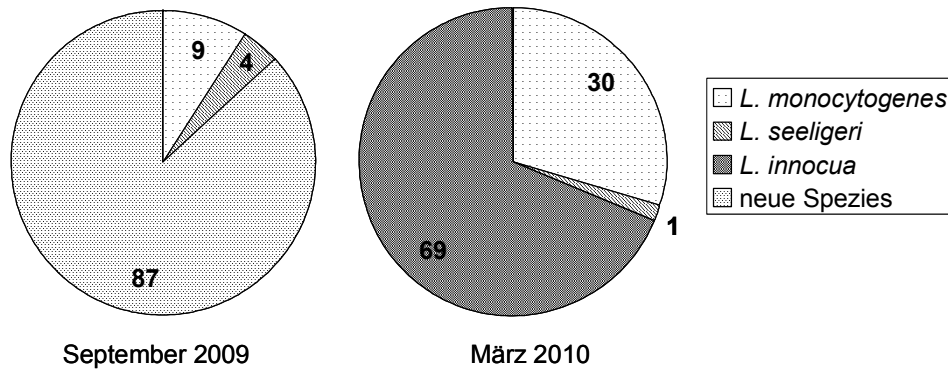


Abb. 3.17 Prozentuale Anteile von *Listeria* Spezies in 10 g Sediment (Fließgewässer).

Die Isolate der Proben wurden mit Hilfe von RAPD PCR anhand der drei Primer M13, Eric2 und inIA.F subtypisiert. Bei den in ½ Fraser angereicherten Isolaten konnten bei der Septemberprobe insgesamt 21 RAPD-Typen unterschieden werden, während bei den UVM II Isolaten 31 Typen identifiziert werden konnten. Insgesamt konnten beim simultanen Einsatz von den drei Primern 52 RAPD Typen unterschieden werden. Die 11 *L. monocytogenes* Isolate wurden in 2 Typen, die 5 *L. seeligeri* Isolate in 3 und die 106 Isolate von neuen *Listeria* Spezies in 47 RAPD Typen klassifiziert (Tab. 3.12).

Sediment September 2009 122 Isolate		Sediment März 2010 67 Isolate	
RAPD Typ	Anzahl Isolate	RAPD Typ	Anzahl Isolate
1	18	1	19
2	12	2 - 3	12
3 - 4	9	4	4
5	7	5 - 7	3
6	5	8 - 9	2
7 - 8	4	10 - 16	1
9 - 10	3	---	---
11 - 17	2	---	---
18 - 52	1	---	---

Tab. 3.12 Abundanz von *Listeria* RAPD Typen bei 2 Sedimentproben aus einem Fließgewässer. Die Proben wurden im September 2009 und im März 2010 untersucht. Bei

der Septemberprobe wurden rund 2/3 der detektierten Typen und bei der Märzprobe knapp die Hälfte der RAPD Typen nur einmal nachgewiesen.

Bei den 67 Isolaten der Märzprobe wurden anhand RAPD 16 Typen unterschieden. Bei den 20 *L. monocytogenes* Isolaten konnten 5 und bei den 46 *L. innocua* Isolaten 10 Typen unterschieden werden. Die Häufigkeiten, in der die verschiedenen Typen in den beiden Sedimentproben vorkamen, sind in Tab. 3.12 aufgelistet.

3.4.3 Biodiversität von *Listeria* in Sediment von einem Standgewässer

Bei Sediment aus einem Standgewässer wurden mit ½ Fraser- bzw. UVM II-Medium 87 und 81 von jeweils 200 0,1g Anreicherungen positiv auf Listerien getestet. Dies entsprach einer Listerienkeimzahl von etwa 43 bzw. 40 / 10 g. Insgesamt wurden 168 Isolate gewonnen und identifiziert. Die Isolate des Standgewässers gehörten hauptsächlich noch nicht beschriebenen *Listeria* Spezies an, aber auch *L. monocytogenes* und *L. innocua* konnten nachgewiesen werden (Tab. 3.13).

Sediment Standgewässer	Juni 2010	
	½ Fraser	UVM II
0,1 g Ansätze <i>Listeria</i> positiv (von 200)	87	81
<i>L. monocytogenes</i>	15	13
<i>L. innocua</i>	0	2
neue <i>Listeria</i> Spezies	72	66

Tab. 3.13 Anzahl von positiv getesteten Ansätzen (½ Fraser- und UVM II – Medium) sowie identifizierte *Listeria* Spezies bei Sediment aus einem Standgewässer.

Die prozentualen Anteile der detektierten Listerienpopulation der Sedimentprobe vom Standgewässer sind in Abb. 3.18 dargestellt. Anhand RAPD Typisierung konnten bei den 168 Isolaten insgesamt 14 Typen unterschieden werden, wobei 5 Typen nur bei ½ Fraser angereicherten Isolaten und 5 Typen bei UVM II – Isolaten differenziert werden konnten. Vier der diskriminierten Typen waren aus beiden Anreicherungsmedien isoliert worden. Bei den 28 *L. monocytogenes* Isolaten konnten 7, bei den beiden *L. innocua* Isolaten 1 und bei den 138 Isolaten von neuen *Listeria* Spezies 6 RAPD Typen unterschieden werden.

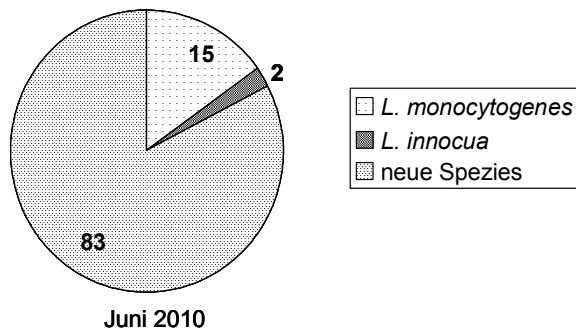


Abb. 3.18 Prozentuale Anteile von *Listeria* Spezies in 20 g Sediment (Standgewässer)

Insgesamt unterschieden sich die Sedimentproben vom Fließgewässer im Vergleich zur Probe aus dem Standgewässer bezüglich der detektierten Anzahl von *Listeria* RAPD Typen deutlich. Sehr unterschiedlich war auch die Auftretenshäufigkeit der detektierten Typen. In Tab. 3.14 sind die Häufigkeiten von *Listeria* RAPD Typen der Sedimentprobe von dem Standgewässer aufgelistet.

Sediment Juni 2010 168 Isolate	
RAPD Typ	Anzahl Isolate
1	114
2	12
3	11
4	9
5	6
6	4
7	3
8 - 9	2
10 - 14	1

Tab. 3.14 Abundanz von *Listeria* RAPD-Typen bei Sediment von einem Standgewässer (Juni 2010).

3.4.4 Zusätzliche Typisierungsmethoden

Zusätzlich zur RAPD Typisierung wurde ein Teil der Isolate anhand von zwei weiteren Subtypisierungsmethoden untersucht. Von der *R. fluitans* Probe vom April 2010 wurden 97 Isolate zusätzlich anhand von AFLP und 119 Isolate der Sedimentprobe vom September 2009 mit dem Primer (GTG)₅ typisiert.

3.4.4.1 AFLP

Bei dieser Typisierungsmethode konnten sehr komplexe Bandenprofile mit bis zu 20 Signalen erzielt werden. Anhand von 6 doppelt untersuchten Proben wurde die Reproduzierbarkeit der Methodik getestet. Dabei clusterten die Profile mit einer Ähnlichkeit von 90 %. Diese Ähnlichkeitsgrenze wurde bei der Definition von AFLP Typen zugrundegelegt. Exemplarisch sind die 8 detektierten AFLP-Bandenprofile von *L. monocytogenes* Isolaten in Abb. 3.19 dargestellt.

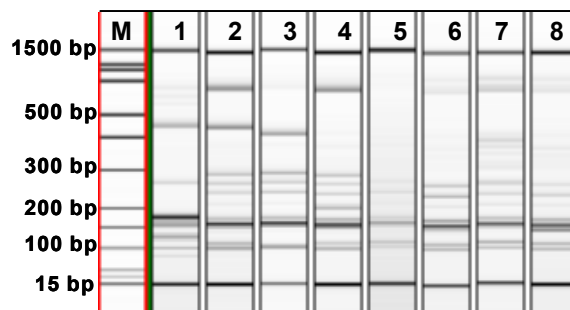


Abb. 3.19 AFLP Bandenprofile von *L. monocytogenes*, M Marker. Das jeweils erste und letzte Signal in jeder Probe ist ein zusätzlich mitgeführter Marker, der die sehr genaue Kalibrierung der Lauflängen ermöglicht.

Bei den 97 AFLP typisierten Isolaten von *R. fluitans* konnten 34 AFLP Typen unterschieden werden. Im selben Probenset konnten anhand RAPD 36 Typen differenziert werden. Die Methoden klassifizierten z. T. unterschiedlich (Tab. 3.15).

RAPD / AFLP Typisierung					
97 Isolate					
RAPD		AFLP		RAPD + AFLP	
Typ	Anzahl Isolate	Typ	Anzahl Isolate	Typ	Anzahl Isolate
1	18	1	25	1	14
2	15	2	10	2 – 3	10
3	10	3	5	4 – 5	3
4	4	4	4	6 - 9	2
5 - 7	3	5 – 11	3	10 - 54	1
8 – 15	2	12 – 18	2	---	---
16 - 36	1	19 - 34	1	---	---

Tab. 3.15 Häufigkeiten von RAPD- bzw. AFLP Typen von *R. fluitans* (April 2010) sowie Häufigkeiten von Subtypen, die bei Kombination der beiden Typisierungsmethoden resultieren.

So konnten Isolate, die bei RAPD Typisierung nicht unterschieden werden konnten, anhand AFLP differenziert werden und umgekehrt. Bei Kombination der beiden Methoden konnten insgesamt 54 Typen unterschieden werden.

Zum Vergleich der beiden Methoden wurden jeweils die Diversitätsindizes nach Simpson bestimmt. Dabei war die RAPD Methode mit $D = 0,962$ geringfügig sensitiver als die AFLP-Methode mit $D = 0,956$. Bei Kombination der beiden Typisierungsmethoden konnte die Diversität der Population mit $D = 0,963$ errechnet werden (Tab. 3.16).

<i>R. fluitans</i> (April 2010)	RAPD		AFLP	
	½ Fraser (F)	UVM II (U)	½ Fraser (F)	UVM II (U)
D(F) / D(U)	0,897	0,944	0,879	0,937
D(F+U)	0,962		0,956	
D(RAPD+AFLP)	0,963			

Tab. 3.16 Anhand RAPD- und AFLP-Typisierung ermittelte Simpson Diversitätsindizes von *Listeria* Isolaten aus *R. fluitans* vom April 2010.

3.4.4.2 (GTG)5 Typisierung

119 der *Listeria* Isolate der Sedimentprobe vom September 2009 wurden zusätzlich mit dem Primer (GTG)5 typisiert. Bei diesem Probenstet waren anhand RAPD 52 Typen unterschieden worden, während mit (GTG)5 insgesamt 46 Typen differenziert werden konnten (Tab. 3.17). Bei den beiden Methoden wurden die Isolate teilweise unterschiedlich klassifiziert, d. h. Isolate, die beispielsweise bei RAPD Typisierung nicht unterscheidbar waren, konnten anhand (GTG)5 Typisierung differenziert werden. Bei Kombination der beiden unterschiedlichen Klassifizierungen konnten bei den 119 getesteten Isolaten 65 Typen diskriminiert werden. Insgesamt wurden dabei 50 Typen von nur einem Isolat repräsentiert.

RAPD / (GTG)5 Typisierung 119 Isolate					
RAPD		(GTG)5		RAPD + (GTG)5	
Typ	Anzahl Isolate	Typ	Anzahl Isolate	Typ	Anzahl Isolate
1	17	1	18	1	17
2	12	2	12	2 – 3	10

3	9	3	10	4 – 5	5
4	9	4	9	6	4
5	7	5	7	7	3
6	5	6	5	8 – 14	2
7 - 8	4	7 - 8	4	15 - 65	1
9 - 10	3	9 - 10	3	---	---
11- 16	2	11 - 17	2	---	---
17 - 50	1	18 -46	1	---	---

Tab. 3.17 Abundanz von *Listeria* Subtypen aus Sediment. Aufgelistet sind jeweils die Häufigkeiten von RAPD-Typen bzw. (GTG)5 Typen sowie die Häufigkeiten bei Kombination der beiden Typisierungsmethoden.

Da anhand von (GTG)5 Typisierung weniger Typen differenziert werden konnten, waren die ermittelten Diversitätsindizes bei der 3er-Kombination von RAPD Primern höher. Die RAPD Methode erwies sich somit als sensitiver ($D=0,952$ gegenüber $D=0,928$, Tab. 3.18). Bei Kombination der Typisierungsmethoden konnten zusätzliche Typen diskriminiert werden, sodass ein Diversitätsindex von $D = 0,963$ berechnet werden konnte.

Sediment September 2009	RAPD		(GTG)5	
	½ Fraser (F)	UVM II (U)	½ Fraser (F)	UVM II (U)
D	0,910	0,949	0,916	0,927
D(F+U)	0,952		0,928	
D(RAPD+(GTG)5)	0,963			

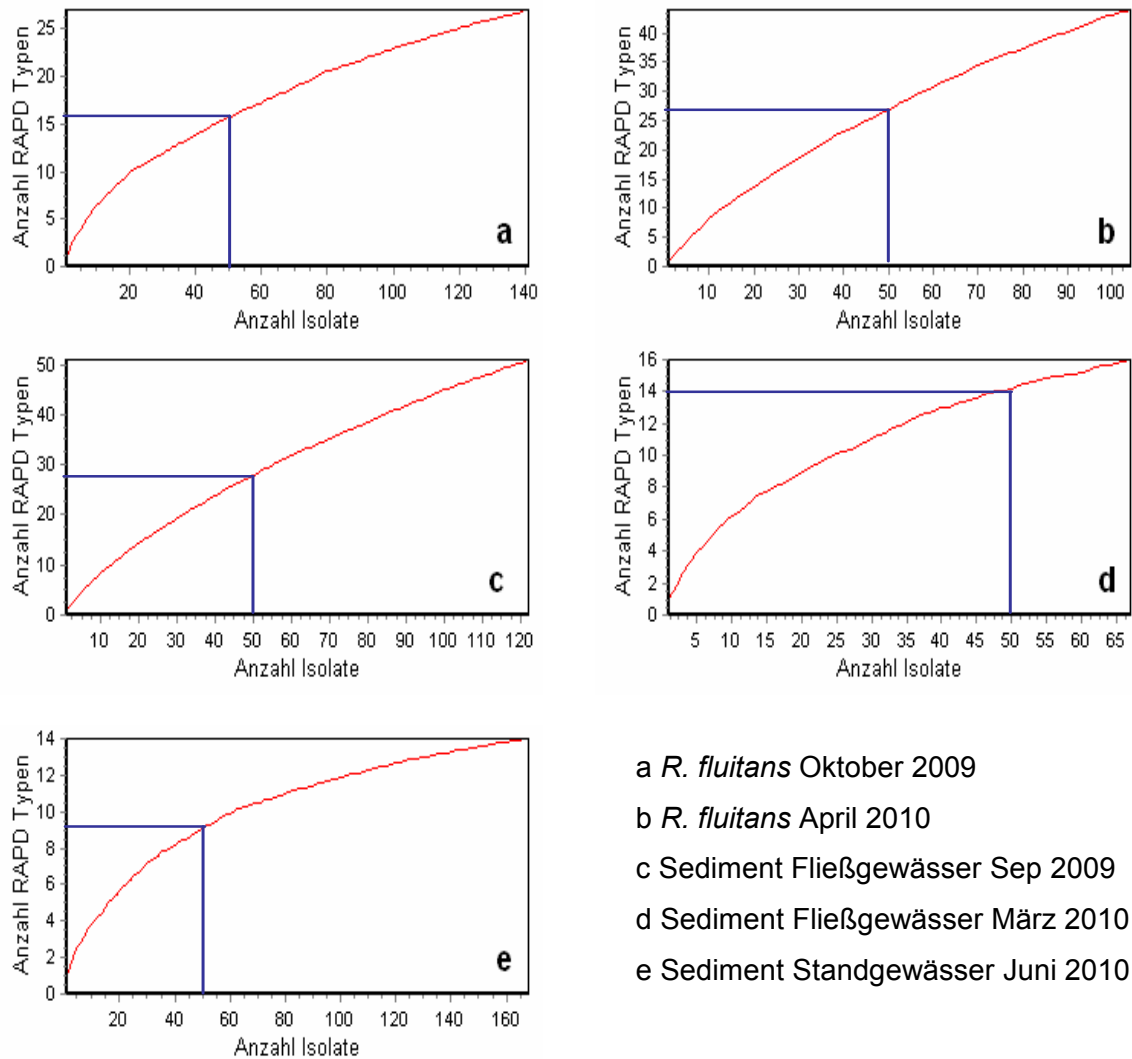
Tab. 3.18 Anhand der Anwendung von zwei unterschiedlichen Typisierungsmethoden ermittelte Diversitätsindizes nach Simpson von *Listeria* Isolaten aus Sediment von einem Fließgewässer.

3.4.5 Intragenerische Biodiversität von *Listeria*

3.4.5.1 Akkumulation von Subtypen

Die Detektion von RAPD Typen wurde anhand von Akkumulationskurven abgebildet. Für die Generierung der Akkumulationskurven wurde jeder neu

detektierte RAPD Typ mit zunehmender Anzahl von untersuchten Isolaten aufsummiert (Abb. 3.20).



- a *R. fluitans* Oktober 2009
- b *R. fluitans* April 2010
- c Sediment Fließgewässer Sep 2009
- d Sediment Fließgewässer März 2010
- e Sediment Standgewässer Juni 2010

Abb. 3.20 Akkumulation von *Listeria* RAPD-Typen bei den 5 untersuchten Proben. Hervorgehoben ist jeweils die Anzahl von RAPD Typen bei 50 untersuchten Isolaten je Probe.

Die Akkumulationskurven wurden mit Hilfe der Software SDR IV generiert, wobei die Grafen unter Berechnung von 100 (bzw. 67 bei der Sedimentprobe vom März 2010) randomisierten Probenahmen geglättet wurden. Dadurch wurden Effekte im Kurvenverlauf ausgeglichen, die durch die Reihenfolge bedingt wären, in der neue Typen hinzugefügt wurden. Andernfalls würden die Kurven in der Reihenfolge, in der neue Typen addiert worden waren, entsprechend uneben bzw. „gezackt“ verlaufen,

wodurch ein direkter Vergleich von Akkumulationsgrafiken nur schwer möglich wäre. In Abb. 3.20 sind die RAPD-Typen-Akkumulationskurven der beiden *R. fluitans* und der 3 Sedimentproben dargestellt.

Bei Anwendung einer zweiten Typisierungsmethode konnten jeweils weitere Typen abgegrenzt werden. Daher hatten die Typen-Akkumulationskurven bei diesen Proben einen dementsprechend steilen, nahezu linearen Verlauf (Abb. 3.21)

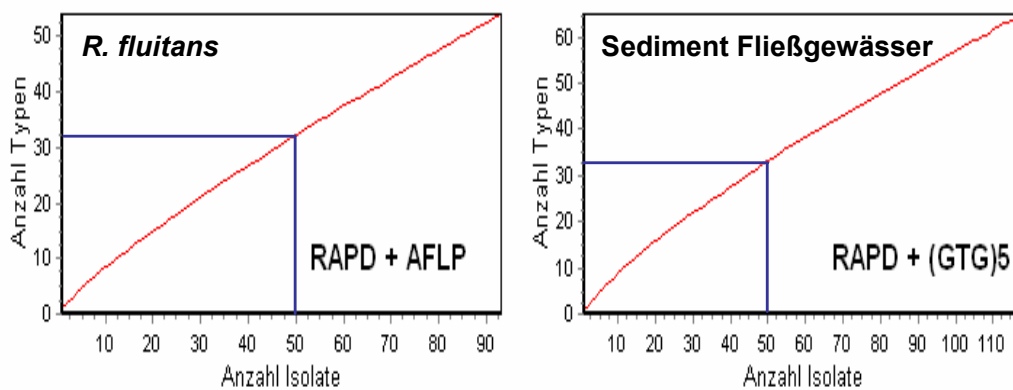


Abb. 3.21 Akkumulation von Typen bei den Isolaten der Proben, die anhand von zwei unterschiedlichen Methoden typisiert wurden.

Dadurch, dass die *Listeria* Kollektionen bei den 5 Proben jeweils ähnlich umfangreich waren, ist ein Vergleich der Populationen bereits über die Akkumulationskurven möglich. Bei RAPD Typisierung konnten in der Sedimentprobe vom Fließgewässer von September 2009 die meisten unterschiedlichen Typen differenziert werden (28 Typen bei 50 untersuchten Isolaten). Am niedrigsten war die Diversität mit 9 Typen bei 50 Isolaten bei der Sedimentprobe vom Standgewässer. Durch die Anwendung eines zusätzlichen Typisierungsverfahrens war eine weitere Abgrenzung von Typen möglich, so dass beim Vergleich von 50 Isolaten aus den Populationen jeweils 33 Typen unterschieden werden konnten (Tab. 3.19).

50 Isolate aus	Anzahl RAPD Typen	Anzahl von Typen bei zusätzlicher Typisierung
<i>R. fluitans</i> Oktober 2009	16	---
<i>R. fluitans</i> April 2010	27	33 (RAPD + AFLP)
Sediment Fließgewässer Sep 2009	28	33 (RAPD + (GTG)5)
Sediment Fließgewässer März 2010	14	---

Sediment Standgewässer Juni 2010	9	---
-------------------------------------	---	-----

Tab. 3.19 Vergleich der intragenerischen Diversität der *Listeria*populationen in den 5 untersuchten Proben über die Akkumulation von Subtypen bei 50 untersuchten Isolaten.

3.4.5.2 Abundanz von Subtypen

Ein wesentliches Merkmal bezüglich der Diversität einer Population ist die Häufigkeit, in der die einzelnen Arten oder Typen vorkommen. Dies kann über die Rangabundanz von Spezies oder Typen in einem Habitat sehr anschaulich dargestellt werden. Dabei werden die einzelnen Typen entsprechend ihrer Auftretenshäufigkeit - beginnend mit dem Typus mit der höchsten Abundanz - in absteigender Reihenfolge angeordnet (Abb. 3.22).

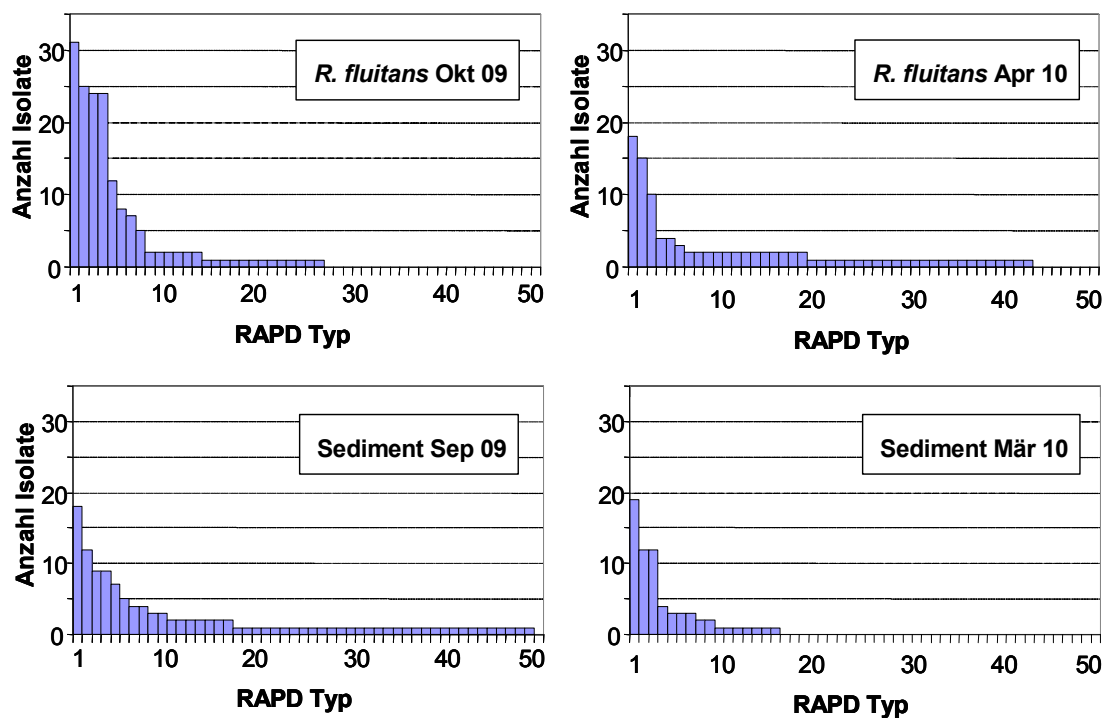


Abb. 3.22 Häufigkeiten von RAPD Typen in den Habitaten Sediment und *R. fluitans* vom Fließgewässer unter Anordnung der Typen-Abundanzen in absteigender Reihenfolge.

Beim Fließgewässer waren die Häufigkeiten von RAPD Typen auf *R. fluitans* und in Sediment jeweils recht ähnlich. Bei dem Sediment aus dem Standgewässer war die Anzahl von RAPD Typen im Vergleich zum Fließgewässersediment deutlich

geringer. Zu dem kam ein RAPD Typus von neuen *Listeria* Spezies in sehr viel höherer Abundanz vor als die übrigen Typen (Abb. 3.23).

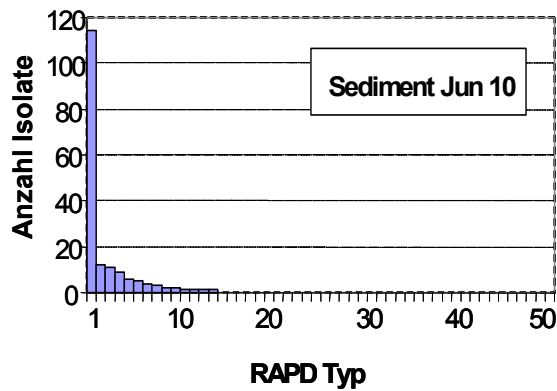


Abb. 3.23 Häufigkeiten von RAPD Typen im Sediment vom Standgewässer. Die Abundanz von RAPD Typen ist in absteigender Reihenfolge angeordnet.

Bei den Isolat, die zusätzlich mit AFLP bzw. (GTG)5 typisiert wurden, veränderten sich die Abundanzen insofern, dass insgesamt deutlich mehr singuläre Typen abgegrenzt werden konnten (Abb. 3.24).

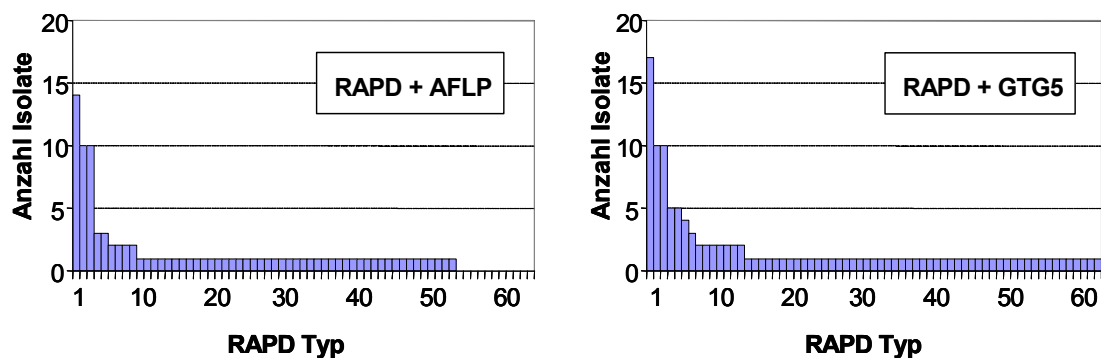


Abb. 3.24 Häufigkeiten von *Listeria*-Subtypen in den Habitaten *R. fluitans* und Sediment (Fließgewässer) bei der Anwendung von zwei unterschiedlichen Typisierungsmethoden: RAPD+AFLP-Typisierung von 93 Isolat, von *R. fluitans* (April 2010) sowie RAPD+(GTG)5-Typisierung von 119 Isolat, von Sediment (September 2009).

Anhand dieser Anordnung von Typen wird die Häufigkeitsverteilung der Typen bestimmt, die auch als Grundlage für die statistische Berechnung der nicht detektierten Fraktion in einer Population oder in einem Habitat dienen kann. Insofern bilden die Plots von Rangabundanzen die Basis für die Berechnung der gesamten Diversität in einem Habitat.

3.4.5.3 Abschätzung der gesamten RAPD-Typenvielfalt

Die Beschreibung der Biodiversität in einem Habitat ist mit einem umfangreichen Beprobungsaufwand verbunden, da eine repräsentative Kollektion von Spezies bzw. Typen erforderlich ist. Mit der zunehmenden Untersuchung von Proben steigt aber auch die Wahrscheinlichkeit, dass zunehmend Typen wiederholt aufgenommen werden. Insofern steht bei fortschreitender Probenuntersuchung der erforderliche Aufwand auch aus ökonomischer Sicht nicht immer in Relation zum Erkenntnisgewinn. Daher wurden parametrische sowie nicht-parametrische Methoden zur Abschätzung des Artenreichtums anhand eines vorliegenden Datensatzes entwickelt. Parametrische Methoden sind z. B. die Extrapolation von Akkumulationskurven nach der Michaelis Menten-Hyperbelfunktion. Eine weitere parametrische Methode ist die Angleichung von Verteilungsfunktionen an die logarithmisierte Häufigkeitsverteilung von Typen oder Spezies in einer Population. In Abb. 3.25 sind die RAPD Typenabundanz bei den beiden untersuchten *R. fluitans*- und den 3 Sedimentproben in logarithmischer Skalierung dargestellt.

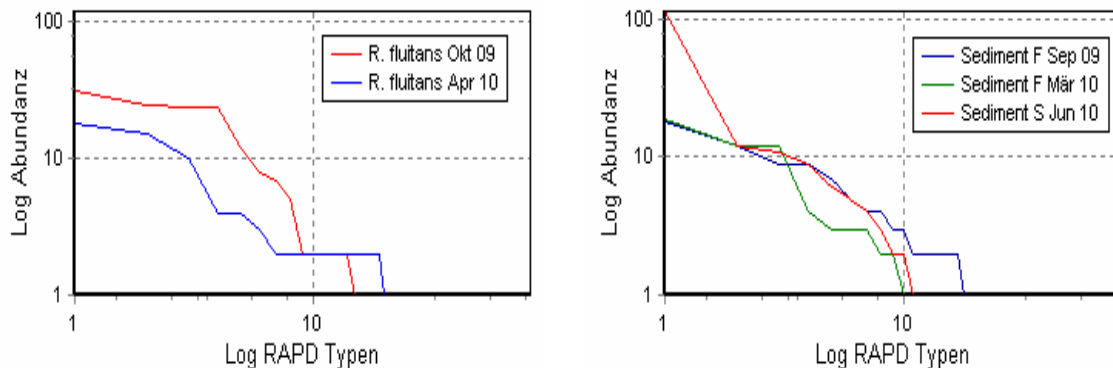


Abb. 3.25 Logarithmische Rang-Abundanzkurven von RAPD Typen bei den beiden *R. fluitans* – und den 3 Sedimentproben. Die Häufigkeiten entsprachen bei allen 5 Proben einer gestutzten Lognormalverteilung.

Im Gegensatz zu parametrischen Berechnungsmethoden liegt bei nicht-parametrischen Methoden der Fokus auf den selten detektierten Typen (1- bzw. 2mal aufgenommene Typen bei Chao 1) oder bis zu 10mal aufgenommene Typen (bei Chao ACE). Diesen nicht-parametrischen Methoden liegt die Überlegung zugrunde, dass bei sehr diversen Populationen die Wahrscheinlichkeit entsprechend hoch ist, dass weitere, seltene Typen vorkommen, die noch nicht erfasst worden sind.

In dieser Arbeit wurde die Abschätzung der gesamten Artenvielfalt anhand Extrapolation der Typenakkumulationskurven nach Michaelis-Menten, über lognormale Verteilungsfunktionen sowie anhand der nicht-parametrischen Methoden nach Chao 1 und Chao ACE durchgeführt. Die ermittelten Schätzungen bei den unterschiedlichen Berechnungsmethoden sind in Tab. 3.20 aufgelistet. Die ermittelten Schätzwerte unterschieden sich teilweise deutlich. Speziell die Schätzwerte nach Chao 1 waren bei 3 Proben (Sediment September und bei den kombiniert typisierten Isolaten) verhältnismäßig hoch. Auch die Schätzung anhand Michaelis Menten Extrapolation war bei der *R. fluitans*- Probe vom April 2010 (RAPD+AFLP) vergleichsweise erhöht.

Probe	Anzahl Isolate	Anzahl Typen	Abschätzung der gesamten Anzahl von <i>Listeria</i> Subtypen			
			Michaelis Menten	lognormal Verteilung	Chao 1 ^d	Chao ACE
<i>R. fluitans</i> Oktober 2009 ^a	141	27	34	46	41	30
<i>R. fluitans</i> April 2010 ^a	104	44	83	51	72	56
Sediment F Sep 2009 ^a	122	52	81	71	134	73
Sediment F März 2010 ^a	67	16	19	20	28	18
Sediment S Juni 2010 ^a	168	14	13	22	17	14
<i>R. fluitans</i> April 2010 ^b	93	54	170	69	307	105
Sediment F Sep 2009 ^c	119	65	124	82	251	114

^a RAPD

^b RAPD+AFLP

^c RAPD+(GTG)5

^d unter Berechnung von 50 random samplings

Tab. 3.20 Abschätzung der gesamten RAPD-Typenvielfalt in den untersuchten Habitaten anhand parametrischer sowie nicht-parametrischer Berechnungsmethoden. Aufgelistet sind die Anzahl untersuchter Isolate und die Anzahl der identifizierten *Listeria* Subtypen. Die jeweils ermittelten Schätzwerte wurden auf ganze Stellen gerundet. F = Fließgewässer, S = Standgewässer.

Um zu prüfen, welches Berechnungsmodell am besten dem jeweils vorliegenden Datensatz entspricht und demzufolge die zuverlässigste Schätzung kalkuliert, wurden die Schätzmethode anhand eines Subsets von Isolaten geprüft.

Dazu wurden von jeder Probe die ersten 50 Isolate ausgewählt und die Schätzungen anhand dieser Auswahl erneut kalkuliert. Je näher dabei die beiden Schätzwerte einer Methode beieinander lagen, desto besser kann sie dem jeweiligen Datensatz angepasst werden und als desto zuverlässiger gilt insgesamt die Schätzung. In Tab. 3.21 sind die Anzahlen von geschätzten Typen bei 50 untersuchten Isolaten im Vergleich zur Abschätzung der Diversität bei Einbezug aller Isolate der Proben aufgelistet.

Probe	Abschätzung der gesamten Anzahl von <i>Listeria</i> Subtypen							
	Michaelis Menten		lognormal Verteilung		Chao 1 ^d		Chao ACE	
	50 Isolate	alle	50 Isolate	alle	50 Isolate	alle	50 Isolate	alle
<i>R. fluitans</i> Oktober 2009 ^a	25	34	21	46	56	41	18	30
<i>R. fluitans</i> April 2010 ^a	55	83	36	51	93	72	43	56
Sediment F Sep 2009 ^a	45	81	30	71	208	134	44	73
Sediment F März 2010 ^a	17	19	16	20	20	28	16	18
Sediment S Juni 2010 ^a	6	13	---	22	7	17	6	14
<i>R. fluitans</i> April 2010 ^b	68	170	41	69	342	307	58	105
Sediment F Sep 2009 ^c	64	124	33	82	92	251	55	114

^a RAPD

^b RAPD + AFLP

^c RAPD + (GTG)₅

^d unter Berechnung von 50 random samplings

Tab. 3.21 Abschätzung der Typenvielfalt anhand parametrischer sowie nicht-parametrischer Berechnungsmethoden bei 50 untersuchten Isolaten je Probe. Die jeweils ermittelten Schätzwerte wurden auf ganze Stellen gerundet. F = Fließgewässer, S = Standgewässer. Bei 50 Isolaten lagen bei der Sedimentprobe aus dem Standgewässer die Häufigkeiten der RAPD Typen nicht in einer lognormalen Verteilung vor, weshalb eine Schätzung nicht möglich war. Hervorgehoben sind Schätzwerte mit einer Differenz von < 10.

Während die Resultate bei Anpassung von lognormalen Verteilungsfunktionen deutlicher voneinander abwichen und daher vermutlich ungenauer sind, waren die Schätzwerte bei Chao 1 speziell bei einem Datensatz von jeweils 50 Proben vergleichsweise hoch. Bei den Ergebnisse von Michaelis Menten-Extrapolation und

Chao ACE waren die Differenzen der Schätzwerte jeweils bei 3 der 7 getesteten Datensätze < 10 . Bei der Prüfung der Schätzmethoden anhand eines Subsets lieferten diese beiden Schätzmethoden daher die zuverlässigsten Ergebnisse.

3.4.6 Intraspezifische Biodiversität

Für die Beschreibung der intraspezifischen Diversität wurden die RAPD-Typisierungsdaten aus den 0,1 g Anreicherungen vom Fließgewässer (Moosach, 2mal *R. fluitans* und 2mal Sediment) sowie die Daten aus den MPN Untersuchungen vom Jahreslauf einbezogen. Bei den MPN Ansätzen war eine Auswahl von Isolaten der Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri* anhand von RAPD typisiert worden. Die Diversität innerhalb der einzelnen *Listeria* Spezies bezogen auf die Habitate Sediment und *R. fluitans* wurde anhand vom Simpson Diversitätsindex sowie dem Verhältnis von detektierten Typen je Isolatanzahl quantifiziert. In nachfolgender Tabelle sind die Simpson Diversitätsindizes D und die Verhältniszahlen aus RAPD-Typen / Isolatanzahl Q für die einzelnen Spezies von den 0,1 g Untersuchungen vom Fließgewässer sowie von den MPN Anreicherungen je Typisierungsmethode aufgelistet (Tab. 3.22). Zudem wurde - sofern Isolate vorhanden waren - die Speziesdiversität von RAPD Typen je Habitat von 2 Beprobungen (bei den 0,1 g Ansätzen) bzw. je Habitat von 2 Standorten (bei den MPN Ansätzen) kalkuliert (D_{habitat} bzw. Q_{habitat}). Zudem wurde die Diversität aller untersuchten Isolate je Spezies berechnet (D_{ges} und Q_{ges} , Tab. 3.22).

Spezies	Anreicherung	Habitat	Probenahme bzw. Standort	Isolate	Typen	Anzahl Typen	D ¹	Q ²	D _{habitat} ³	Q _{habitat} ⁴	D _{ges} ⁵	Q _{ges} ⁶		
<i>L. monocytogenes</i>	400 x 0,1g	<i>R. fluitans</i>	Okt 2009	24	RAPD	5	0,678	0,210	0,910	0,310	0,927	0,200		
			Apr 2010	48	RAPD	11	0,765	0,230						
				43	AFLP	7	0,642	0,163						
				43	AFLP+RAPD	16	0,832	0,372						
	200 x 0,1g	Sediment	Sep 2009	10	(GTG)5	2	0,355	0,200	0,735	0,267				
				10	RAPD+(GTG)5	2	0,355	0,200						
				10	RAPD	2	0,355	0,200						
	MPN	<i>R. fluitans</i>	Moosach	24	RAPD	4	0,703	0,167	0,656	0,176				
			Wolnzach	15	RAPD	4	0,448	0,267						
		Sediment	Moosach	24	RAPD	6	0,867	0,250	0,889	0,382				
			Wolnzach	10	RAPD	5	0,756	0,500						
	<i>L. innocua</i>	400 x 0,1g	<i>R. fluitans</i>	Okt 2009	107	RAPD	16	0,809	0,149	0,925			0,297	0,971
Apr 2010				31	RAPD	21	0,964	0,677						
				30	AFLP	19	0,966	0,633						
				30	RAPD+AFLP	29	0,990	0,966						
200 x 0,1g		Sediment	Mär 2010	46	RAPD	10	0,761	0,217	0,931	0,311				
MPN		<i>R. fluitans</i>	Moosach	30	RAPD	10	0,841	0,333						
			Wolnzach	31	RAPD	9	0,828	0,290						
		Sediment	Moosach	36	RAPD	16	0,944	0,444			0,897	0,339		
			Wolnzach	26	RAPD	6	0,652	0,231						
<i>L. seeligeri</i>		400 x 0,1g	<i>R. fluitans</i>	Okt 2009	8	RAPD	4	0,750			0,500	0,859	0,461	
	Apr 2010			5	RAPD	3	0,800	0,600						
	200 x 0,1g	Sediment	Sep 2009	5	(GTG)5	2	0,600	0,400	0,733	0,500				
				5	RAPD+(GTG)5	3	0,800	0,600						
				5	RAPD	2	0,600	0,400						
				Mär 2010	1	RAPD	1	1,00			1,00			
	MPN	<i>R. fluitans</i>	Moosach	9	RAPD	3	0,722	0,333	0,895	0,5				
			Wolnzach	11	RAPD	8	0,891	0,727						
		Sediment	Moosach	11	RAPD	8	0,927	0,727	0,958	0,563				
			Wolnzach	21	RAPD	12	0,929	0,571						

Spezies	Anreicherung	Habitat		Isolate	Typen	Anzahl Typen	D ¹	Q ²	D _{habitat} ³	Q _{habitat} ⁴	D _{ges} ⁵	Q _{ges} ⁶
neue Spezies	400 x 0,1g	<i>R. fluitans</i>	Okt 2009	2	RAPD	2	1,00	1,00	0,843	0,555		
			Apr 2010	16	RAPD	7	0,625	0,438				
				16	AFLP	5	0,600	0,312				
				16	AFLP+RAPD	7	0,625	0,438				
	200 x 0,1g	Sediment	Sep 2009	106	RAPD	48	0,942	0,453				
				103	(GTG)5	41	0,911	0,398				
103				RAPD+(GTG)5	59	0,963	0,573					

¹ Simpson Diversitätsindex

² Quotient aus der Anzahl von RAPD Typen / die Anzahl von untersuchten Isolaten

³ Simpson Diversitätsindex bezogen auf die Habitate *R. fluitans* und Sediment

⁴ Quotient RAPD Typenanzahl / Isolatanzahl bezogen auf die Habitate *R. fluitans* und Sediment

⁵ Simpson Diversitätsindex von allen Isolaten einer Spezies

⁶ Quotient RAPD Typenanzahl / Isolatanzahl von allen Isolaten einer Spezies

Tab. 3.22 Simpson Diversitätsindizes D und Verhältniszahlen Q aus der Anzahl von RAPD-Typen / Isolatanzahl von *Listeria* Spezies bei den untersuchten Habitaten Sediment und *R. fluitans* sowie bei den Standorten Moosach und Wolzach (beides Fließgewässer). Unter D_{ges} bzw. Q_{ges} (ges = gesamt) ist die RAPD-Biodiversität aller untersuchten Isolate je Spezies zusammengefasst.

3.4.6.1 Probenbezogene Diversität von *Listeria* Spezies

Bei den verschiedenen untersuchten Proben (MPN Ansätze vom Jahreslauf und 0,1 g Anreicherungen) war die Biodiversität der *Listeria* Spezies z. T.: sehr unterschiedlich. Bei den 200 x 0,1 g Anreicherungen von Sediment war die Biodiversität bei den beiden durchgeführten Beprobungen bereits auf Speziesebene verschieden. So wurde im September 2009 *L. innocua* und im März 2010 neue *Listeria* Spezies nicht nachgewiesen (Abb. 3.26). Demgegenüber war die Speziesdiversität auf *R. fluitans* bei den beiden 400 x 0,1 g Versuchen identisch.

Innerhalb einer Spezies konnten sowohl bei den 0,1 g Anreicherungen als auch bei den MPN Proben z. T. deutliche Diversitätsunterschiede festgestellt werden (z. B. *L. monocytogenes* bei den 200 x 0,1 g Anreicherungen vom Sediment $D = 0,355$ und $D = 0,626$, *L. monocytogenes* bei den MPN *R. fluitans*-Anreicherungen von der Moosach $D = 0,582$ und $D = 0,200$ oder *L. innocua* bei den MPN *R. fluitans*-Anreicherungen von der Wolnzach $D = 0,792$ und $D = 0,476$).

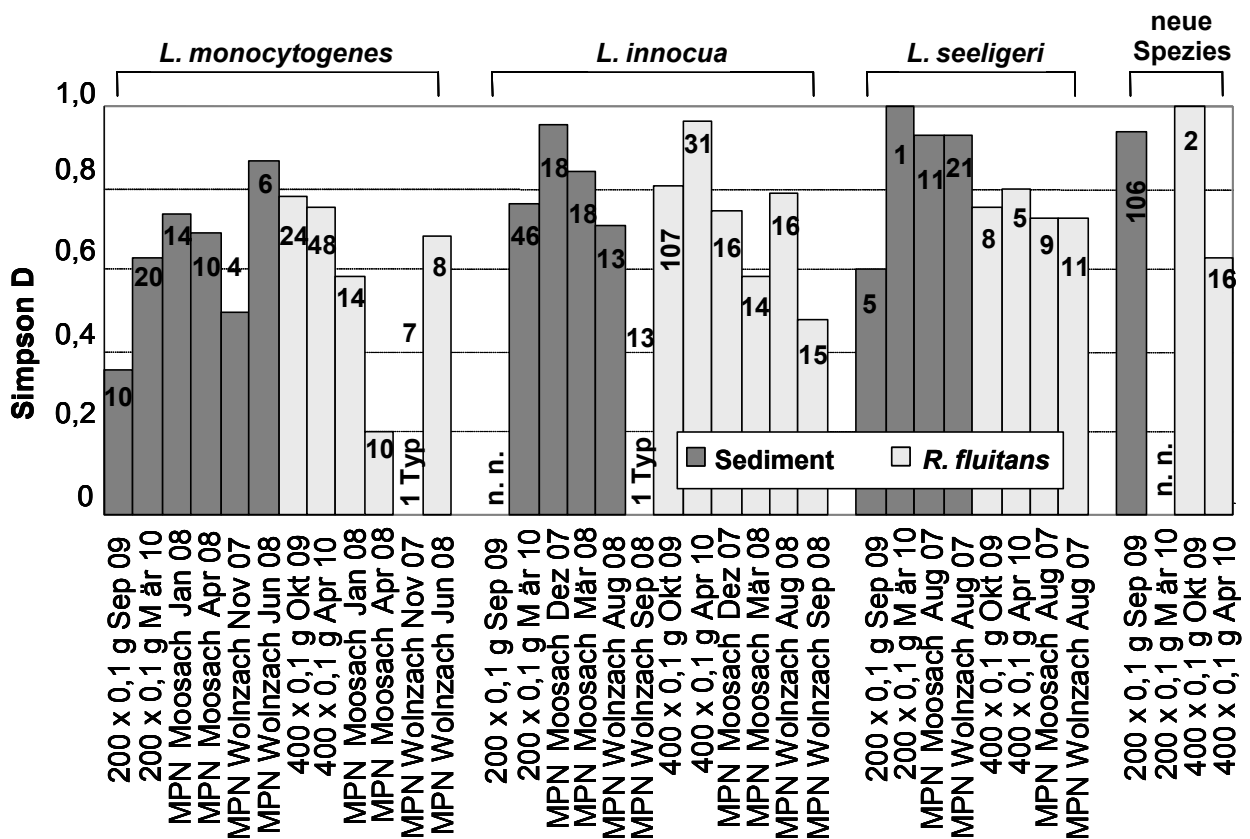


Abb. 3.26 RAPD Typen-Biodiversität von *Listeria* Spezies von den untersuchten Sediment- und *R. fluitans*-Proben bei unterschiedlichen Anreicherungsverfahren (0,1 g Anreicherungen

und MPN Ansätze). Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl untersuchter Isolate an. n. n. = nicht nachgewiesen.

In den einzelnen Proben waren die Spezies *L. monocytogenes* und *L. innocua* teilweise sehr ähnlich, teilweise aber auch sehr unterschiedlich divers, so dass insgesamt kein probenbezogener Trend feststellbar war. Durchwegs am höchsten war die Diversität tendenziell bei *L. seeligeri* Isolaten, was aber auch in Zusammenhang mit der meist sehr geringen Anzahl von untersuchten Isolaten stehen könnte. Bei den neuartigen Spezies waren die vorliegenden Ergebnisse zu lückenhaft, um beweiskräftige Schlüsse ziehen zu können. Bei dieser Gruppe handelt es sich sehr wahrscheinlich um mehr als nur eine Spezies, was vermutlich mit ein Grund ist für die speziell in der Sedimentprobe vom September 2009 detektierten, sehr hohen Diversität (siehe Kapitel 3.5 dieser Arbeit „Beschreibung und Phylogenie von neuen *Listeria* Spezies“).

Die Wiederfindung von RAPD Typen war bei den untersuchten Proben insgesamt relativ gering. Bei den 0,1 g Anreicherungen konnte bei den beiden Wiederholungsansätzen 1 *L. monocytogenes*-RAPD Typ in Sediment und 1 *L. innocua*-RAPD Typ bei *R. fluitans* erneut detektiert werden. Während der erneut detektierte Typus vom Sediment in der Septemberprobe 9 mal und in der Märzprobe 8 mal nachgewiesen wurde, war der wieder isolierte Typ von *R. fluitans* in beiden Proben nur 1 mal vertreten gewesen. Kein RAPD-Typ von *L. seeligeri* wurde wiederholt nachgewiesen. Bei den MPN Anreicherungen kamen bei keinem der beiden Standorte *L. monocytogenes*-RAPD Typen erneut vor. Bei *L. innocua* wurde bei den Wolnzach-Proben 1 Typ in Sediment und 1 Typ auf *R. fluitans* wieder detektiert. Ein weiterer *L. innocua*-RAPD Typ, der im Dezember 2007 auf *R. fluitans* aus der Moosach isoliert wurde, konnte auch in der Sedimentprobe von März 2008 nachgewiesen werden.

3.4.6.2 Biodiversität von *Listeria* Spezies auf *R. fluitans* und in Sediment

Die Matrices Sediment und *R. fluitans* stellen grundsätzlich sehr unterschiedliche ökologische Habitate z. B. in Bezug auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen oder Sauerstoff dar, was die Biodiversität der einzelnen Spezies in diesen unterschiedlichen Bereichen beeinflussen könnte. In nachfolgender Tabelle

ist jeweils die Biodiversität von RAPD-Typen der Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri* in den beiden untersuchten Habitaten aufgelistet (Tab. 3.23).

Spezies	Habitat	Anzahl Isolate	Anzahl RAPD Typen	D	Q	Anzahl von Typen, die in 2 Habitaten nachgewiesen wurden
<i>L. monocytogenes</i>	<i>R. fluitans</i>	111	18	0,858	0,162	1
	Sediment	64	18	0,891	0,281	
<i>L. innocua</i>	<i>R. fluitans</i>	199	46	0,948	0,231	3
	Sediment	108	37	0,953	0,343	
<i>L. seeligeri</i>	<i>R. fluitans</i>	33	17	0,949	0,515	4
	Sediment	37	20	0,955	0,540	

Tab. 3.23 Biodiversität von *Listeria* Spezies in den Habitaten *R. fluitans* und Sediment. Die Isolate wurden aus 0,1 g- und MPN-Anreicherungen isoliert, wobei die MPN- Isolate aus aus 2 unterschiedlichen Fließgewässern stammten. D = Simpson Diversitätsindex, Q = Verhältnis Typenanzahl / Isolatanzahl.

Die Diversität der detektierten Populationen war in beiden Habitaten jeweils sehr ähnlich, wobei bei beiden Matrices die Diversität nach Simpson von *L. monocytogenes* Isolaten im Vergleich zu *L. innocua*- und *L. seeligeri*-Isolaten geringfügig niedriger war (Abb. 3.27).

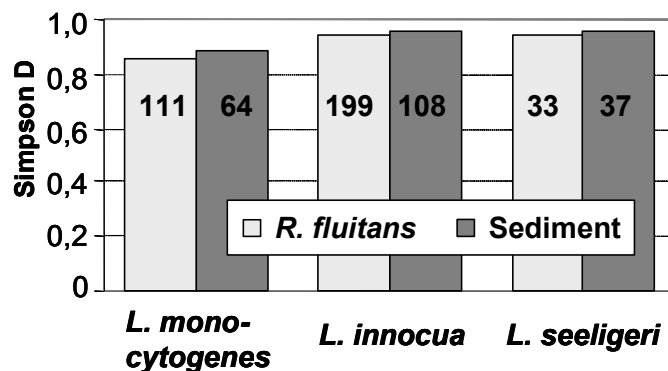


Abb. 3.27 Diversität von *Listeria* Spezies bei RAPD Typisierung in Sediment und auf *R. fluitans*. Die Zahlen in den Balken beziffern die Anzahl der untersuchten Isolate.

Insgesamt konnten 1 *L. monocytogenes* RAPD-Typ, 3 *L. innocua*- und 4 *L. seeligeri* RAPD-Typen aus beiden Matrices isoliert werden. Da nur wenige Überlappungen zwischen den beiden Habitaten festgestellt wurden, könnte dies darauf hindeuten, dass die untersuchten Sediment- und *R. fluitans*-Isolate jeweils weitgehend unterschiedlichen Populationen angehören.

3.4.6.3 Gesamte Biodiversität von *Listeria* Spezies

Schließlich wurde untersucht, wie hoch die Diversität der einzelnen Spezies im Gesamten war und inwieweit identische RAPD Typen in unterschiedlichen Standorten vorkamen. In Tab. 3.24 ist die Gesamtanzahl von Isolaten je Spezies aufgelistet, die bei den 0,1 g Anreicherungen plus den MPN Anreicherungen vom Jahreslauf untersucht worden waren. Außerdem wurde die gesamte Diversität der Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri* kalkuliert (Tab.3.24).

Spezies	Anzahl Isolate gesamt	Anzahl RAPD Typen gesamt	D _{ges}	Q _{ges}	Anzahl von RAPD-Typen, die an 2 Standorten nachgewiesen wurden
<i>L. monocytogenes</i>	175	35	0,927	0,200	6
<i>L. innocua</i>	307	79	0,971	0,257	9
<i>L. seeligeri</i>	70	33	0,971	0,471	4

Tab. 3.24 Spezies-Biodiversität von *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri*. Die Isolate stammten von den Habitaten *R. fluitans* und Sediment aus zwei unterschiedlichen Fließgewässern.

Bei den untersuchten Isolaten waren die Simpson Diversitätsindizes sehr hoch, wobei die Diversität von *L. monocytogenes* mit $D = 0,927$ im Vergleich zu *L. innocua* und *L. seeligeri* Isolaten mit jeweils $D = 0,971$ geringfügig niedriger war. Zudem deutet die geringe Anzahl von RAPD Typen, die an unterschiedlichen Standorten vorkamen darauf hin, dass das Vorkommen von Subtypen hauptsächlich lokal begrenzt war. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Anzahl von RAPD Typen nicht unbedingt mit der Anzahl von untersuchten Isolaten zusammenhing. Obwohl bei der Spezies *L. seeligeri* die Anzahl von untersuchten Isolaten insgesamt deutlich am niedrigsten war (70 Isolate), konnten im Verhältnis zu *L. monocytogenes* und *L. innocua* deutlich am meisten RAPD Typen abgegrenzt werden ($Q = 0,471$). Bei den Spezies *L. monocytogenes* und *L. innocua* war das Verhältnis von RAPD-Typenanzahl zur untersuchten Isolatanzahl relativ ähnlich ($Q = 0,200$ und $Q = 0,257$).

3.4.6.4 Abschätzung der RAPD-Typenvielfalt auf Speziesebene

Bei den Proben, die zu Portionen á 0,1 g angereichert wurden, wurde bei *L. monocytogenes* und *L. innocua* anhand der nicht-parametrischen Schätzmethode nach Chao ACE die gesamte Typenvielfalt auf Speziesebene geschätzt (Tab. 3.25).

Spezies	Probe	Isolate	Typisierung	Anzahl Typen	Chao ACE
<i>L. monocytogenes</i>	Sediment Sep 2009	10	RAPD	1	1
	Sediment Sep 2009	10	(GTG)5	1	1
	Sediment Sep 2009	10	RAPD+(GTG)5	2	2
	Sediment Mär 2010	20	RAPD	5	6
	<i>R. fluitans</i> Okt 2009	24	RAPD	5	5
	<i>R. fluitans</i> Apr 2010	48	RAPD	11	12
	<i>R. fluitans</i> Apr 2010	43	AFLP	7	7
	<i>R. fluitans</i> Apr 2010	43	RAPD+AFLP	16	24
<i>L. innocua</i>	Sediment Sep 2009	nicht nachgewiesen			
	Sediment Mär 2010	46	RAPD	10	11
	<i>R. fluitans</i> Okt 2009	107	RAPD	16	17
	<i>R. fluitans</i> Apr 2010	31	RAPD	21	36
	<i>R. fluitans</i> Apr 2010	30	AFLP	19	33
	<i>R. fluitans</i> Apr 2010	30	RAPD+AFLP	29	94

Tab. 3.25 Schätzung der gesamten Typenvielfalt nach Chao ACE von *L. monocytogenes* und *L. innocua* in 20 g Sediment und auf 40 g *R. fluitans* auf der Basis unterschiedlicher Typisierungsmethoden. Die Schätzwerte wurden jeweils auf ganze Stellen gerundet.

Speziell bei den einfach typisierten Datensätzen lagen die Schätzungen recht nahe bei der tatsächlich beobachteten Anzahl von Typen. Auch bei dem Probensatz von *L. monocytogenes* Isolaten, die mit 2 Methoden typisiert worden waren, wich die Schätzung nicht deutlich ab (bei 43 untersuchten Isolaten 16 beobachtete und 24 geschätzte Typen). Bei den RAPD+AFLP typisierten *L. innocua* Isolaten konnten nahezu alle Isolate als unterschiedliche Typen abgegrenzt werden (bei 30 typisierten Isolaten 29 beobachtete Typen). Daher unterschied sich der Schätzwert (94 geschätzte Typen) deutlich von der beobachteten Anzahl von Typen.

Die Schätzung von RAPD Typen bezogen auf 20 g Probenmatrix aus den untersuchten Habitaten ergab bei beiden Spezies eine ähnliche Biodiversität (1 bzw. 6 *L. monocytogenes* RAPD Typen in 20 g Sediment und rund 3 bzw. 6 Typen auf 20 g *R. fluitans*; 11 *L. innocua* RAPD Typen in 20 g Sediment und rund 9 bzw. 18 Typen auf 20 g *R. fluitans*). Bezogen auf die Spezies wurde anhand Chao ACE bei *L. innocua* eine geringfügig höhere RAPD-Typen Biodiversität geschätzt als bei *L.*

monocytogenes. Im Durchschnitt wurden in 20 g Sediment und auf 20 g *R. fluitans* jeweils rund 4 *L. monocytogenes*-RAPD Typen geschätzt. Bei *L. innocua* wurden in Sediment durchschnittlich rund 6 RAPD Typen und auf *R. fluitans* rund 13 Typen geschätzt.

3.4.6.5 Abundanz von RAPD Typen

Sowohl bei den MPN- als auch bei den 0,1 g Anreicherungen kamen die identifizierten RAPD Typen bei den Spezies *L. monocytogenes* und *L. innocua* in ähnlicher Abundanz vor. Auch die *L. seeligeri* Isolate aus den MPN Anreicherungen zeigten ein vergleichbares Häufigkeitsmuster (Abb. 3.28). Der überwiegende Anteil der Typen wurde 1mal bzw. sehr selten detektiert, während Typen mit größerer Abundanz (mehr als 10 Isolate) bei allen Spezies nur vereinzelt vorkamen. Bei den *L. seeligeri* Isolaten aus den 0,1 g Anreicherungen war die untersuchte Anzahl von Isolaten insgesamt zu niedrig, um einen beweiskräftigen Vergleich ziehen zu können (Abb. 3.28).

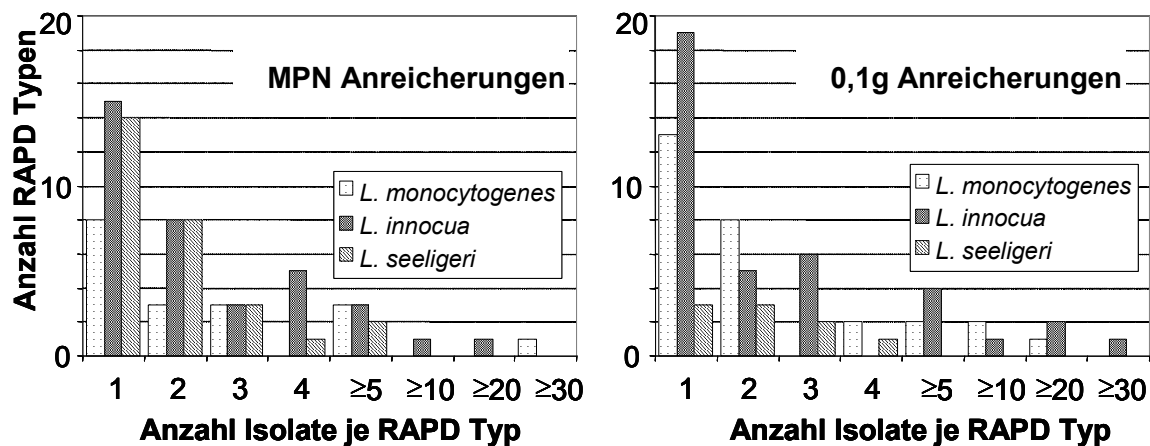


Abb. 3.28 Abundanz von RAPD Typen der Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri* bei MPN- bzw. bei 0,1 g Anreicherungen. Insgesamt wurden bei den MPN angereicherten Proben 73 *L. monocytogenes*, 123 *L. innocua* und 52 *L. seeligeri* Isolate untersucht, während bei den 0,1 g Anreicherungen 102 *L. monocytogenes*, 184 *L. innocua* und 19 *L. seeligeri* Isolate dargestellt sind. Die MPN Proben wurden in ½ Fraser Bouillon und die 0,1 g Proben in ½ Fraser und UVM II Medium angereichert.

Bei den MPN Anreicherungen konnten rund 45 % der Typen (37 von 82) nur 1mal nachgewiesen werden. Bei den 0,1 g Anreicherungen betrug der Anteil an singulären Typen rund 58 % (76 von 132). Insgesamt konnte trotz unterschiedlicher Anreicherungsverfahren ein ähnliches Muster bezüglich der Häufigkeit von unterschiedlichen RAPD Typen festgestellt werden.

3.5 Beschreibung und Phylogenie von neuen *Listeria* Spezies

3.5.1 16S rDNA Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei den verschiedenen Untersuchungen insgesamt 362 Isolate gewonnen, bei denen anhand der standardmäßig angewandten Identifizierungsmethoden wie Multiplex PCR oder API *Listeria* keine Speziesdifferenzierung möglich war. Im Vergleich von 16S rDNA Teilsequenzen mit Sequenzen der Internetdatenbank NCBI Blast konnte verifiziert werden, dass es sich mit einer Ähnlichkeit von 94 – 95 % um Isolate der Gattung *Listeria* handelte. Für rund 150 dieser Isolate wurde die 16S rDNA Teilsequenz bestimmt. Exemplarisch sind rund 40 dieser Sequenzen in Abb. 3.29 im Vergleich zu den 16S rDNA Teilsequenzen von *Listeria* Typstämmen sowie *Brochothrix thermosphacta* Typstamm T als Außengruppe dargestellt. Auf Basis der 16S rDNA Sequenzen waren die Isolate nahezu identisch und wurden zu der Spezies *L. rocourtiae* klassifiziert. Lediglich die Isolate WS 4560 und WS 4615 konnten deutlicher abgegrenzt werden (Abb. 3.29).

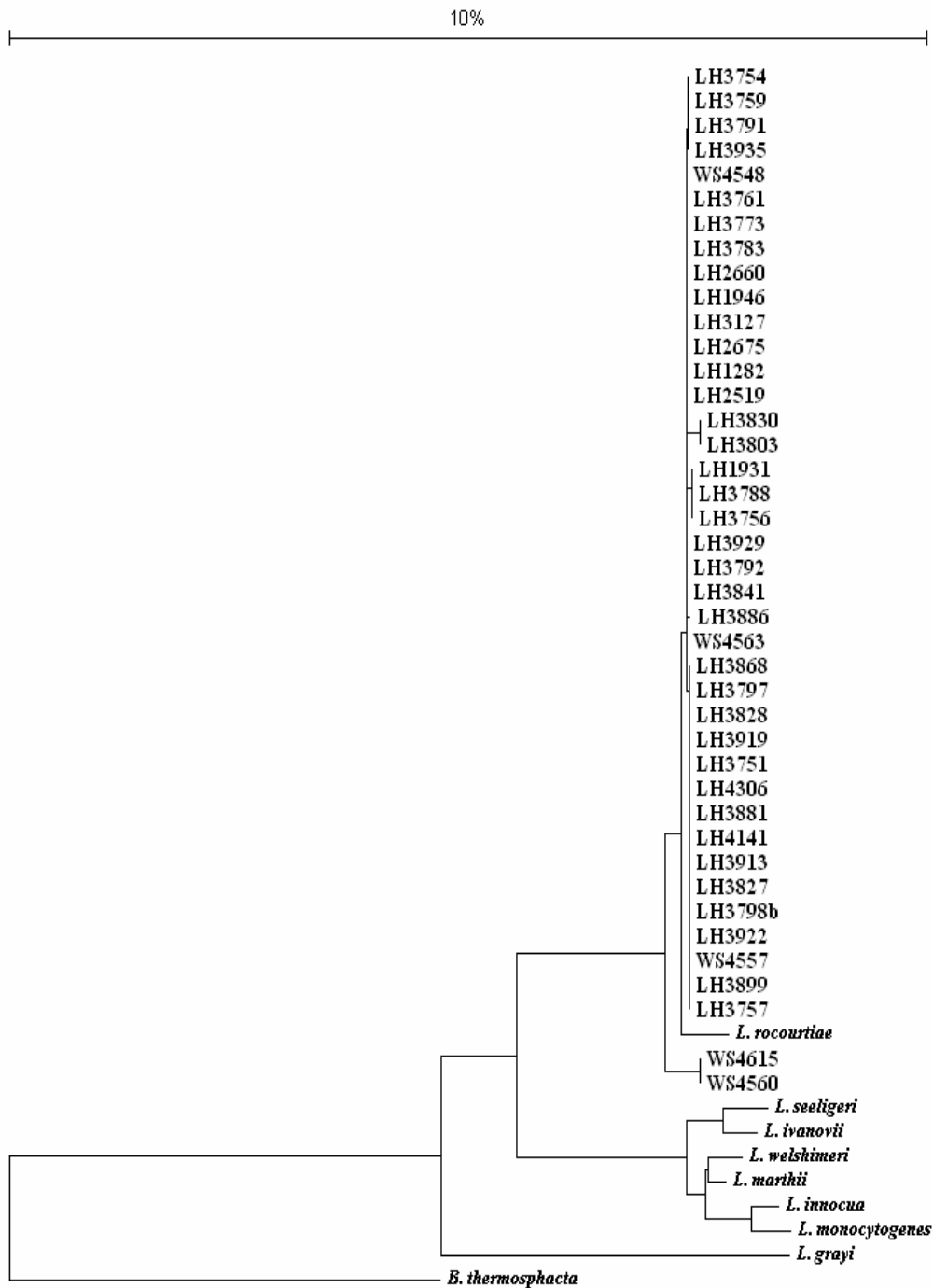


Abb. 3.29 16S rDNA Teilsequenzen (683 bp) von neuen *Listeria* Spezies und von *Listeria* Typstämmen. Der Balken indiziert 10 % Sequenzunterschiede.

3.5.2 RAPD Typisierung von neuen *Listeria* Spezies

Von den rund 360 nicht identifizierten Isolaten wurde eine Auswahl von rund 100 Isolaten getroffen und zur Prüfung auf Klonalität mit RAPD typisiert. Dabei wurde

eine recht hohe Diversität festgestellt, denn deutlich mehr als die Hälfte der Typen kamen nur 1mal vor. In Abb. 3.30 sind die RAPD Bandenprofile der Isolate WS 4560 und WS 4615 zusammen mit den Bandenprofilen der Typstämme von *L. monocytogenes*, *L. grayi* und *L. rocourtiae* dargestellt.

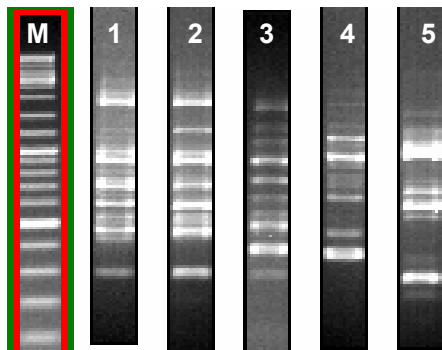


Abb. 3.30 RAPD Profile von *Listeria* Spezies:

M Marker

1 WS 4560

2 WS 4615

3 *L. monocytogenes* T

4 *L. grayi* T

5 *L. rocourtiae* T

3.5.3 DNA-DNA Hybridisierung

Ein wesentliches, gemeinhin gültiges Kriterium für die Abgrenzung von Spezies ist eine gesamtgenomische Ähnlichkeit von 70 % (Wayne, Brenner et al. 1987). Über DNA-DNA Hybridisierung kann die strukturelle Ähnlichkeit der Gesamt-DNA von zwei Organismen bzw. Isolaten ermittelt werden. In der Regel wird dazu die DNA von einem der beiden Isolate markiert und mit der unmarkierten Vergleichs-DNA des zweiten Isolates vermischt. Bei Inkubation der Mischung dissoziiert DNA und lagert sich beim Abkühlen unter Bildung von hybriden Doppelsträngen wieder aneinander. Je nachdem, wie hoch die Fraktion an korrekt komplementären Basenpaarungen im Hybrid ist, desto höher ist die für die Trennung in Einzelstränge erforderliche Temperatur, da bei perfekten Basenpaarungen mehr Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden als bei nicht optimal übereinstimmenden Paarungen. Anhand der erforderlichen Schmelztemperatur kann schließlich ermittelt werden, wie ähnlich die Nucleotidsequenzen der Hybrid-DNA sind. Gemäß Definition nach Wayne et al. (Wayne, Brenner et al. 1987) gehören Isolate mit einer gesamtgenomischen Ähnlichkeit von > 70 % der selben Spezies an. DNA-DNA Hybridisierungen von den Isolaten WS 4560 gegen WS 4557 und WS 4548 sowie WS 4557 gegen WS 4548 wurden vom Identifizierungsservice der DSMZ durchgeführt. Zudem wurde Isolat WS 4548 gegen *L. monocytogenes*, *L. grayi* und *B. thermosphacta* und die Isolate WS 4560, WS 4557, WS 4548, WS 4563 gegen *L.*

rocourtiae hybridisiert. Diese Ergebnisse sowie weitere Paarungen von *Listeria* Typstämmen und *B. thermosphacta* zu den bei 67 °C durchgeführten Hybridisierungsuntersuchungen sind in Tab. 3.26 aufgeführt.

DNA-DNA Ähnlichkeit %	WS 4557	WS 4548	<i>L. monocytogenes</i> T	<i>L. grayi</i> T	<i>L. rocourtiae</i> T	<i>B. thermosphacta</i> T
WS 4560	19,1 / 15,8	34,5 / 39,4			21,0 / 24,3	
WS 4557		51,9 / 45,1			39,9 / 41,6	
WS 4548			22,5 / 29,4	12,0 / 11,4	10,7 / 21,7	3,4 / 11,0
WS 4563					31,6 / 21,3	
<i>L. monocytogenes</i> T				5,6 / 13,2		12,3 / 5,3
<i>L. grayi</i> T						20,6 / 16,9

Tab. 3.26 Gesamtgenomische Ähnlichkeiten (% Anteile von jeweils doppelt bestimmten Messungen) ermittelt durch DNA-DNA Hybridisierung zwischen Typstämmen von *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. rocourtiae* und *B. thermosphacta* sowie neuen *Listeria* Spezies.

Bei den DNA-DNA Hybridisierungen wurden die Isolate erwartungsgemäß deutlich von *L. monocytogenes* und *L. grayi* abgegrenzt. Auch die gesamtgenomischen Ähnlichkeiten zu *L. rocourtiae* lagen z. T. sehr deutlich unter 40 %. Allerdings wiesen die drei getesteten Paarungen von neuen Spezies untereinander ebenfalls eine recht geringe DNA-DNA Ähnlichkeit von rund 17,5 % (WS 4560-WS 4557), 37 % (WS 4560-WS 4548) und 48,5 % (WS 4557-WS 4548) auf. Per Definition gehören demgemäß die drei getesteten Isolate ebenfalls nicht einer gemeinsamen Spezies an. Dadurch, dass bei den rund 100 RAPD – typisierten Isolaten eine sehr hohe Heterogenität festgestellt wurde, ist anzunehmen, dass bei den rund 360 isolierten Keimen noch weitere, neue *Listeria* Spezies identifiziert werden können.

3.5.4 Zell- und Koloniemorphologie

Für die Beschreibung einer neuen *Listeria* Art wurden die Isolate WS 4560 als Typstamm und WS 4615 ausgewählt. Das Isolat WS 4615 war zum selben Probenahmezeitpunkt aus der selben Probenmatrix wie WS 4560 isoliert worden. Die Zellform von Isolat WS 4560 war stäbchenförmig mit abgerundeten Enden und deutlich länger als bei bisher beschriebenen *Listeria* Arten (0,4 – 0,5 µm breit und 2 – 4,6 µm lang). Zur Bestimmung der Zellgröße wurden jeweils nach einer 24stündigen Kultivierung bei 30 °C in BHI Bouillon jeweils 100 Zellen mikroskopisch vermessen. Bei den bekannten Spezies war die Streuung der Zellgrößen relativ gering, während die Längen der Zellen bei *L. rocourtiae* und bei der neuen Spezies sehr variabel waren. In Abb. 3.31 sind die Zellgrößen von *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. rocourtiae* und WS 4560 dargestellt.

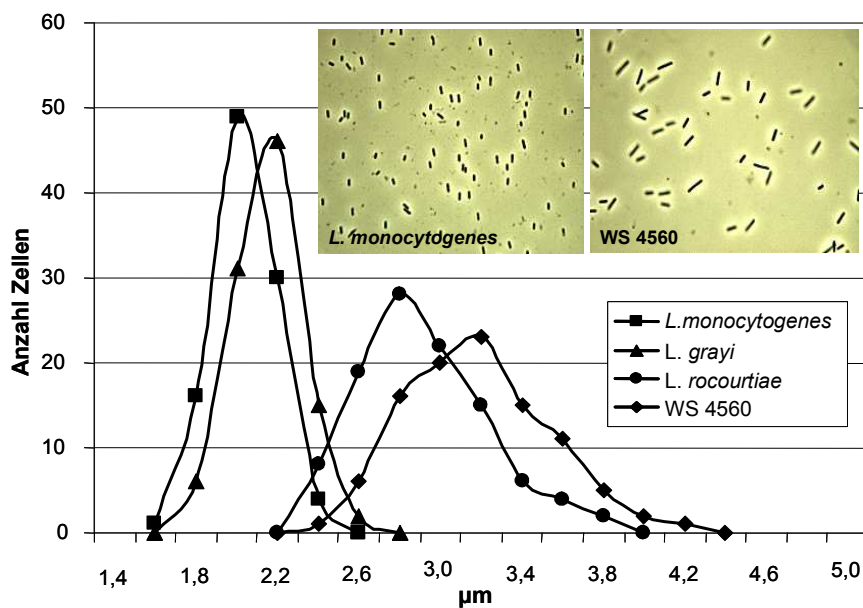


Abb. 3.31 Streuungsdiagramme zur Zellgrößenverteilung von *L. monocytogenes* WS 2301 T, *L. grayi* WS 2282 T, *L. rocourtiae* WS 4564 T und WS 4560 bei jeweils 100 gemessenen Zellen.

Auf CASO Agar bildete Isolat WS 4560 nach 48stündiger Bebrütung bis zu 2 mm große, weißlich durchscheinende, glatte Kolonien aus, die in der Mitte geringfügig erhöht waren und leicht unregelmäßige Umrandungen aufwiesen. Im Gegensatz zur typischen, eisblauen Erscheinung von *Listeria*-Kolonien bei der Beleuchtung im Schräglicht nach Henry (Einfallswinkel von 45 °) erschienen die Kolonien eher bläulich weiß. Auf PALCAM Agar wurden nach 48 h Bebrütung bei 30

°C 1 – 1,5 mm große, mehr graue als olivfarbene Kolonien mit rauer Oberfläche und unregelmäßigen Rändern ausgebildet. Das typische Merkmal von Listerien zur Ausbildung von dunklen, eingesunkenen Koloniezentren trat nach 48 h weniger ausgeprägt in Erscheinung. Auf LAOA Agar (Biorad) bildeten die Keime 1 – 2,4 mm große, hell türkis gefärbte Kolonien ohne Präzipitathöfe aus (Abwesenheit von Phospholipase C Aktivität).

3.5.5 Zellaufbau

Die Analysen zum Zellaufbau wurden vom Identifizierungsservice der DSMZ durchgeführt. Der ermittelte G+C-Wert der genomischen DNA von Isolat WS 4560 betrug 43,4 und von Isolat WS 4548 44,2 mol %. Das Analyseergebnis zu den respiratorischen Chinonen war bei Isolat WS 4548 zu 100 % MK7. Isolat WS 4548 enthielt meso-Diaminopimelinsäure (meso-Dpm) als diagnostische Diaminsäure des Peptidoglycans und gehörte somit zu dem für *Listeria* charakteristischen Peptidoglycantyp A1 γ (Schleifer and Kandler 1972). Die detektierten zellulären Fettsäuren waren meist unverzweigte gesättigte und ungesättigte Fettsäuremoleküle (Tab. 3.27).

Zelluläre Fettsäuren %	WS 4548	WS 4560	<i>L. monocytogenes</i> T	<i>L. grayi</i> T	<i>L. rocourtia</i> T	<i>B. thermosphacta</i> T
10:0	0,37	0,20	0,20	0,59	0,08	0,51
12:0	1,16	0,17	1,04	1,07	---	1,96
13:0 ANTEISO	0,11	0,36	0,15	---	0,18	0,49
13:0 ISO	---	---	---	---	---	0,16
14:0	1,05	1,29	1,30	0,67	0,96	6,74
14:0 ISO	0,58	0,62	0,54	2,07	0,84	0,80
14:0 ISO 3 OH	---	---	0,16	---	---	---
14:1 w5c	0,19	---	0,21	0,15	---	0,34
15:0 ISO	2,35	2,54	11,45	5,94	3,65	3,21
15:0 ANTEISO	46,29	65,83	40,87	31,94	57,29	62,24
15:0	0,25	---	0,19	0,57	0,18	---
16:0 ISO	2,06	1,52	2,35	11,74	3,07	1,03
16:0	5,05	3,49	2,06	2,11	5,18	6,84

17:0 ISO	1,34	0,52	4,76	2,52	1,10	0,18
17:0 ANTEISO	36,64	23,45	32,18	38,88	27,46	12,07
17:0	0,12	---	---	0,18	---	---
18:1 w9c	0,90	---	1,48	0,79	---	2,05
18:0	0,56	---	0,53	0,37	---	0,63
19:0 ANTEISO	0,58	---	---	0,19	---	---

Tab. 3.27 % Anteile der zellulären Fettsäuren von WS 4548, WS 4560 sowie von den Typstämmen von *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. rocourtiae* und *B. thermosphacta*. Die Analysen wurden vom Identifizierungsdienst der DSMZ nach Verborg et al. durchgeführt (Verborg, Fruhling et al. 2008).

3.5.6 Physiologische Charakterisierung

Die Physiologische Charakterisierung der Isolate wurde auf TS- bzw. BHI-Agar durchgeführt. Bei den Untersuchungen zum Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen wurde das Ergebnis als positiv befunden, wenn sich innerhalb von 7 d deutlich sichtbare Einzelklonien entwickelten. Demgemäß konnten die Keime bei Temperaturen von 4 – 30 °C (WS 4560) bzw. 4 – 37 °C (WS 4615) wachsen. In halbfestem BHI Medium (0,2 % Agar) zeigten die Keime leichte Motilität bei Temperaturen zwischen 22 und 30 °C. Eine deutlich sichtbare Trübung von BHI Bouillon war in einem pH Bereich von 5,0 – 9,5 erkennbar. Die Isolate WS 4560 und WS 4615 zeigten in BHI Bouillon mit 10 % NaCl (w/v) kein Wachstum. Bei Inkubation in BHI Bouillon mit 5 % Erythrozyten aus Schafsblut konnte keine hämolytische Aktivität festgestellt werden. Die Isolate waren Oxidase negativ und Katalase positiv. Beim Methylrot Test konnte eine positive und beim Voges-Proskauer Test eine negative Reaktion nachgewiesen werden. Unter anaeroben Bedingungen wurden auf TS Agar nach 48 h 0,5 – 1,0 mm große Kolonien ausgebildet. Beide Isolate reagierten negativ bei der im API Listeria enthaltenen DIM Reaktion (Differenzierung von *L. innocua* und *L. monocytogenes* durch Nachweis von D-Arylamidase Aktivität). Eine positive Reaktion konnte bei der Hydrolyse von Äskulin festgestellt werden. Außerdem bildeten WS 4560 und WS 4615 Säure aus D-Xylose, Rhamnose, Methyl- α -D-Glucopyranose und D-Arabitol. Die Resultate bei den Tests zur Säurebildung aus α -Mannosidase und D-Ribose waren negativ. Das anhand API *Listeria* ermittelte numerische Profil 6630 konnte keiner *Listeria* Spezies zugeordnet werden. Urease

und exogenes Citrat wurden nicht verstoffwechselt und es wurde weder Indol noch H₂S produziert. Die Isolate waren zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit befähigt. Bei dem Test zur Nitratreduktion erfolgte der Nachweis von Nitrit durch Umsetzung von Nitrat, was durch Rotfärbung bei Zugabe der Reagenzien A und B sichtbar wurde. Zudem wurden die Ansätze auf Gasbildung untersucht, was ebenfalls auf eine ablaufende Nitratreduktionsreaktion hingedeutet hätte. In keinem der Ansätze wurde Gasbildung beobachtet. Bei negativ getesteten Proben konnte jedoch nicht befunden werden, ob Nitrat entweder nicht umgesetzt wurde oder ob Nitrit als Zwischenmetabolit bereits weiter verstoffwechselt worden war. Deshalb wurden negativ getesteten Ansätzen etwa 5 mg Zinkstaub (Roth) zugesetzt um noch vorhandenes Nitrat chemisch zu Reduzieren.

Basierend auf den Ergebnissen von API 50CH (BioMérieux) wurde Säure aus folgenden Substraten gebildet: D-Glucose, D-Fruktose, Mannose, N-Acetyl-Glucosamin, Amygdalin, Arbutin, Salicin, Cellobiose, Maltose, Laktose, Trehalose, β -Gentibiose, Glycerin, L-Xylose, Stärke, Inosit, Xylit und Arabitol. Folgende Reaktionen waren im API 50CH negativ: α -Methyl-D-Glukosid, Erythrit, Adonitol, β -Methyl-Xylosid, L-Sorbose, Dulcitol, Sorbit, α -Methyl-D-Mannosid, Melibiose, Saccharose, Inulin, Melezitose, Raffinose, Glycogen, D-Turanose, D-Lyxose, D-Fucose, L-Fucose, L-Arabinose, D-Galaktose, Gluconat und 2-Keto-Gluconat. Eine schwach positive Reaktion wurde bei 5-Keto-Gluconat beobachtet.

Anhand der durchgeführten Analysen konnten eine ganze Reihe von Unterscheidungsmerkmalen zwischen den Isolaten WS 4560 bzw. WS 4615 und den bisher beschriebenen *Listeria* Spezies festgestellt werden (Tab. 3.24). So lag der ermittelte G+C-Wert der genomischen DNA mit 43,4 mol % bei WS 4560 etwas höher als bei beschriebenen *Listeria* Spezies. Laut Bergey's Manual of Systematic Bacteriology beträgt der DNA G+C Gehalt der bisher beschriebenen Spezies 36 – 42,5 mol %. Im Gegensatz zu den bekannten Spezies war bei Isolat WS 4548 das Analysenergebnis zu den respiratorischen Chinonen zu 100 % MK7. Bei Isolaten beschriebener Spezies kommen neben den Chinonen MK7 auch MK6 und MK5 in untergeordneten Mengenanteilen vor. Die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale zwischen WS 4560 und WS 4615 und den bisher beschriebenen *Listeria* Spezies sind in Tab. 3.28 aufgelistet.

Merkmal	WS 4560	WS 4615	<i>L. rocourtiae</i>	<i>Listeria sp.</i> ¹
Mol % G + C	43,4	n.u.	41,0	36 – 42,5
Respiratorische Chinone	100 % MK7	n.u.	100 % MK7	hauptsächlich MK7 auch MK6 und MK5
Reduktion von Nitrat	positiv	positiv	positiv	negativ
D-Arylamidase (DIM API Listeria)	negativ	negativ	positiv	positiv, außer <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. marthii</i>
Wachstum bei 37 °C	negativ	positiv	positiv	positiv
Zelllänge µm	Ø 3,2	Ø 3,2	Ø 2,8	Ø 1,9 <i>L. monocytogenes</i> Ø 2,2 bei <i>L. grayi</i>
Wachstum in BHI mit 10 % NaCl	negativ	negativ	negativ	positiv
Säurebildung aus Inosit	positiv	positiv	negativ	negativ
Säurebildung aus α-Methyl-D-Mannosid	negativ	negativ	positiv	variabel
Säurebildung aus Melibiose	negativ	negativ	positiv	negativ
Säurebildung aus Raffinose	negativ	negativ	positiv	negativ
Säurebildung aus D-Arabitol	positiv	positiv	negativ	variabel

¹ *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*

Tab. 3.28 Unterscheidungsmerkmale zwischen WS 4560 bzw. WS 4615 und *L. rocourtiae* sowie bisher beschriebenen *Listeria* Spezies. n. u. = nicht untersucht.

3.5.7 Physiologische Variabilität von Isolaten neuartiger *Listeria* Spezies

Insgesamt wurden rund 30 Isolate biochemisch bezüglich der Fermentation von 50 Kohlehydraten getestet (API 50 CHB/E, bioMérieux), wobei die Tests je Isolat 2fach durchgeführt wurden. Dabei konnte festgestellt werden, dass es sich bei den neuartigen Isolaten hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften um eine sehr heterogene Gruppe handelte. So waren die Reaktionsergebnisse bei einer Reihe von biochemischen Tests (z. T. auch zwischen den Isolaten WS 4560 und WS 4615) unterschiedlich. In Tab. 3.29 sind auszugsweise die Testergebnisse aufgelistet, die bei 5 Isolaten unterschiedlich waren.

API 50 CHB/E	WS 4560	WS 4615	WS 4548	WS 4557	WS 4563	<i>L. rocourtiae</i>
Glycerin	+	(+)	(+)	-	-	+
D-Arabinose	-	-	-	(+)	(+)	-
L-Arabinose	-	-	-	+	-	-
Ribose	+	+	+	-	-	+
D-Xylose	+	+	+	-	-	+
β Methyl-D-Xylosid	(+)	-	-	-	-	-
D-Galaktose	(+)	-	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	+	-	-
Inosit	+	+	-	-	-	-
Sorbit	-	-	-	+	-	-
Maltose	+	+	+	-	-	+
Lactose	+	+	+	-	-	+
Melibiose	-	-	+	-	-	+
Amidon (Stärke)	+	+	+	-	-	+
Glycogen	+	(+)	+	-	-	+
Xylit	+	+	+	-	-	+
D-Turanose	-	-	+	-	-	(+)
D-Arabitrol	+	+	+	-	-	-

Tab. 3.29 Biochemische Reaktionen bei den Isolaten WS 4560, WS 4615, WS 4548, WS 4557 und WS 4563, die im API 50CHB/E Test bei anaerober Bebrütung variabel getestet wurden. Die Untersuchungen wurden jeweils doppelt durchgeführt. (+) = schwach positiv.

3.5.8 Genetische Klassifizierung

Die phylogenetische Position der Isolate WS 4560 und WS 4615 wurde anhand des Vergleiches von 16S rDNA Gesamtsequenzen mit den Sequenzen beschriebener *Listeria* Spezies unter Verwendung von *B. thermosphacta* als Außengruppe bestimmt. Dabei wurde wie bereits bei den 16S rDNA Teilsequenzen (Abb. 3.29) die Spezies *L. rocourtiae* (Leclercq, Clermont et al. 2010) zu den Isolaten aus dieser Arbeit gruppiert (Abb. 3.32). Basierend auf den 16S rDNA Gesamtsequenzen lagen die Isolate WS 4560 und WS 4615 zusammen mit *L. rocourtiae* phylogenetisch zwischen *L. grayi* und den bisher beschriebenen *Listeria* Spezies.

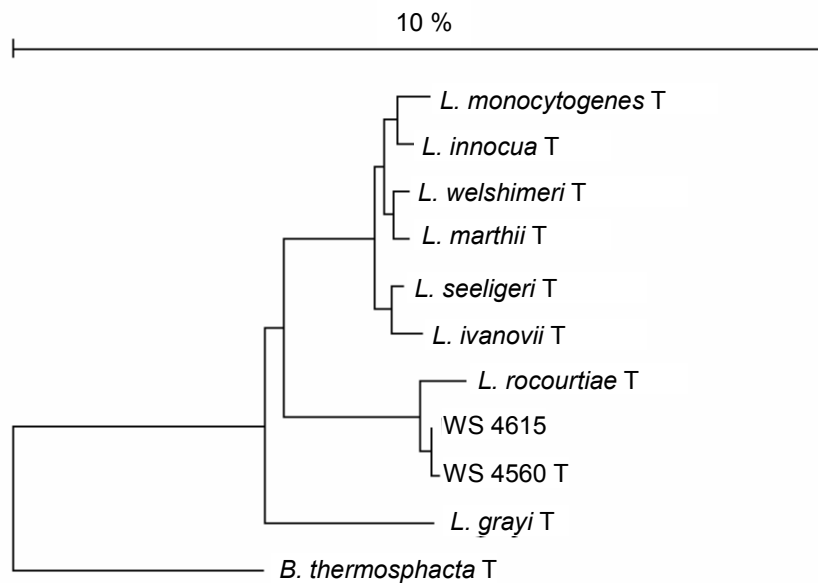


Abb. 3.32 Phylogenetische Position von den Isolaten WS 4560 und WS 4615 basierend auf 16S rDNA Gesamtsequenzen (1412 bp). Der Balken indiziert 10 % Sequenzunterschiede

Zudem wurden 4 weitere Genloci ausgewählt und Abschnitte davon amplifiziert. Die gewählten Loci waren *prs* (Phosphoribosyl Pyrophosphat Synthetase), *recA* (Rekombinase A), *sigB* (Stress responsive alternative Sigma Faktor B) und *groEL* (Chaperonin, gehört zur Klasse der 60 kDa Hitzeschockproteine und ist bei der Faltung von nativen Proteinstrukturen involviert). *prs* und *recA* sind Gene, die für die Aufrechterhaltung allgemeiner Zellfunktionen verantwortlich sind (housekeeping genes). Die letzteren beiden Gene sind so genannte stress response genes und werden im Zuge spezifischer umweltbedingter Adaptationsmechanismen exprimiert. Fragmente dieser Gene wurden bereits bei anderen Studien zur Typisierung von Listerien und anderer Genera herangezogen (Goh, Potter et al. 1996; Cai, Kabuki et al. 2002; da Mota, Gomes et al. 2005; Nightingale, Windham et al. 2005; Graves, Hesel et al. 2009). Die Sequenzen von 16S rDNA sind bei *Listeria* generell hoch konserviert und erlauben speziell bei *L. monocytogenes* und *L. innocua* nicht immer eine zuverlässige Speziesidentifizierung (Collins, Wallbanks et al. 1991), (Sallen, Rajoharison et al. 1996). Durch das Aneinanderhängen von Genfragmenten mit höherer intraspezieller Sequenzvariabilität konnten alle Stämme deutlicher voneinander abgegrenzt werden. Auch die Distanz von neuen *Listeria* Spezies zu *L. rocourtiae* konnte dabei deutlich vergrößert werden. Dadurch dass die aneinandergeschlossenen Sequenzfragmente insgesamt die phylogenetische

Positionierung der 16S rDNA Sequenzen widerspiegeln, wurde die Zugehörigkeit zur Gattung *Listeria* eindeutig untermauert (Abb. 3.33).

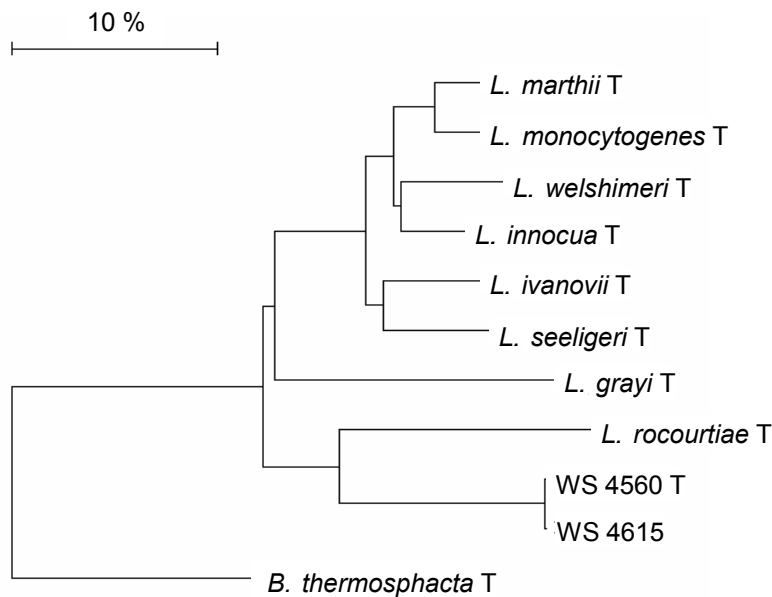


Abb. 3.33 Phylogenetische Position von den Isolaten WS 4560 und WS 4615 basierend auf konkatenierten Sequenzen von Fragmenten der Gene *prs*, *recA*, *sigB* und *groEL* (insgesamt 1685 bp). Der Balken indiziert 10 % Sequenzunterschiede.

Die Ergebnisse von DNA-DNA Hybridisierungen gegen *L. rocourtiae* DSM 22097 bezeugten eindeutig die Berechtigung zur Definition einer neuen Spezies (rund 22 % gesamtgenomische Ähnlichkeit). Zudem erlauben 7 biochemische Merkmale die Unterscheidung von WS 4560 und *L. rocourtiae*, die den hier beschriebenen Isolaten die phylogenetisch nächst verwandte Spezies darstellt (Tab. 3.27). Für die neue Spezies wird die Bezeichnung *Listeria weihenstephanensis* sp. nov. mit dem Typstamm *L. weihenstephanensis* WS 4560 (LH2199) vorgeschlagen.

4 Diskussion

4.1 Vergleich von selektiven Anreicherungsmedien

Die Isolierung von Listerien aus Matrices natürlicher Umweltproben ist vielfach beschrieben (Welshimer 1968; Welshimer and Donker-Voet 1971; Weis and Seeliger 1975; Watkins and Sleath 1981; Colburn, Kaysner et al. 1990; Arvanitidou, Papa et al. 1997; Schaffter and Parriaux 2002; Moshtaghi, Garg et al. 2003; Schaffter, Zumstein et al. 2004; Paillard, Dubois et al. 2005; Lyautey, Lapen et al. 2007). Ziel der Studien war in erster Linie der qualitative Keimnachweis, wobei Nachweisverfahren, Anreicherungsmedien und Anzahl von untersuchten Isolaten sehr variierten. Aus mehreren Untersuchungen geht hervor, dass das Anreicherungsverfahren einschließlich des eingesetzten Mediums das Procedere zum Nachweis von Listerien maßgeblich beeinflussen kann. Der Zusammensetzung bzw. der Selektivität eines Anreicherungsmediums wird demnach ein entscheidender Einfluss auf Anreicherung und Detektion bestimmter *Listeria* Spezies zugesprochen (Warburton, Farber et al. 1991; Hayes, Graves et al. 1992; Bernagozzi, Sacchetti et al. 1995; Ryser, Arimi et al. 1996; Bouttefroy, Lemaitre et al. 1997). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten somit sowohl die Inzidenz (durch das gewählte Anreicherungsverfahren), als auch die Diversität von Listerien (durch die Auswahl bzw. Anzahl der gepickten Isolate) ungenau widerspiegeln (Oliver, Wiedmann et al. 2007). Daher sind Studien zum Vorkommen von Listerien in natürlichen Umwelthabitaten nur bedingt vergleichbar.

4.1.1 Keimzahlen

Trotz der weiten Verbreitung in natürlichen Habitaten kommen Listerien meist in sehr geringen Keimzahlen und im Beisein einer immensen Begleitflora vor (Torsvik, Salte et al. 1990; Fierer and Jackson 2006). Generell sind Nachweismethoden, die einen selektiven Anreicherungsschritt vorsehen, speziell dann problematisch, wenn die Zielkeime in der Probe sublethal geschädigt sind oder von Keimen der Begleitflora überwachsen werden könnten. Für die Anreicherung von Listerien stehen verschiedene Anreicherungsverfahren und –medien zur Verfügung, wobei generell

gilt, dass eine Anreicherungsprozedur allein mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit nicht alle Listerien in einer Probe detektiert (MacDonald and Sutherland 1994). Die Quantifizierung von *Listeria* war in den untersuchten Matrices aufgrund der geringen erwarteten Keimzahlen im direkten Zählverfahren nicht möglich. Prinzipiell gilt der direkte quantitative Keimnachweis bei Proben mit einer Zellzahl der Zielkeime > 100 cfu / g als gesichert. Bei Unterschreiten dieser Grenze ist eine zuverlässige Quantifizierung über den Direktnachweis ungewiss, weshalb die Anwendung von MPN Analysen (Most Probable Number) gängige Praxis ist. Dabei wird durch mehrfachen Ansatz von Probenmaterial auf statistischem Wege die „wahrscheinlichste“ Keimzahl ermittelt. Allerdings stellen MPN Keimzahlen lediglich Annäherungen an die Größenordnung der Keimkonzentration in einer Probe dar und sind laut ISO 7218 von „geringer“ Präzision, so dass die ermittelten Werte als Näherungswerte mit relativ ausgedehnten Vertrauensbereichen angesehen werden müssen. Beispielsweise beträgt der Vertrauensintervall bei einer ermittelten MPN Zahl von 92 cfu/g 30 – 320 (EN ISO 7218:2005).

Bis auf die ONE-Broth Anreicherungen der Sedimentprobe differierten die ermittelten MPN Titer bei allen 3 Medien nicht wesentlich und bewegten sich in einem Bereich von rund 30 – 100 cfu / 10g. Eine Ausnahme bildete dabei die anhand ONE-Broth angereicherte Sedimentprobe, wobei eine Keimzahl von < 1 MPN / 10g festgestellt wurde. Bezüglich der Bestimmung von Keimzahlen kann insgesamt geschlossen werden, dass die Eignung der hier eingesetzten Medien (1/2 Fraser Medium, ONE Broth und UVM II Medium) für die Zählung von Listerien aus Umweltmatrices vergleichbar ist. Da die ermittelten MPN-Werte bei der *R. fluitans*-Probe mit allen 3 Medien ähnlich waren, erscheint auch die ONE-Broth-Fomulierung zur Anreicherung von Listerien aus dieser Probenmatrix zweckdienlich.

4.1.2 Detektion von *Listeria* Spezies

Von jeder positiv getesteten Anreicherung wurden maximal 5 Kolonien gepickt und untersucht. Durch die konstante Anzahl von Isolaten aus jeder Anreicherung sollte gewissermaßen die relative Verteilung von *Listeria* Spezies in den Anreicherungen ermittelt werden. Beim Isolieren wurde darauf geachtet, dass (sofern vorhanden) Kolonien unterschiedlicher Morphologien oder Färbungen ausgewählt

wurden, um die rein optisch erkennbare Biodiversität abzudecken. Die gewonnenen Isolate wurden mit Hilfe von FTIR-Spektroskopie bzw. Multiplex PCR identifiziert. Es wurde festgestellt, dass die anhand FTIR-Spektroskopie doppelt bestimmten Identifizierungsergebnisse oft nicht übereinstimmten. Zudem konnte anhand von Multiplex PCR Analysen festgestellt werden, dass in vielen Fällen selbst eindeutige FTIR-Identifizierungsergebnisse nicht zutreffend waren. Ein Grund für das Versagen des FTIR könnte sein, dass diese Umweltisolate bezüglich ihrer Zellzusammensetzung anders geartet sind, als die Referenzkeime in der Datenbank. Bei den meisten Isolaten in der Datenbank handelt es sich um klinische Isolate, um Lebensmittelisolate sowie um Isolate aus dem Produktionsumfeld lebensmittelverarbeitender Unternehmen. Es ist anzunehmen, dass die unmittelbare ökologische Umgebung an Kommensalen dieser Habitate andere Bedingungen stellt als an Mikroorganismen, die in natürlichen Gewässern vorkommen.

Speziell die Differenzierung von *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* war häufig problematisch, was mit den Oberflächen-Antigenstrukturen der Zellen in Zusammenhang stehen könnte. Die verschiedenen Serotypen kommen bei *Listeria* nicht speziesspezifisch vor, d. h. unterschiedliche Spezies können die selben Teichonsäure-Strukturen auf ihren Zelloberflächen aufweisen. So kommen 7 der 13 bei *L. monocytogenes* beschriebenen Serotypen auch bei *L. seeligeri* vor. In Tab. 4.1 sind die bisher bekannten Serotypen bei *Listeria* und ihr interspezifisches Auftreten dargestellt.

Spezies	Serovar															
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	3c	4a	4ab	4b	4c	4d	4e	5	6a	6b	7
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+
<i>L. innocua</i> *						+	+	+						+	+	
<i>L. seeligeri</i> *	+	+	+		+				+	+	+				+	
<i>L. ivanovii</i>													+			
<i>L. welshimeri</i>		+			+									+	+	

* sowie nicht bekannte

Tab. 4.1 Bisher bekannte Serotypen bei *Listeria* nach Seeliger et al. (Seeliger and Hohne 1979).

Der Großteil der Isolate wurden mit Hilfe von Multiplex PCR identifiziert. Die Differenzierung anhand von API *Listeria* bzw. 16S Sequenzierung wurde in Fällen

durchgeführt, wo anhand von Multiplex PCR kein Ergebnis erzielt werden konnte. Bei der Anreicherung von Sediment und *R. fluitans* mit drei unterschiedenen Medien konnten zumindest auf Speziesebene keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Die Detektion von verschiedenen *Listeria*-Spezies war bei ½ Fraser Bouillon und UVM II Medium - selbst was die prozentualen Anteile anbetrifft - bei beiden untersuchten Matrices sehr ähnlich. Bei den ONE-Broth Anreicherungen war der Hauptanteil der Isolate aus beiden Matrices *L. innocua*. Ob ONE-Broth tatsächlich die Akkumulation von *L. innocua* Keimen begünstigt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

4.1.3 Typisierung

Die Subtypisierung der Isolate erfolgte anhand von Clusteranalysen von FTIR-Spektren sowie anhand von RAPD PCR. In dieser Studie wurden die Primer M13, Eric2 und inIA.F simultan eingesetzt, wobei für diese Primer jeweils unterschiedliche genomische Bereiche als Targets dienen. M13 bindet an Regionen, die Micro- oder Minisatelliten enthalten, Primer Eric2 adressiert an repetitive DNA-Elemente im Genom und Primer inIA.F detektiert spezifische Gensequenzen (Chambel, Sol et al. 2007). Insofern werden über die Verwendung dieser Kombination von Primern unterschiedliche Genombereiche angesprochen. Anhand dieser Primerkombination konnten Profile mit bis zu 13 klar unterscheidbaren Banden in einer Größe von 100 - 3000 bp generiert werden.

Die beiden Typisierungsmethoden FTIR und RAPD wurden anhand der Berechnung von Diversitätsindizes nach Hunter et al. verglichen (Hunter and Gaston 1988). Eine Methode gilt umso sensativer, je mehr unterschiedliche Typen diskriminiert werden können. Entsprechend höher sind infolgedessen die jeweils ermittelten Diversitätsindizes. Typisierungsverfahren mit D - Werten ab > 0,90 gelten dabei als akzeptabel diskriminativ (Hunter and Gaston 1988). Bezogen auf die einzelnen Anreicherungsmedien konnten mit Hilfe von RAPD deutlich mehr Typen abgegrenzt werden als anhand von FTIR-Clusteranalyse, was beim Gegenüberstellen der jeweils ermittelten Diversitätsindizes deutlich wird (Tab. 4.2).

Matrix	½ Fraser		ONE Broth		UVM II	
	D RAPD	D FTIR	D RAPD	D FTIR	D RAPD	D FTIR
Sediment	0,938	0,903	0,733	0,777	0,938	0,875
<i>R. fluitans</i>	0,943	0,709	0,933	0,890	0,911	0,729

Tab. 4.2 RAPD- und FTIR-Diversitätsindizes nach Simpson bei *Listeria* Isolaten aus 3 unterschiedlichen Anreicherungsmedien.

Es ist auch bereits beschrieben, dass dem Anreicherungsmedium sowie dem Anreicherungsverfahren bei der Detektion von Listerien eine besondere Bedeutung zukommt. Loncarevic et al. detektierten anhand des direkten Nachweises mehrere unterschiedliche *L. monocytogenes* PFGE-Typen als bei Anreicherung der Proben (Loncarevic, Tham et al. 1996). Bouttefroy et al. detektierte aus den selben Probenmatrices z. T. unterschiedliche Phänotypen von *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* anhand der Anwendung unterschiedlicher Anreicherungsverfahren und –temperaturen (Bouttefroy, Lemaitre et al. 1997). Dabei waren die Typisierungsmethoden Serotypisierung, Resistenz gegenüber Cyclinen und Cadmium sowie Phagentypisierung angewandt worden. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden 64 % der detektierten RAPD-Typen nur aus einem der 3 angewandten Medien isoliert, während 16 % der Typen bei allen 3 Anreicherungslösungen nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse können auf eine Korrelation bezüglich der Detektion von Subtypen und dem jeweilig angewandten Selektionsmedium hindeuten. Bei Berücksichtigung der Tatsache, dass 29 der 68 nachgewiesenen RAPD Typen (43 %) nur 1mal vorkamen, besteht dieser Zusammenhang jedoch gezwungenermaßen. Singuläre RAPD Typen kamen dabei bei allen 3 Medien gleichermaßen vor. Eine kausale Schlussfolgerung ist daher nicht möglich.

Die in einer Probe enthaltene Begleitflora oder unter Umständen auch unterschiedliche *Listeria* Spezies selbst können während einer Anreicherungsprozedur kompetitive Wirkungen entfalten und sich gegenseitig in der Vermehrung beeinträchtigen (Petran and Swanson 1993; MacDonald and Sutherland 1994; Cornu, Kalmokoff et al. 2002; Bruhn, Vogel et al. 2005; Gorski, Flaherty et al. 2006; Oravcova, Trncikova et al. 2008). Bemerkenswert bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen war, dass nur bei 6 der 61 positiv getesteten Ansätze (ca.

10 %) alle Isolate identische RAPD Profile zeigten. In rund 75 % der Anreicherungen konnten 2 bis 4 Typen unterschieden werden und bei 9 Anreicherungen (ca. 15 %) zeigten alle gepickten Isolate einer Anreicherung unterschiedliche RAPD Profile. In 48 der positiv getesteten Anreicherungen (ca. 79 %) konnte mehr als eine *Listeria* Spezies nachgewiesen werden. Dies lässt zum einen darauf schließen, dass selbst bei der Anreicherung von Proben eine hohe Diversität detektiert wurde. Zum anderen bedeutet dies jedoch auch, dass anhand der gewählten Anzahl von Isolaten bei vielen Ansätzen vermutlich nur ein Teil der angereicherten Typen erfasst wurde.

4.2 Prävalenz und Diversität von *Listeria* Spezies im jahreszeitlichen Verlauf

4.2.1 Inzidenz

Über einen jahreszeitlichen Verlauf wurden an drei Standorten (2 Fließgewässer und 1 Standgewässer) die Probenmatrices Wasser, Sediment und Wasserpflanzen in monatlichen Abständen auf das Vorhandensein von Listerien untersucht. Dabei konnten im Durchschnitt 87,5 % der Moosach-Proben (Fließgewässer), 96 % der Wolnzach-Proben (Fließgewässer) sowie 80,5 % der Postweiher-Proben (Standgewässer) positiv auf das Vorhandensein von Listerien getestet werden. Diese Ergebnisse belegen, dass es sich bei den untersuchten Habitaten um stetig mit *Listeria* besiedelte Lebensräume handelte. Ein so häufiges Vorkommen von Listerien in natürlichen Umweltproben wurde bislang nicht oft beschrieben. Zwar konnten beispielsweise in 81 % der untersuchten Süßwasserproben Listerien nachgewiesen werden (Colburn, Kaysner et al. 1990). Diese Proben stammten aus dem Übergangsbereich von einem Süßgewässer zu Meerwasser und waren über den Zeitraum einer Winterperiode entnommen worden. Die Sedimentproben von diesen Gewässerproben waren zu 30,4 % positiv. Außerdem waren bei dieser Studie 62 % der untersuchten Salzwasserproben und nur 17,4 % der Sedimentproben aus dem Salzwasserbereich *Listeria*-positiv. Miettinen et al. testete über einen Zeitraum von 3 Jahren 65,4 % der Sedimentproben eines Fischzuchtbetriebes (Meerwasser) positiv auf *Listeria* (Miettinen and Wirtanen 2006). In einer weiteren Studie traten Listerien in 20,1 % der untersuchten Meerwasserproben über den Beobachtungszeitraum von einem Jahr

auf (El-Shenawy and El-Shenawy 2006). Das Vorkommen von Listerien war in den hier untersuchten Habitaten demzufolge vergleichsweise hoch.

Insgesamt untermauern die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchung die Schlussfolgerungen von Welshimer et al. über das gehäufte Auftreten von Listerien in vor Austrocknung geschützten Umweltmatrices bzw. in aquatischen Bereichen (Welshimer and Donker-Voet 1971). Vermutlich handelt es sich bei den in dieser Arbeit detektierten Listeriapopulationen in Sediment und auf Wasserpflanzen daher weniger um allochthone Kontaminationkeime als vielmehr um eine autochthone Keimflora.

4.2.2 Keimzahlen

Bis auf die wenigen Ausnahmen, wo die ermittelten MPN Nachweise $< 0,3$ bzw. > 110 / g betragen, bewegten sich die Keimzahlen über den Zeitraum der Probenahme in relativ konstanten Größenordnungen. Dies deutet darauf hin, dass das Vorkommen von Listerien in den untersuchten Habitaten keinen jahreszeitlich bedingten Einflüssen unterworfen war. Unseres Wissens ist bislang keine vergleichbare Langzeitstudie in Bezug auf die Entwicklung von Listerienkeimzahlen in natürlichen Umwelthabitaten durchgeführt worden. Bei den meisten Untersuchungen, die auch die Bestimmung von Listerienkeimzahlen aus Umweltmatrices einschließen, liegt der Focus in erster Linie auf die Detektion von *L. monocytogenes* und beschränken sich in der Regel auf okkasionelle Probenahmen (Watkins and Sleath 1981; Fenlon 1985; Bernagozzi, Bianucci et al. 1994; Paillard, Dubois et al. 2005). Die in den genannten Studien detektierten Keimzahlen sind im Wesentlichen mit den in dieser Arbeit ermittelten Titern vergleichbar.

Verschiedene Studien beschreiben das Auftreten von Listerien in Oberflächengewässern nach kräftigen Regenfällen und vermuten daher den Eintrag von Listerien über das Regenwasser durch Auswaschungseffekte von umliegenden Oberflächen (Botzler, Wetzler et al. 1973; Miettinen and Wirtanen 2006). Selbst dem Gefälle bzw. dem Neigungswinkel umliegender Gebiete zum limnischen Habitat wird eine gewisse Bedeutung zur Detektion von Listerien in Wasserproben beigemessen (Smith, Wickham et al. 2001; Ivanek, Grohn et al. 2009). Demgegenüber waren bei den hier untersuchten Gewässern die pelagischen Zellzahlen über den gesamten Beobachtungszeitraum niedriger als die MPN Werte von Sediment und

Wasserpflanzen. Anscheinend spielten die Böden der angrenzenden Oberflächen für den Eintrag von Listerien keine wesentliche Rolle. Diese Mutmaßung kann dadurch untermauert werden, dass bei gelegentlichen Untersuchungen von Boden- und Pflanzenproben von angrenzenden Flächen, bis auf eine Ausnahme, die Listeriennachweise stets negativ waren (Daten nicht aufgeführt). Es ist jedoch bekannt, dass Wasser an sich für das Überleben bzw. die Persistenz von Listerien ein wenig geeignetes Habitat darstellt (Botzler, Cowan et al. 1974). Es ist zudem beschrieben, dass der Mikrokosmos Wasser das Eintreten eines sogenannten VBNC Status (Viable But Not Culturable) bei *L. monocytogenes* begünstigt (Besnard, Federighi et al. 2002). Möglicherweise liegen z. T. auch darin die verhältnismäßig niedrigen Wasserkeimzahlen begründet.

4.2.3 Prävalenz von *Listeria* Spezies

Listeria Spezies wurden vielfach aus unterschiedlichen Probenmatrices isoliert, wobei die Diversität auf Speziesebene jeweils recht hoch war. In nachfolgender Aufstellung sind einige Studien zum Vorkommen von *Listeria* Spezies in natürlichen Umwelthabitaten aufgelistet (Tab. 4. 3).

Probenmatrix	<i>Listeria</i> Spezies	Referenz
Bodenproben	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i> <i>L. ivanovii</i> <i>L. welshimeri</i>	(Moshtaghi, Garg et al. 2003)
Bodenproben	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i> <i>L. seeligeri</i> <i>L. ivanovii</i> <i>L. welshimeri</i>	(MacGowan, Bowker et al. 1994)
Grasproben	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i> <i>L. seeligeri</i>	(Fenlon, Wilson et al. 1996)
Süßgewässer	<i>L. innocua</i> <i>L. seeligeri</i> <i>L. welshimeri</i>	(Frances, Hornby et al. 1991)
Süßgewässer	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i> <i>L. ivanovii</i> <i>L. welshimeri</i> <i>L. grayi</i>	(Bernagozzi, Bianucci et al. 1994)

Marine Habitate	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i> <i>L. welshimeri</i>	(Colburn, Kaysner et al. 1990)
Meerwasser	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i> <i>L. seeligeri</i> <i>L. ivanovii</i> <i>L. welshimeri</i>	(Rodas-Suarez, Flores-Pedroche et al. 2006)
Meerwasser	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i>	(El-Shenawy and El-Shenawy 2006)

Tab. 4.3 Vorkommen von *Listeria* Spezies in natürlichen Umwelthabitaten.

Bei den Studien von Tab. 4.3 waren die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. welshimeri* sehr häufig nachgewiesen worden. Bei den hier untersuchten Proben konnten die Spezies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* sehr häufig und *L. ivanovii* nur an 2 Standorten sporadisch und in sehr geringen Anteilen nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise war zudem bei allen 3 Standorten der Nachweis von neuen, noch nicht beschriebenen *Listeria* Spezies möglich.

Insgesamt waren in den Fließgewässern *L. innocua* und *L. monocytogenes* die konstant und stets in dominierendem Ausmaße detektierten Spezies. Auch *L. seeligeri* wurde relativ beständig über die gesamte Probenahmeperiode bei allen 3 Standorten detektiert. Mit Ausnahme von der Spezies *L. seeligeri*, bei der eine leicht erhöhte Abundanz in den Sommermonaten festgestellt werden konnte, konnten bei beiden Fließgewässern keine signifikanten, saisonal bedingten Veränderungen bezüglich der Komposition der Listerienpopulationen beobachtet werden. Dies steht im Einklang zu den Ergebnissen von MacGowan et al. (MacGowan, Bowker et al. 1994). Dabei waren bei der Untersuchung von Bodenproben aus urbanen Gärten ebenfalls keine saisonal bedingten Tendenzen erkennbar.

Bei den Proben aus dem Standgewässer war zwar insgesamt *L. seeligeri* die überwiegende Spezies, insgesamt aber waren die Florazusammensetzungen über den Jahreslauf an diesem Standort sehr different. Bei den Wasserpflanzen könnte dies damit zusammenhängen, dass unterschiedliche Pflanzenmatrices beprobt wurden. Die Sedimentproben wurden zwar an einer definierten Probenahmestelle entnommen, aber die Beschaffenheit der Proben änderte sich ebenfalls gemäß den entsprechenden Vegetationsperioden. So waren die Sedimentproben z. T. von vermodernden Pflanzenteilen durchsetzt. Insgesamt geben die Ergebnisse der

Untersuchungen aus dem Postweiher daher eher punktuelle Erfassungen als longitudinale Tendenzen wider.

Im Gegensatz zum Probenahmeort Moosach wurde ein am Probenahmeort Wolnzach angrenzendes Grundstück in den Sommermonaten als Weidefläche für Rinder genutzt. Die Spezies *L. ivanovii* wurde lediglich in den Standorten Wolnzach und Postweiher nachgewiesen. Moshtaghi et al. detektierte diese Spezies nur aus Bodenproben landwirtschaftlicher Nutzflächen (Moshtaghi, Garg et al. 2003). Zumal bei unseren Untersuchungen auch in der Nähe vom Standgewässer *L. ivanovii* nachgewiesen wurde, konnte aufgrund der insgesamt sehr geringen Prävalenz kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Nutztierhaltung und dem Vorkommen dieser Spezies hergestellt werden.

Lyautey et al. beobachteten eine statistisch signifikante Beeinflussung zwischen einem Milchviehbetrieb bzw. von agrartechnischen Nutzflächen und dem Vorkommen von *L. monocytogenes* in Oberflächengewässern (Lyautey, Lapen et al. 2007). Bei der hier durchgeführten Studie waren die beiden untersuchten Fließgewässer bezüglich Nutztierhaltung unterschiedlichen Einflüssen unterworfen. Da sich jedoch die Populationen von *L. monocytogenes* in Bezug auf Vorkommen und Umfang nicht wesentlich unterschieden, war bei den beiden Standorten kein Zusammenhang zwischen Tierhaltung und der Inzidenz von bestimmten *Listeria* Spezies erkennbar.

4.2.4 Ursprung von *Listeria* Spezies auf *R. fluitans*

Es ist bekannt, dass *L. monocytogenes* und *L. innocua* in ihren Genomen jeweils mit einem ungewöhnlich hohen Anteil regulatorischer Gene ausgestattet sind. So kodieren beispielsweise über 200 Gene (ca. 7 % des Gesamtgenomes) für Transkriptionsregulatoren und weitere 331 Gene (ca. 11,6 %) allein für den Transport von Kohlehydraten (Glaser, Frangeul et al. 2001; Buchrieser, Rusniok et al. 2003). Eine derartige genetische Ausstattung weist auf eine sehr hohe Flexibilität bezüglich der Adaptation an unterschiedlichste Umweltbedingungen hin, die es *Listerien* ermöglicht, sich in unterschiedlichsten ökologischen Habitaten zu etablieren. Die durchschnittliche Spezies-Verteilung in Sediment und *R. fluitans* war insbesondere beim Probenahmeort Moosach sehr ähnlich (Abb. 3.9). Dies ist insofern bemerkenswert, als dass diese beiden Matrices grundsätzlich verschiedene Habitate

in Bezug auf die Verfügbarkeit von Sauerstoff und Nährsubstraten sowie auch hinsichtlich kompetitiver Begleitfloren darstellen (Ivanek, Grohn et al. 2009). Speziell auffällig war dies in den Monaten November, Dezember, Januar, März, April, Juli und Oktober am Probenahmeort Moosach und in den Monaten Juni, Juli, August und September am Probenahmeort Wolnzach (Abb. 3.8). Die ermittelten Daten vom Probenahmeort Postweiher sind insgesamt zu fragmentarisch um Schlüsse ziehen zu können. Bei Betrachtung dieses gehäuft sehr ähnlichen Vorkommens von *Listeria* kam die Frage auf, ob diese Ergebnisse tatsächlich die Populationen von zwei unabhängigen Habitaten darstellen oder ob die Keime, die auf der Oberfläche von *R. fluitans* nachgewiesen wurden, möglicherweise ursprünglich auch aus dem Sediment stammen, aus dem die Pflanzen wachsen. Außerdem ist die Fähigkeit zur Adhäsion von pelagischen Zellen, die beispielsweise über Auswaschung durch Regenwasser eingetragen werden, bei den Strömungsverhältnissen in den Fließgewässern vermutlich limitiert.

Um diese Hypothese zu testen, wurde eine Auswahl von Isolaten, die zu den selben Zeitpunkten aus den Matrices Sediment und *R. fluitans* von den Standorten Moosach und Wolnzach isoliert worden waren, anhand von RAPD Analysen subtypisiert. Bei Berücksichtigung der Tatsache, dass die Isolate über ein Anreicherungsverfahren gewonnen und von den selektiven Festmedien mehr oder weniger zufällig ausgewählt worden waren, wurde dabei eine höhere intraspezifische Biodiversität festgestellt als vermutet. Insgesamt konnte bei den RAPD- typisierten Isolaten bei 7 der 10 untersuchten *R. fluitans* / Sediment- Paarungen zumindest jeweils 1 *Listeria* RAPD Typus in beiden Habitaten nachgewiesen werden. Zur aussagekräftigeren Beschreibung der Biodiversität hätte allerdings eine höhere Anzahl von Isolaten untersucht werden müssen. Insgesamt sind diese Ergebnisse aufgrund der Anreicherungs- und Auswahlmethodik nicht beweiskräftig genug um die Hypothese, dass zwischen den Populationen von Sediment und *R. fluitans* ein Zusammenhang besteht, zu untermauern. Andererseits ist der Beweis über die Untersuchung von zeitgleich isolierten Keimen möglicherweise nicht zuverlässig zu führen, da Sediment im Fließgewässer einer ständigen Umlagerung unterworfen ist. Typen, die auf *R. fluitans* vorkommen und ursprünglich aus dem Sediment stammen, müssen nicht zwangsläufig gleichzeitig auch bzw. noch im Sediment nachweisbar sein.

4.3 Vorkommen von *Listerien* im Sediment

Böden stellen in Bezug auf die Verfügbarkeit von Sauerstoff und organischen sowie anorganischen Nährstoffquellen hoch komplexe Habitate dar. Ein g Bodenmaterial beherbergt bis zu 10^{10} Mikroorganismen, wobei die gesamte Artenvielfalt anhand unterschiedlicher Typisierungs- bzw. Berechnungsmethoden auf $8,3 \times 10^6$ / g (Gans, Wolinsky et al. 2005), $5,2 \times 10^4$ / g (Roesch, Fulthorpe et al. 2007) bzw. 2×10^9 / g (Fierer, Breitbart et al. 2007) geschätzt wurde. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Studie sollte untersucht werden, in welchen Sedimentschichten *Listerien* vorkommen und inwieweit das Vorkommen von *Listeria* Spezies und –Subtypen in Korrelation zur Sedimenttiefe stand. Generell ist bislang über die Ökologie von verschiedenen Erden bzw. Bodenmatrices sowie von Gewässersediment in Bezug auf das Vorkommen von *Listerien* wenig bekannt. Ältere Studien über die Überlebensdauer in verschiedenen Bodenmatrices belegen, dass *Listerien* in diesen Umgebungen über einen langen Zeitraum persistieren (Watkins and Sleath 1981) oder sogar wachsen können (Botzler, Cowan et al. 1974), wobei die Beschaffenheit der Bodenproben und vor allen Dingen der Feuchtigkeitsgehalt eine wichtige Rolle spielen. Gewässersediment stellt insofern ein differentes Habitat dar, als dass z. B. die Verfügbarkeit von Sauerstoff nur in den obersten Schichten gegeben ist. Es ist nahe liegend, dass sich die unterschiedlichen Konditionen in tieferen Strata auch auf die Etablierung einer divergenten Mikroflora auswirken.

4.3.1 Keimzahlen in unterschiedlichen Schichttiefen

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen im MPN Verfahren belegen deutlich, dass der Hauptanteil der *Listerien*population in der obersten Sedimentschicht nachzuweisen war. Die Fraktion bis zu einer Tiefe von etwa 1 cm enthielt im Durchschnitt 20 MPN / 10 g, während der Titer in einer Tiefe von 3 - 5 cm bereits bei etwa 4 / 10 g lag. Ab einer Tiefe von 8 cm konnten keine *Listerien* mehr nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse untermauern die Untersuchungen von Weis et al., wobei Bodenproben in unterschiedlichen Schichttiefen analysiert wurden. Die Autoren stellten eine deutlich geringere *Listerien*prävalenz in einer Tiefe von 10 cm im Vergleich zu Oberflächenproben fest (Weis and Seeliger 1975). Yang et al.

isolierten *E. coli* aus unterschiedlichen Schichten von Bodenproben (Yang, Vinopal et al. 2004). Auch bei dieser Studie war die Dichte der Zielkeime in der obersten Schicht signifikant höher als in tieferen Schichten, wobei *E. coli* bis zu einer maximalen Tiefe von rund 58 cm nachweisbar war.

4.3.2 Vorkommen von *Listeria* Spezies und -Subtypen

Bezüglich des Vorkommens von *Listeria* Spezies und –Subtypen war es schwierig, Tendenzen abzuleiten, zumal rund 46 % der untersuchten Isolate aus der obersten Sedimentfraktion stammten. Etwa 31 % der Isolate stammten aus einer Tiefe von 1 – 3 cm, ca. 18 % aus 3 – 5 cm und nur rund 5 % aus einer Tiefe von 5 – 8 cm. Bei den 4 untersuchten Proben konnten die Spezies *L. monocytogenes* und *L. innocua* ab einer Tiefe von 5 cm nicht mehr nachgewiesen werden, obwohl diese Arten bei den monatlichen Untersuchungen im Jahreslauf in der Regel diejenigen mit der höchsten Abundanz waren. Demgegenüber kamen die selteneren Spezies *L. seeligeri* und neue Arten in sehr geringen Keimzahlen auch noch in einer Tiefe bis 8 cm vor. Diesen Ergebnissen gemäß kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *Listeria*-Spezies und der Tiefe von Sediment besteht. Andererseits ist Sediment kein stationärer Bereich und wird je nach Strömung im Fließgewässer ständig umgelagert, so dass das Fehlen von *L. monocytogenes* und *L. innocua* in den tieferen Schichten auch zufälliger Natur sein könnte.

Jede Spezies wurde mit Typen unterschiedlicher Abundanz nachgewiesen, wobei rund 51 % der RAPD Typen nur 1- bzw. 2mal nachgewiesen wurden. Das Vorkommen von singulären Typen war in allen Sedimenttiefen gleichermaßen zu beobachten. Zudem kamen oft Typen, die mehrfach detektiert wurden, in allen Sedimentschichten vor, d. h. Typen mit hoher Prävalenz standen nicht in Zusammenhang mit einer bestimmten Schichttiefe.

Sediment in Fließgewässern stellt kein feststehendes Habitat dar und ist durch Strömungsschwankungen bedingt einer ständigen Umlagerung unterworfen. Entsprechend veränderlich ist wahrscheinlich auch die mikrobielle Population. Erwartungsgemäß wurden bei diesen Untersuchungen nach einem Zeitraum von 3 Wochen „nur“ rund 36 % der Typen erneut isoliert. Der Zeitfaktor war jedoch nicht die einzige maßgebliche Einflussgröße, da innerhalb der beiden Proben eines

Versuchstages jeweils ähnlich „wenige“ (jeweils rund 40 %) gemeinsame Typen nachgewiesen wurden. Insofern ist die unmittelbare Lokalisierung der Probenahmestelle ein ebenso wichtiger Faktor bei der Analyse der Biodiversität von *Listeria* in Sediment. Unserem Wissen zufolge ist bislang keine vergleichbare Untersuchung beschrieben, so dass die Bewertung dieser Daten im Kontext anderer Studien nicht möglich ist. Alles in allem stellt Sediment in einem Fließgewässer offensichtlich ein hoch dynamisches Habitat in Bezug auf die Biodiversität von *Listeria* Populationen dar.

4.4 Biodiversität von Listerien in den untersuchten Habitaten

4.4.1 Probenanreicherung

Die Problematik bei der quantitativen Erfassung der Diversität von Listeriapopulationen war zum einen, dass die Keimzahlen von Listerien in den Matrices Sediment und Wasserpflanzen in der Regel < 100 MPN / g betragen und deshalb eine direkte Isolierung der Keime nicht möglich war. Die Anwendung eines Anreicherungsschrittes war unumgänglich, obwohl jede Anreicherung im Prinzip einer Selektion gleichkommt. Zum anderen kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund von kompetitiven Mechanismen während der Anreicherung nicht alle in einer Probe vorhandenen Spezies oder Typen von Listerien erfasst werden. Der Grundgedanke bei den hier durchgeführten Untersuchungen war, das Probenmaterial in so kleine Portionen aufzuteilen, dass entweder Listerien enthalten waren oder nicht um so theoretisch alle vorhandenen Listeriazellen singularisiert anzureichern. Damit sollte die Detektion aller in einer Probe vorhandenen Typen ermöglicht werden. Da aus Vorversuchen bekannt war, dass Listerienzellen in einer Probe nicht gleichmäßig verteilt und möglicherweise speziell in Sediment in Konglomeraten vorkommen, sollte anhand der Anwendung von Ultraschall eine weitgehend homogene Verteilung der Zielkeime erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem sollte die Behandlung mit Ultraschall dazu dienen, *Listeria*-Zellen von der Oberfläche von Wasserpflanzen abzulösen. Insgesamt wurden 2 *R. fluitans*-Proben und 3 Sedimentproben auf diese Art und Weise untersucht, wobei für die Ansätze 2 unterschiedliche Nährmedien eingesetzt wurden. Alle Isolate aus diesen Proben wurden auf Speziesebene identifiziert und mit RAPD subtypisiert.

Unabhängig von den beiden eingesetzten Anreicherungsmedien war der Anteil an singulären Typen bei allen *Listeria* Spezies jeweils ähnlich hoch. Unter Beachtung der generell geringen Prävalenz von *Listeria* in den untersuchten Habitaten ist daher vermutlich nicht die Selektivität des angewendeten Anreicherungsmediums für die Detektion von Typen ausschlaggebend, sondern die untersuchte Probenmenge.

4.4.2 (GTG)5 und AFLP Typisierung

Die Isolate einer *R. fluitans*- und einer Sediment- Probe wurden zusätzlich anhand einer zweiten Typisierungsmethode analysiert. Dabei resultierten z. T. unterschiedliche Gruppierungen von Isolaten. Generell gilt bei jeder Typisierungsmethodik, dass die Detektion identischer Subtypen nicht zwangsläufig die Zugehörigkeit zu einer klonalen Gruppe impliziert.

Anhand der RAPD Methode konnten mehrere Typen diskriminiert werden als anhand der (GTG)5 Typisierungsmethode. Bei der simultanen Anwendung der 3-Primer-Kombination wurden mehrere verschiedene Bereiche des Genomes angesprochen, weshalb relativ komplexe Bandenprofile mit bis zu 13 Banden generiert wurden. Primer (GTG)5 adressiert repetitive Sequenzen bzw. Bereiche amplifizierbarer Größe dazwischen. Bei dieser Methode konnten bei den Profilen deutlich weniger Banden festgestellt werden. Es ist bekannt, dass bei der gleichzeitigen Anwendung von mehr als nur einem Primer detailliertere Bandenprofile resultieren (Welsh and McClelland 1991; Micheli, Bova et al. 1993). Dies könnte die in dieser Arbeit festgestellte Überlegenheit von RAPD gegenüber der (GTG)5 Typisierung erklären. Im Vergleich zu anderen Typisierungsmethoden war die Beurteilung der (GTG)5 Typisierung bei weiteren Studien sehr diskrepanz, weshalb die Einordnung der Methode bezüglich ihrer Sensitivität umstritten ist (Tab. 4.4). Unseres Wissens ist bei *Listeria* bislang weder der simultane Einsatz von RAPD Primern noch die Typisierung mit Primer (GTG)5 beschrieben. Bei den hier untersuchten Proben konnten offensichtlich anhand der 3er Kombination mehr diskriminative Elemente angesprochen werden als anhand der (GTG)5 Methodik.

Im Gegensatz zur Typisierung von Isolaten anhand der RAPD Methode ist die AFLP Typisierungsmethode aufgrund der definierten Generierung von DNA-Fragmenten (Restriktionsverdau, Ligation von Adaptoren und selektive Amplifizierung) theoretisch hoch spezifisch. Diese Methode gilt gemeinhin als sehr

diskriminativ, wobei verschiedene Studien zur Typisierung von Listerien zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Beim Vergleich verschiedener Methoden wurde AFLP unterschiedlich bewertet. Während eine Sensitivität der Methode vergleichbar mit MLST oder sogar höher als bei PFGE festgestellt wurde, wurden auch Ergebnisse erzielt, die mit RAPD Typisierung oder sogar Ribotyping gleichzogen (Tab. 4.4).

Spezies	Isolate	Typisierungsmethode	Typen	D ¹	Referenz
<i>Mannheimia haemolytica</i>	40	PFGE BOX PCR (GTG)5	k. A.	0,98 0,82 0,72	(Klima, Alexander et al. 2010)
<i>Escherichia coli</i>	232	REP PCR Eric PCR Eric2 PCR BOX PCR (GTG)5	22 ² 15 ² 11 ² 28 ² 34 ²	0,883 0,826 0,783 0,933 0,952	(Mohapatra, Broersma et al. 2007)
neue Listeria Spezies	106 103 103	RAPD (GTG)5 RAPD+(GTG)5	47 41 59	0.942 0.911 0.963	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i>	103	AFLP MLST	62 66	0,976 0,972	(Parisi, Latorre et al. 2009)
<i>Listeria</i>	106	AFLP RAPD PFGE Ribotyping	k. A.	0,974 0,954 0,968 0,874	(Fonnesbech Vogel, Fussing et al. 2004)
<i>L. monocytogenes</i>	213	RAPD AFLP \cong RAPD bei einer Auswahl von 35 Isolaten	37	k. A.	(Wulff, Gram et al. 2006)
<i>L. monocytogenes</i>	46	AFLP Ribotyping PFGE	12 12 17	k. A.	(Corcoran, Clancy et al. 2006)
<i>L. monocytogenes</i>	48 43 43	RAPD AFLP RAPD+AFLP	11 7 16	0.765 0.642 0.832	diese Arbeit
<i>L. innocua</i>	35 34 34	RAPD AFLP RAPD+AFLP	21 19 29	0.964 0.966 0.990	diese Arbeit

¹ Simpson Diversitätsindex

² Abgrenzung von Typen auf der Basis von Clusteranalysen mit einer Ähnlichkeit von 65 %

Tab. 4.4 Studien zum Vergleich der Sensitivität von (GTG)5 und AFLP Typisierung mit anderen Typisierungsmethoden. k. A. = keine Angabe

Während PFGE derzeit als die sensitivste Fingerprintmethode angesehen wird (Gold Standard), gilt Ribotyping als limitiert diskriminativ (van Belkum, Tassios et al. 2007). Zwar gilt die AFLP Methode als hochsensitiv, jedoch ist das Verfahren in der Praxis relativ sensibel und stör anfällig. So könnten die widersprüchlichen Ergebnisse bei verschiedenen Studien u. a. durch die Schritte Restriktion und Ligation zustande gekommen sein. Zunächst ist die Verwendung von hochreiner DNA notwendig, damit die Restriktion vollständig ablaufen und dabei exakt die Bildung der Schnittstellen erfolgen kann, die komplementär zu den Adaptorsequenzen sind. Der nächste kritische Punkt ist die Ligation der Adaptoren, denn eine teilweise oder unvollständige Ligation beeinflusst das Bandenprofil maßgeblich. Schließlich ist der Einfluss der Qualität von den verwendeten Reagenzien und Enzymen nicht unerheblich (Mueller and Wolfenbarger 1999). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten war die Reproduzierbarkeit zwar recht gut, insgesamt jedoch war die RAPD Methode sensitiver.

4.4.3 Diversitätsindizes

Für die Quantifizierung der Diversität von Organismen in einem Lebensraum stehen eine Vielzahl unterschiedlicher Kalkulationsansätze zur Verfügung. Einige davon sind neben den populären Shannon-Wiener Index und Simpson Diversitätsindex noch Index nach Margalef, Berger-Parker Dominanz, McIntosh Index, Fischer's α Index, oder Strong's Index. In dieser Arbeit wurde für die MPN angereicherten Proben vom Jahreslauf sowie für die 0,1 g Anreicherungen der 3 untersuchten Sediment- und der beiden *R. fluitans*-Proben der Diversitätsindex nach Simpson angewandt. Dieser Index umfasst einen Wertebereich von 0 – 1. Dabei gilt, je größer der Wert für D, desto größer ist die Diversität der untersuchten Kollektion, bzw. desto kleiner ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig gewählte Individuen aus einer Probe dem selben Typus oder der selben Art angehören. Der Simpson Diversitätsindex wurde speziell zur Quantifizierung der intraspezifischen Diversität von *L. monocytogenes* Isolaten bereits häufig angewandt (Tab. 4.5). Bei diesen Studien handelte es sich um Umgebungen mit unterschiedlicher *L. monocytogenes*-Prävalenz.

Habitat	Anzahl Isolate	Typisierung	D	Referenz
Boden, Pflanzen, Wasser	80	Ribotyping MLST	0,872 0,987	(Sauders, Durak et al. 2006)
Süßgewässer	75	Ribotyping PFGE	0,791 0,885	(Lyautey, Lapen et al. 2007)
Fäzes, Boden, Futtermittel, Wasser	414	Ribotyping	0,82	(Nightingale, Schukken et al. 2004)
Umfeld von Schafhöfen	104	Ribotyping + PFGE	0,845	(Gudmundsdottir, Aalbaek et al. 2004)
Umfeld von Milchviehbetrieben	257 291	PFGE	0,874 0,912	(Borucki, Gay et al. 2005)

Tab. 4.5 Simpson Diversitätsindizes von *L. monocytogenes* Isolaten bei unterschiedlichen Typisierungsmethoden.

Die in Tab. 4.5 aufgelisteten *L. monocytogenes* Populationen waren z. T. sehr divers, denn speziell anhand PFGE und MLST konnten sehr hohe Diversitätsindizes kalkuliert werden. Die Isolate bei diesen Studien stellen jeweils eine Kollektion aus vielen verschiedenen Proben dar, wobei meist nur 1 Isolat von positiv getesteten Proben typisiert wurde. Sauders et al. beispielsweise untersuchten über einen Zeitraum von 2 Jahren insgesamt 1805 Boden-, Pflanzen- und Wasserproben und untersuchten daraus 80 *L. monocytogenes* Isolate (Prävalenz rund 4 %) (Sauders, Durak et al. 2006). Lyautey et al. prüften über einen Zeitraum von 6 Monaten insgesamt 314 Wasserproben auf das Vorkommen von *L. monocytogenes* und typisierten 75 Isolate aus den positiv getesteten Proben (Prävalenz ca. 10 %) (Lyautey, Lapen et al. 2007). Nightingale et al. wiesen *L. monocytogenes* in 414 von 2056 untersuchten Proben von 52 Bauernhöfen nach (Prävalenz insgesamt rund 20 %) (Nightingale, Schukken et al. 2004), während die von Gudmundsdottir et al. typisierten *L. monocytogenes* Isolate aus 10 Schafzuchten stammten (keine Angaben zur Prävalenz) (Gudmundsdottir, Aalbaek et al. 2004). Borucki et al. untersuchten mit einem zeitlichen Abstand von 10 Monaten 108 bzw. 103 Proben von einem Milchviehbetrieb (Prävalenz insgesamt 71 %) (Borucki, Gay et al. 2005). Erwartungsgemäß konnten bei Anwendung von entsprechend sensitiven Typisierungsmethoden sehr hohe Diversitätsindizes bei den verschiedenen Studien berechnet werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Kollektionen der 0,1 g Anreicherungen unterscheiden sich aufgrund des Designs des Isolationsverfahrens jedoch grundlegend. Die hier untersuchten Isolate einer Probe spiegeln den Großteil der

Diversität in 10 bzw. 20 g Probenmaterial wider und auch dabei konnten sehr hohe Simpson Diversitätsindizes ermittelt werden, obgleich RAPD im Vergleich zu PFGE oder MLST weniger sensitiv gilt. So wurde beispielsweise die Diversität bei den anhand RAPD+AFLP typisierten *L. monocytogenes* Isolate mit Simpson $D = 0,827$ kalkuliert. Die Diversität (RAPD) bei *L. innocua* Isolaten aus der *R. fluitans* Probe vom April 2010 lag bei $D = 0,964$. Dies verdeutlicht den vergleichsweise sehr hohen Diversitäts-Grad von Listeriapopulationen in diesen natürlichen Habitaten.

4.4.4 Akkumulation von RAPD Typen

Eine Möglichkeit zur Darstellung der Diversität in einem Habitat ist die Auftragung der detektierten Anzahl von Typen oder Arten in Relation zur Probenahme (Akkumulationskurven). Anhand dieser Grafen können Diversitäten verschiedener Kollektionen verglichen werden, sofern die Probenumfänge in vergleichbaren Größenordnungen vorliegen. Ungleiche Datensätze können über Rarefaction Analysen standardisiert und somit ebenso direkt verglichen werden. Die Generierung einer Rarefaction-Kurve erfolgt über die wiederholte, auf dem Zufallsprinzip basierende Beprobung eines bekannten Probenpools (in der Regel ohne zurücklegen), wobei die jeweils erwartete Anzahl von Typen oder Spezies ermittelt wird. Der kalkulierte Graf drückt aus, mit welcher (statistischen) Wahrscheinlichkeit - basierend auf der jeweils zugehörigen Akkumulationskurve - je untersuchter Probe neue Spezies oder Typen aufgefunden werden. Eine Rarefaction Kurve verläuft von rechts nach links, bis schließlich der komplette vorliegende Datensatz auf eine bestimmte Individuenanzahl reduziert bzw. „ausgedünnt“ (rarefied) ist (Hurlbert 1971). Rarefaction stellt somit die Abschätzung der Diversität innerhalb einer bekannten Population in dar. Dadurch, dass die Anzahl von Isolaten bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben jeweils sehr ähnlich war, waren die Rarefaction Kurven mit den Typen-Akkumulationskurven deckungsgleich (Daten nicht gezeigt), weshalb der direkte Vergleich der Diversität über die Akkumulationskurven möglich war. Dabei konnten im Sediment vom Fließgewässer (September 2009) und bei *R. fluitans* (April 2010) 28 bzw. 27 RAPD Typen bei 50 untersuchten Isolaten abgegrenzt werden. Deutlich niedriger war die Diversität mit 9 RAPD Typen bei 50 Isolaten aus dem Sediment vom Standgewässer. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das Sediment in einem Standgewässer nicht

Einflüssen wie Strömungsturbulenzen und –geschwindigkeiten sowie fortwährender Umlagerung ausgesetzt ist. Sediment eines Standgewässers stellt vermutlich ein verhältnismäßig stationäres Habitat dar, in dem sich bestimmte Typen entsprechender Fitness besser etablieren können und infolgedessen auch in größerer Abundanz auftreten. Allerdings wurde Sediment aus dem Standgewässer nur einmal beprobt und zur Untermauerung dieser Annahme wäre die Wiederholung des Versuchsansatzes erforderlich.

4.4.5 Diversität von *Listeria* im Vergleich zu anderen Populationen

Unseres Wissens sind bislang keine vergleichbaren Studien in Bezug auf die Populationsdiversität von *Listeria* in natürlichen Habitaten auf Ebene der Subspezies bekannt. Generell sind Populationsstrukturen auf Subspeziesebene selten beschrieben. Insgesamt konnte speziell bei den untersuchten Proben aus dem Fließgewässer im Verhältnis zur Prävalenz von Listerien eine sehr hohe intragenerische Diversität festgestellt werden. Rein qualitativ lässt sich dieser Zusammenhang sehr simpel über den Quotienten aus Typen und untersuchten Isolaten ausdrücken (Chambel, Sol et al. 2007), wobei gilt, je höher der Verhältniswert, desto höher ist die Diversität bei der geprüften Population (Tab. 4.6).

Probe	Isolate	Typen	Verhältnis Typen / Isolate
<i>R. fluitans</i> Oktober 2009	141	27 ¹	0,191
<i>R. fluitans</i> April 2010	104	44 ¹	0,423
Sediment F September 2009	122	52 ¹	0,426
Sediment F März 2010	67	16 ¹	0,239
Sediment S Juni 2010	168	14 ¹	0,083
<i>R. fluitans</i> April 2010	93	54 ²	0,581
Sediment F September 2009	119	65 ³	0,546

¹ RAPD

² RAPD+AFLP

³ RAPD+(GTG)5

Tab. 4.6 Verhältnis von detektierten Typen zur Anzahl von untersuchten Isolaten.

Anhand dieser Verhältniszahlen können Diversitätsanalysen unterschiedlicher Populationen rein qualitativ verglichen werden. Allerdings muss dabei berücksichtigt

werden, dass zum einen die Definition von Subtypen von Studie zu Studie variiert und zum anderen die angewandten Typisierungsmethoden unterschiedlich sensitiv sind. So war z. B. die anhand RAPD mit Primer OPA 3 typisierte Population von *Legionella* aus Grundwasser wenig divers (Verhältniswert 0,051). Die Diversität bei serotypisierten bzw. 16S/23S-rRNA typisierten *Salmonella* Isolaten aus Sediment und Flusswasser war ebenfalls verhältnismäßig gering (Tab. 4.7).

Gattung	Habitat	Typisierungsmethode	Anzahl Isolate	Anzahl Typen	Verhältnis Typen / Isolate	Referenz
<i>Legionella</i>	Grundwasser	RAPD	235	12	0,051	(Costa, Tiago et al. 2005)
<i>Salmonella</i>	Sediment, Flusswasser	Serotypisierung 16S / 23S rRNA	416	39 50	0,090 0,120	(Baudart, Lemarchand et al. 2000)

Tab. 4.7 Diversitätsanalysen bei den Gattungen *Legionella* und *Salmonella* aus natürlichen Umwelthabitaten.

Im Kontext zu den genannten Studien können im Wesentlichen zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. Erstens ist die Typisierung mit RAPD Typisierung mit 3 Primern zwar eine recht einfache aber vergleichsweise sehr sensitive Methode. Speziell bei Kombination mit einer zweiten Typisierungsmethode ist die Auflösung sehr hoch. Zweitens ist die detektierte Diversität von *Listeria* in den untersuchten Habitaten im Vergleich zu anderen Diversitätsstudien sehr hoch. Ein Grund für diese hohe Populationsdiversität könnte darin begründet liegen, dass anhand der Anreicherung von 0,1 g-Portionen tatsächlich sehr viele Typen erfasst wurden.

4.4.6 Intraspezifische Diversität

Auch Populationsanalysen bezüglich der intraspezifischen Biodiversität sind recht selten beschrieben. In Tab. 4.8 sind 2 Studien zur intraspezifischen Biodiversität von *E. coli* aufgeführt. Dabei war beispielsweise PFGE Typisierung mit einem Verhältnis von Typen / Isolaten von 0,831 gegenüber Eric PCR mit einem Verhältniswert von 0,315 bei *E. coli* Isolaten aus 2 Standgewässern sehr sensitiv.

Spezies	Habitat	Typisierungsmethode	Anzahl Isolate	Anzahl Typen	Verhältnis Typen / Isolate	Referenz
<i>E. coli</i>	Boden	BOX PCR	280	89 OTU ¹	0,318	(Yang, Vinopal et al. 2004)
<i>E. coli</i>	Standgewässer	PFGE ERIC PCR	555	461 175	0,831 0,315	(Casarez, Pillai et al. 2007)

¹ OTU = Operational Taxonomic Unit, Gruppierung von Bandenprofilen mit einer Ähnlichkeit von $\geq 85\%$

Tab. 4.8 Intraspezifische Diversität von *E. coli* aus natürlichen Umwelthabitaten

Um die Biodiversität der unterschiedlichen Spezies in einer Probe beschreiben zu können, ist jeweils eine gewisse Anzahl von Individuen erforderlich. Bei den 0,1 g-Ansätzen war dies speziell bei *L. seeligeri* nicht der Fall, da die Prävalenz dieser Spezies sehr gering war (5 Isolate im Sediment vom September 2009, 1 Isolat im Sediment vom März 2010, 8 Isolate von *R. fluitans* vom Oktober 2009 und 5 Isolate von *R. fluitans* vom April 2010). Daher sind die Diversitätsberechnungen bei dieser Spezies vermutlich weniger aussagekräftig.

Bei den einzelnen Probenansätzen war die Biodiversität von *Listeria* Spezies z. T. sehr unterschiedlich, teilweise aber auch sehr ähnlich. Es war weder in Bezug auf die Habitate noch in Bezug auf die verschiedenen Anreicherungsverfahren (0,1 g oder MPN) ein eindeutiger Trend bezüglich der Biodiversität der Spezies erkennbar (Abb. 3.26). Die beiden 0,1 g-Sedimentversuche waren selbst auf Speziesebene unterschiedlich. Demzufolge hatte der zeitliche Abstand zwischen den Probenahmen einen wesentlichen Einfluss auf die Komposition der *Listeria*-Population bei den einzelnen Proben. Bei den Untersuchungen zur Stratifikation von Sediment war außerdem festgestellt worden, dass die unmittelbare Lokalisierung der Probenahmestelle ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Detektion von RAPD-Typen hatte, da die *Listeria*-Populationen von 2 Proben, die in einem Abstand von etwa 1,5 m entnommen worden waren, zu rund 60 % verschieden waren (siehe Kapitel 3.3.4 dieser Arbeit). Die hier beprobten ökologischen Habitate sind den jeweils vorherrschenden Strömungsbedingungen eines Fließgewässers unterworfen, weshalb sie auch jeweils entsprechend fluktuieren. Dies wird auch dadurch untermauert, dass bei den Wiederholungsansätzen jeweils nur vereinzelt RAPD-Typen erneut isoliert werden konnten. Insofern sind die unterschiedlichen Ergebnisse bei den verschiedenen Probenansätzen plausibel.

Die Diversität von *Listeria* Spezies in den Habitaten Sediment und *R. fluitans* war jeweils im Prinzip identisch. Im Vergleich zu den *L. innocua*-Isolaten (*R. fluitans* D = 0,948, Sediment D = 0,953) und *L. seeligeri*-Isolaten (*R. fluitans* D = 0,949, Sediment D = 0,955) waren die *L. monocytogenes*-Isolate bei beiden Habitaten gemäß des Index nach Simpson weniger divers (*R. fluitans* D = 0,858, Sediment D = 0,891). In Bezug auf die Habitate Sediment und *R. fluitans* war kein Unterschied hinsichtlich der Biodiversität von *Listeria* Spezies festzustellen.

Insgesamt war die Biodiversität bei den untersuchten Spezies sehr hoch. Anhand RAPD Typisierung konnte bei den 175 *L. monocytogenes*-Isolaten ein Simpson Diversitätsindex von D = 0,927 und bei den 307 *L. innocua*-Isolaten sowie bei den 70 *L. seeligeri*-Isolaten jeweils ein Index von D = 0,971 kalkuliert werden. Die 3 Spezies waren demgemäß recht ähnlich bezüglich ihrer gesamten Biodiversität. Allerdings konnte festgestellt werden, dass die Biodiversität einer Spezies nicht unbedingt mit der Anzahl von untersuchten Isolaten korrelierte. Obwohl beispielsweise etwa 4 x so viele *L. innocua*-Isolate wie *L. seeligeri*-Isolate untersucht worden waren, war die Diversität der beiden Spezies identisch. Deutlicher wird dieser Zusammenhang aus dem Verhältnis zwischen der Anzahl von detektierten Typen zur Anzahl von untersuchten Isolaten Q (*L. innocua* mit Q = 0,257 gegenüber *L. seeligeri* mit Q = 0,471. Bei *L. monocytogenes* betrug Q = 0,200). Das bedeutet, dass bei *L. seeligeri*, im Vergleich zu *L. monocytogenes* und *L. innocua*, je untersuchter Isolatanzahl rund doppelt so viele unterschiedliche RAPD Typen abgegrenzt werden konnten. Dieser Unterschied wird beim Simpson Diversitätsindex nicht berücksichtigt. Insofern war insgesamt die Diversität von den Spezies *L. monocytogenes* und *L. innocua* gemäß Simpson Diversität und Q vergleichbar, während die Biodiversität von *L. seeligeri* qualitativ höher war.

Unabhängig von den Anreicherungsmedien ½ Fraser- und UVM II Medium bei den 0,1 g Anreicherungen bzw. ½ Fraser Medium den MPN Ansätzen lag der Anteil an singulären RAPD-Typen bei den Spezies *L. monocytogenes* und *L. innocua* zwischen 42 und 50 % und bei *L. seeligeri* zwischen 33 und 50 % (Abb. 3.28). Speziell bei den 0,1 g Anreicherungen deutet dies darauf hin, dass die Biodiversität dieser Spezies in 20 bzw. 40 g Probenmaterial nicht repräsentativ erfasst wurde.

4.4.7 Extrapolation der Biodiversität über Schätzmethoden

In der Regel sind mikrobielle Populationen höchst divers, so dass Spezies-Akkumulationskurven oft nahezu linear verlaufen (Hughes, Hellmann et al. 2001). Generell ist die Abschätzung der Diversität mikrobieller Populationen über Extrapolation von Akkumulationskurven umstritten, da ausgehend von einem bestehenden Datensatz unterschiedliche Kurvenverlaufsformen bzw. Berechnungsansätze angepasst werden können, die entsprechend unterschiedliche asymptotische Grafen modellieren. Folglich weichen auch die Schätzungen entsprechend ab. Eine Grundvoraussetzung für Extrapolationen ist, dass die Daten einer umfangreichen Probenahme mit einem repräsentativen Populationsgefüge vorliegen (Hughes, Hellmann et al. 2001). Dadurch, dass in dieser Arbeit die Listerienpopulationen in jeweils insgesamt 20 g Sediment bzw. auf 40 g *R. fluitans* über die Anreicherung von sehr kleinen Probenportionen erfasst wurde, wird diese Voraussetzung als weitgehend gegeben angesehen. Aufgrund dieses portionierten Anreicherungsverfahrens ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Beprobung repräsentativ ist.

Die Abschätzung der Biodiversität ist außerdem über die Verteilung, in der die unterschiedlichen Typen oder Spezies vorliegen, möglich. Grundlage dafür bildet ausgehend von Rang-Abundanzkurven die Annahme, dass die Typen normalverteilt vorliegen, so dass über die Anpassung der vorliegenden Daten an eine entsprechende Verteilungsfunktion die Anzahl der nicht erfassten Typen ermittelt werden kann. Auf diese Art und Weise schätzten Curtis et al. die Speziesvielfalt in Meerwasser mit 160 / ml und im Boden mit $6,4 \times 10^3 - 3,8 \times 10^4$ / g (Curtis, Sloan et al. 2002). Allerdings wird dieser Berechnungsansatz kontrovers diskutiert (Harte, Kinzig et al. 1999), da sehr große Datensätze verfügbar sein müssen, was speziell bei mikrobiellen Populationen oft problematisch ist. Auch die Definition von Typen wird sehr unterschiedlich gehandhabt. So wird oft die Klassifizierung in Operational Taxonomic Units (OTU) vorgenommen, wobei ein mehr oder weniger willkürlich gesetzter Ähnlichkeitsgrad (cut off level) von bestimmten Markern von beispielsweise 97%, 80 %, 75 % oder 60 % die Grundlagen bilden (Torsvik, Salte et al. 1990; Fredrickson, Balkwill et al. 1991; McCray Batzli, Graves et al. 1992; Fierer, Breitbart et al. 2007; Morales, Cosart et al. 2009). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Studien ist die Abschätzung der nicht detektierten Typen auf der Basis von Rang-

Abundanzkurven zulässig, da RAPD Bandenmuster entweder als gleich oder als unterschiedlich klassifiziert wurden. Insofern war die Definition von Typen eindeutig klar.

Die Wahrscheinlichkeit zur wiederholten Auffindung von Typen in einer Population hängt von deren jeweiligen Abundanz in dem Habitat ab. Nicht-parametrische Ansätze zur Abschätzung der Artenvielfalt gelten speziell bei mikrobiellen Populationen als am zuverlässigsten, da die Datensätze nicht an mathematische bzw. statistische Modelle angeglichen werden (Hughes, Hellmann et al. 2001). Bei nicht-parametrischen Methoden ist das Verhältnis von den bereits aufgenommenen zu den neu detektierten Typen in Relation zum Probenumfang die maßgebliche Einflussgröße. Dazu stehen neben den in dieser Arbeit beschriebenen (Chao 1 und Chao ACE) noch eine Reihe weiterer Methoden zur Verfügung, wobei in der Literatur kein Konsens darüber herrscht, welcher Ansatz entsprechend dem jeweilig vorliegenden Datensatz am besten geeignet ist (Harte, Kinzig et al. 1999; Hughes, Hellmann et al. 2001).

Statistische Schätzkalkulationen setzen generell voraus, dass die unterschiedlichen Probenahmen jeweils die selbe Population betreffen (Gotelli and Colwell 2001). Bei den MPN-Ansätzen konnten bei *L. innocua* lediglich 3 RAPD-Typen nach 1 bzw. nach 3 Monaten erneut nachgewiesen werden. Bei den 0,1 g Anreicherungen konnte bei den Wiederholungsansätzen nur 1 *L. monocytogenes* RAPD Typ sowie 1 *L. innocua* RAPD Typ erneut detektiert wurde. Dadurch, dass die Populationen bei der Wiederholungsuntersuchungen insgesamt so unterschiedlich waren, können statistische Berechnungsansätze zur Abschätzung der Probenanzahl, die erforderlich gewesen wäre, um die „komplette“ *Listeria* Diversität in den Habitaten zu erfassen, nicht angewendet werden.

Um die verschiedenen Schätzmethoden bewerten zu können, wurde von jeder untersuchten Probe ein Subset von Isolaten ausgewählt und die verschiedenen Schätzmethoden an diesem Subset geprüft. Je näher die Schätzungen auf Basis des Subsets bei den Schätzungen ausgehend von der kompletten Probe lagen, desto besser kann ein bestimmtes Berechnungsmodell an den vorliegenden Datensatz angepasst werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass keine der angewandten Methoden bei allen Proben optimal war. Am ungeeignetesten waren die Schätzungen anhand von Verteilungsfunktionen, da dabei die Schätzwerte beim Vergleich Subset / Kompletprobe sehr divergent waren. Auch die Schätzungen

anhand Chao 1 waren ungenau und erschienen tendenziell sehr hoch. Demgegenüber lagen die Schätzwerte beim Vergleich Subset / Kompletprobe bei Extrapolation von Akkumulationskurven und Chao ACE sowohl näher zusammen als auch in einem jeweils ähnlichen Bereich. Daher werden diese beiden Schätzmethoden als am besten anwendbar betrachtet. Sie lieferten wahrscheinlich die zuverlässigsten Ergebnisse zur Abschätzung der gesamten Typenvielfalt in den untersuchten Habitaten.

Die Schätzung der gesamten Anzahl von RAPD Typen nach Chao ACE bezogen bei 20 g Probenmatrix ergab bei den Spezies *L. monocytogenes* und *L. innocua* eine ähnliche hohe Biodiversität. Bei *L. monocytogenes* wurden 1 bzw. 6 RAPD Typen in 20 g Sediment und 3 bzw. 6 Typen auf 20 g *R. fluitans* geschätzt. Bei *L. innocua* wurden 11 RAPD Typen in 20 g Sediment und 9 bzw. 18 Typen auf 20 g *R. fluitans* geschätzt. Demzufolge waren bei diesen beiden Spezies habitatsbezogen keine intraspezifischen Biodiversitätsunterschiede feststellbar.

Im Durchschnitt wurden in 20 g Sediment (2 Proben, 30 Isolate) und auf 20 g *R. fluitans* (2 Proben, 72 Isolate) jeweils rund 4 *L. monocytogenes*-RAPD Typen geschätzt. Bei *L. innocua* wurden in Sediment auf der Basis einer Probe (46 Isolate) 11 RAPD Typen und auf *R. fluitans* (2 Proben, 138 Isolate) im Durchschnitt rund 13 Typen geschätzt. Hinsichtlich der gesamten Speziesdiversität wurde anhand Chao ACE bei *L. innocua* in beiden Habitaten eine höhere RAPD-Typen Biodiversität geschätzt als bei *L. monocytogenes*.

Mit Ausnahme der RAPD+AFLP typisierten *L. innocua* Isolate von *R. fluitans* wichen die Schätzungen zur gesamten Typenanzahl bei den beiden Spezies nicht wesentlich von der Anzahl der beobachteten Typen ab. Bei 30 RAPD+AFLP typisierten *L. innocua* Isolaten wurden 29 Typen definiert und die Schätzung der gesamten Typenanzahl nach Chao ACE wurde in dieser Probe mit 94 beziffert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei dieser Schätzmethode die Typen berücksichtigt werden, die maximal 10-mal nachgewiesen wurden. Da bei dieser Probe nahezu alle Isolate als eigene Typen abgegrenzt wurden, wurde der rechnerisch noch zu erwartende Anteil entsprechend hoch kalkuliert. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass bei der Anreicherung von 400 x 0,1 g-Portionen eine derart hohe Fraktion von Typen nicht detektiert wurde.

4.5 Beschreibung von neuen *Listeria* Spezies

Die fundamentale Einheit bei der Beschreibung der biologischen Diversität ist die Spezies, wobei die beiden grundlegenden Merkmale für die Abgrenzung von Arten nicht prinzipiell die ausschlaggebenden Informationen beinhalten. Die Kriterien für die Definierung von Spezies sind zum einen die Homologien von 16S rDNA Gesamtsequenzen und zum anderen die genomische Ähnlichkeit von Stämmen bei der Hybridisierung ihrer Gesamt-DNA. Obwohl jeweils mit einer gewissen Problematik behaftet, bilden diese beiden traditionell angewandten Kenngrößen das Fundament der derzeit gültigen mikrobiellen Taxonomie (Brenner, Martin et al. 1967; Fox, Pechman et al. 1977).

4.5.1 16S rDNA Sequenzen

Die DNA Sequenzen der 16S ribosomalen Untereinheiten gelten als Chronometer der Evolution (Logue, Bürgmann et al. 2008) und stellen die Grundlage der Taxonomischen Klassifizierung von Mikroorganismen dar (Yarza, Richter et al. 2008). Der derzeit allgemein anerkannte Grenzwert für die Zugehörigkeit zu einer Spezies liegt bei $\geq 97\%$ Übereinstimmung von 16S rDNA Nukleotidsequenzen (Logan, Berge et al. 2009). Bei den rund 150 *Listeria* Isolaten aus dieser Arbeit, die nicht standardmäßig identifiziert werden konnten, waren die 16S rDNA Teilsequenzen zu 99,0 - 100 % homolog, was demzufolge zunächst eindeutig die Zugehörigkeit zu einer Spezies nahe legt. Auch die 16S rDNA Gesamtsequenzen von WS 4560 bzw. WS 4615 und *L. rocourtiae* stimmten zu etwa 99 % überein. Die Homologien zu den Typstämmen von *L. monocytogenes* und *L. grayi* dagegen lagen deutlich unterhalb der 97 % Grenze (Tab. 4.9).

16S rDNA Homologie	WS 4615	<i>L. rocourtiae</i> T	<i>L. monocytogenes</i> T	<i>L. grayi</i> T
WS 4560	99,4	98,9	95,7	95,1
WS 4615	---	99,1	95,6	95,6

Tab. 4.9 Homologien (%) von 16S rDNA Gesamtsequenzen (1400 bp) von WS 4560 und WS 4615 zu den Spezies *L. rocourtiae*, *L. monocytogenes*, *L. grayi* und *B. thermosphacta*.

Auf der Basis von 16S rDNA ist eine der beiden grundlegenden Forderungen zur Speziesabgrenzung sowohl bezüglich *L. rocourtiae* als auch in Bezug auf die Isolate dieser Arbeit untereinander nicht erfüllt. Es gilt jedoch allgemein als anerkannt, dass eine Homologiegrenze von 97 % die Zusammengehörigkeit zu einer Spezies nicht in jedem Fall garantiert, da oftmals Isolate mit 16S rDNA Sequenzhomologien von mehr als 99 % trotzdem unterschiedlichen Arten angehören (Fox, Wisotzkey et al. 1992; Sallen, Rajoharison et al. 1996). Auch bei Listerien sind die Sequenzen der ribosomalen Untereinheiten hoch konserviert (Sallen, Rajoharison et al. 1996). So betragen beispielsweise die Homologien bei einer Sequenzlänge von 1400 bp zwischen *L. monocytogenes* und *L. innocua* 99,3 %, zwischen *L. monocytogenes* und *L. marthii* 99,1 % und zwischen *L. seeligeri* und *L. ivanovii* 99,4 %. Insofern ist innerhalb des Genus *Listeria* die 97 % - Grenze nicht anwendbar.

4.5.2 DNA-DNA Hybridisierung

Gemäß der Definition nach Wayne et al. gilt bei DNA-DNA Hybridisierungen ein Grenzwert von 70 % (Wayne, Brenner et al. 1987; Logan, Berge et al. 2009), d. h. Isolate mit einer gesamtgenomischen Ähnlichkeit von < 70 % repräsentieren unterschiedliche Spezies. Dieser Grenzwert entspricht einer 95 %igen Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen vom Kerngenom sowie 69 % Übereinstimmung bei den konservierten Genen (Goris, Konstantinidis et al. 2007). Die Ergebnisse der bei 67 °C durchgeführten DNA-DNA Hybridisierungen zwischen dem WS 4560 und *L. rocourtiae* waren mit 21,0 bzw. 24,3 % sehr niedrig und liegen damit im Bereich der gesamtgenomischen Unterschiede zwischen bisher beschriebenen *Listeria* Arten (Tab. 4.10).

Dabei darf der Grenzwert von 70 % nicht als strikte Maßgabe angesehen werden und muss unter Einbeziehung eines gewissen Abweichungsspielraumes beurteilt werden, da in der Praxis häufig methodisch bedingte Abweichungen bei wiederholten Messungen beobachtet werden (Logan, Berge et al. 2009). Die Hybridisierungsergebnisse bei den hier untersuchten Paarungen von neuen Spezies lagen mit je rund 17,5, 37 und 48 % selbst bei Einbezug eines Spielraumes deutlich unterhalb des vorgegebenen Grenzwertes. Insgesamt belegt dies eine ausgeprägte

Heterogenität bei *Listeria*, die von den hochkonservierten 16S rDNA Sequenzen nicht widergespiegelt wird.

Spezies	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>
<i>L. monocytogenes</i>	66-100				
<i>L. ivanovii</i>	27-34	85-100			
<i>L. innocua</i>	47-56	22-45	87-100		
<i>L. welshimeri</i>	41-46	22-38	42-49	83-100	
<i>L. seeligeri</i>	29-38	34-50	22-34	26-35	71-100
<i>L. grayi</i>	4-21	2-7	5-26	2-19	1-7

Tab. 4.10 Ergebnisse von DNA-DNA Hybridisierungen bei *Listeria* Spezies übernommen von Rocourt et al. (Rocourt, Grimont et al. 1982). Die Werte geben die % Homologien bei einer Analysentemperatur von 60°C an.

Das Ergebnis einer DNA-DNA Hybridisierungsanalyse muss nicht unbedingt die Zugehörigkeit zu einer Spezies begründen. Bei Stämmen mit einer gesamtgenomischen Differenz von < 30 % beispielsweise können nichts desto trotz rund 20 % der Gene unterschiedlich sein (Konstantinidis, Ramette et al. 2006). Diese Unterschiede im Gengehalt können, beispielsweise durch die Ökologie von unterschiedlichen Habitaten bedingt, eine phänotypische Diversität begründen, die unter Umständen eine Klassifizierung in separate Spezies rechtfertigen würde (Schloter, Lebuhn et al. 2000; Konstantinidis, Ramette et al. 2006). Der 70 % Schwellenwert bei DNA-DNA Hybridisierungen stellt im Grunde eine arbiträre Richtschnur dar, die nicht zwangsläufig mit genomischen Clustern korrelieren muss (Goris, Konstantinidis et al. 2007). Für die Neubeschreibung von Spezies oder Genera ist zur korrekten taxonomischen Klassifizierung daher ein polyphasischer Ansatz gefordert, der sowohl die genotypische als auch die phänotypische Charakterisierung von Isolaten einschließt (Stackebrandt, Frederiksen et al. 2002; Kampfer, Buczolits et al. 2003; Logan, Berge et al. 2009; Tindall, Rossello-Mora et al. 2010). Letzten Endes jedoch gewähren nur die Sequenzen von kompletten Genomen einen Einblick in den vollständigen Genpool von Isolaten, wodurch auch eine eindeutige Klassifizierung möglich wäre (Konstantinidis, Ramette et al. 2006).

5 Literatur

- Aguado, V., A. I. Vitas, et al. (2004). "Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA." Int J Food Microbiol **90**(3): 341-7.
- Allerberger, F. and S. J. Fritschel (1999). "Use of automated ribotyping of Austrian *Listeria monocytogenes* isolates to support epidemiological typing." J Microbiol Methods **35**(3): 237-44.
- Altenburger, P., P. Kampfer, et al. (1996). "Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting." J Biotechnology **47**(1): 39-52.
- Arimi, S. M., E. T. Ryser, et al. (1997). "Diversity of *Listeria* ribotypes recovered from dairy cattle, silage, and dairy processing environments." J Food Prot **60**(7): 811-816.
- Arvanitidou, M., A. Papa, et al. (1997). "The occurrence of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. in surface waters." Microbiol Res **152**(4): 395-7.
- Audurier, A., R. Chatelain, et al. (1979). "[Bacteriophage typing of 823 *Listeria monocytogenes*" strains isolated in France from 1958 to 1978 (author's transl)]." Ann Microbiol (Paris) **130B**(2): 179-89.
- Baudart, J., K. Lemarchand, et al. (2000). "Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions." Appl Environ Microbiol **66**(4): 1544-52.
- Bernagozzi, M., F. Bianucci, et al. (1994). "Study of the prevalence of *Listeria* spp. in surface water." Zentralbl Hyg Umweltmed **196**(3): 237-44.
- Bernagozzi, M., R. Sacchetti, et al. (1995). "Comparison of different selective methods for detection of *Listeria* species in surface water." Zentralbl Hyg Umweltmed **198**(2): 124-37.
- Besnard, V., M. Federighi, et al. (2002). "Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*." Vet Res **33**(4): 359-70.
- Beumer, R. R. and W. C. Hazeleger (2003). "*Listeria monocytogenes*: diagnostic problems." FEMS Immunol Med Microbiol **35**(3): 191-7.
- Beumer, R. R., M. C. te Giffel, et al. (1996). "*Listeria* species in domestic environments." Epidemiol Infect **117**(3): 437-42.
- Bille, J., B. Catimel, et al. (1992). "API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates." Appl Environ Microbiol **58**(6): 1857-60.
- Boerlin, P., E. Bannerman, et al. (1995). "Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods." Res Microbiol **146**(1): 35-49.
- Boerlin, P., J. Rocourt, et al. (1992). "*Listeria ivanovii* subsp. londoniensis subsp. nov." Int J Syst Bacteriol **42**(1): 69-73.
- Borucki, M. K., C. C. Gay, et al. (2005). "Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* strains from a high-prevalence dairy farm." Appl Environ Microbiol **71**(10): 5893-9.
- Borucki, M. K., S. H. Kim, et al. (2004). "Selective discrimination of *Listeria monocytogenes* epidemic strains by a mixed-genome DNA microarray compared to discrimination by pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and multilocus sequence typing." J Clin Microbiol **42**(11): 5270-6.
- Borucki, M. K., M. J. Krug, et al. (2003). "Discrimination among *Listeria monocytogenes* isolates using a mixed genome DNA microarray." Vet Microbiol **92**(4): 351-62.

- Botzler, R. G., A. B. Cowan, et al. (1974). "Survival of *Listeria monocytogenes* in soil and water." J Wildl Dis **10**(3): 204-12.
- Botzler, R. G., A. B. Cowan, et al. (1975). "Rate of *Listeria monocytogenes* shedding from frogs." J Wildl Dis **11**(2): 277-9.
- Botzler, R. G., T. F. Wetzler, et al. (1973). "*Listeria* in aquatic animals." J Wildl Dis **9**(2): 163-70.
- Bouttefroy, A., J. P. Lemaitre, et al. (1997). "Prevalence of *Listeria* sp. in droppings from urban rooks (*Corvus frugilegus*)." J Appl Microbiol **82**(5): 641-7.
- Brenner, D. J., N. R. Krieg, et al. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Bergey's Manual Trust. **2nd ed., 2**.
- Brenner, D. J., M. A. Martin, et al. (1967). "Deoxyribonucleic acid homologies among some bacteria." J Bacteriol **94**(2): 486-7.
- Bruce, J. L., R. J. Hubner, et al. (1995). "Sets of EcoRI fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different strains of *Listeria monocytogenes*." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 5229-33.
- Bruhn, J. B., B. F. Vogel, et al. (2005). "Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in University of Vermont selective enrichments." Appl Environ Microbiol **71**(2): 961-7.
- Bubert, A., I. Hein, et al. (1999). "Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR." Appl Environ Microbiol **65**(10): 4688-92.
- Buchrieser, C., C. Rusniok, et al. (2003). "Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity." FEMS Immunol Med Microbiol **35**(3): 207-13.
- Bulmer, M. G. (1974). On fitting the Poisson lognormal distribution to species-abundance data, *JSTOR*. **30**: 101-110.
- Cai, S., D. Y. Kabuki, et al. (2002). "Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*." J Clin Microbiol **40**(9): 3319-25.
- Call, D. R., M. K. Borucki, et al. (2003). "Mixed-genome microarrays reveal multiple serotype and lineage-specific differences among strains of *Listeria monocytogenes*." J Clin Microbiol **41**(2): 632-9.
- Call, D. R., M. K. Borucki, et al. (2003). "Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays." J Microbiol Methods **53**(2): 235-43.
- Casarez, E. A., S. D. Pillai, et al. (2007). "Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR." Water Res **41**(16): 3643-8.
- Cashion, P., M. A. Holder-Franklin, et al. (1977). "A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA." Anal Biochem **81**(2): 461-6.
- Caugant, D. A., F. E. Ashton, et al. (1996). "Multilocus enzyme electrophoresis for characterization of *Listeria monocytogenes* isolates: results of an international comparative study." Int J Food Microbiol **32**(3): 301-11.
- Chambel, L., M. Sol, et al. (2007). "Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle." Int J Food Microbiol **116**(1): 52-63.
- Chan, M. S., M. C. Maiden, et al. (2001). "Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens." Bioinformatics **17**(11): 1077-83.

- Chao, A. (1984). "Nonparametric estimation of the number of classes in a population." Scand J Statist **11**(4): 265-270.
- Chen, Y., W. Zhang, et al. (2005). "Multi-virulence-locus sequence typing clarifies epidemiology of recent listeriosis outbreaks in the United States." J Clin Microbiol **43**(10): 5291-4.
- Chen, Y., W. Zhang, et al. (2007). "Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*." J Clin Microbiol **45**(3): 835-46.
- Chial, H. (2008). "DNA Fingerprinting Using Amplified Fragment Length Polymorphism." Nat Education.
- Churchill, R. L., H. Lee, et al. (2006). "Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food." J Microbiol Methods **64**(2): 141-70.
- Clark, A. G. and J. McLaughlin (1997). "Simple color tests based on an alanyl peptidase reaction which differentiate *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species." J Clin Microbiol **35**(8): 2155-6.
- Cocolin, L., S. Stella, et al. (2005). "Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources." Int J Food Microbiol **103**(2): 167-78.
- Coffey, A., F. M. Rombouts, et al. (1996). "Influence of environmental parameters on phosphatidylcholine phospholipase C production in *Listeria monocytogenes*: a convenient method to differentiate *L. monocytogenes* from other *Listeria* species." Appl Environ Microbiol **62**(4): 1252-6.
- Colburn, K. G., C. A. Kaysner, et al. (1990). "*Listeria* species in a California coast estuarine environment." Appl Environ Microbiol **56**(7): 2007-11.
- Collins, M. D., S. Wallbanks, et al. (1991). "Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA." Int J Syst Bacteriol **41**(2): 240-6.
- Corcoran, D., D. Clancy, et al. (2006). "Comparison of *Listeria monocytogenes* strain types in Irish smoked salmon and other foods." Int J Hyg Environ Health **209**(6): 527-34.
- Cornu, M., M. Kalmokoff, et al. (2002). "Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths." Int J Food Microbiol **73**(2-3): 261-74.
- Costa, J., I. Tiago, et al. (2005). "Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater." Appl Environ Microbiol **71**(2): 663-71.
- Curtis, G. D. and W. H. Lee (1995). "Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*." Int J Food Microbiol **26**(1): 1-13.
- Curtis, G. D. W., R. G. Mitchell, et al. (1989). "A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*." Lett Appl Microbiol **8**(3): 95-98.
- Curtis, T. P., W. T. Sloan, et al. (2002). "Estimating prokaryotic diversity and its limits." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10494-9.
- Czajka, J., N. Bsat, et al. (1993). "Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms." Appl Environ Microbiol **59**(1): 304-8.
- da Mota, F. F., E. A. Gomes, et al. (2005). "Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel rpoB-based PCR-DGGE method." FEMS Microbiol Ecol **53**(2): 317-28.
- De Ley, J., H. Cattoir, et al. (1970). "The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates." Eur J Biochem **12**(1): 133-42.

- Dijkstra, R. G. (1982). "The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of a sewage treatment plant." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B **176**(2-3): 202-5.
- Donald, A. S., D. R. Fenlon, et al. (1995). "The relationship between ecophysiology, indigenous microflora and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage." J Appl Bacteriol **79**(2): 141-8.
- Donker-Voet, J. (1972). "Proceedings: *Listeria monocytogenes*: some biochemical and serological aspects." Acta Microbiol Acad Sci Hung **19**(4): 287-91.
- Doyle, M. P. and J. L. Schoeni (1986). "Selective-enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens." Appl Environ Microbiol **51**(5): 1127-9.
- El-Shenawy, M. A. and M. A. El-Shenawy (2006). "*Listeria* spp. in the coastal environment of the Aqaba Gulf, Suez Gulf and the Red Sea." Epidemiol Infect **134**(4): 752-7.
- Erdogan, H. M., P. J. Cripps, et al. (2002). "Optimization of a culture technique for the isolation of *Listeria monocytogenes* from faecal samples." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **49**(10): 502-6.
- Esteban, J. I., B. Oporto, et al. (2009). "Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain." BMC Vet Res **5**: 2.
- Farber, J. M. and C. J. Addison (1994). "RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*." J Appl Bacteriol **77**(3): 242-50.
- Farber, J. M. and P. I. Peterkin (1991). "*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen." Microbiol Rev **55**(3): 476-511.
- Fenlon, D. R. (1985). "Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment." J Appl Bacteriol **59**(6): 537-43.
- Fenlon, D. R. (1986). "Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves." Vet Rec **118**(9): 240-2.
- Fenlon, D. R., J. Wilson, et al. (1996). "The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing." J Appl Bacteriol **81**(6): 641-50.
- Fensterbank, R., A. Audurier, et al. (1984). "*Listeria* strains isolated from sick animals and consumed silage." Ann Rech Vet **15**(1): 113-8.
- Fierer, N., M. Breitbart, et al. (2007). "Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil." Appl Environ Microbiol **73**(21): 7059-66.
- Fierer, N. and R. B. Jackson (2006). "The diversity and biogeography of soil bacterial communities." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(3): 626-31.
- Fonnesbech Vogel, B., V. Fussing, et al. (2004). "High-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* by fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis compared to pulsed-field gel electrophoresis, random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping, and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis." J Food Prot **67**(8): 1656-65.
- Fonnesbech Vogel, B., H. H. Huss, et al. (2001). "Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods." Appl Environ Microbiol **67**(6): 2586-95.

- Fox, G. E., K. R. Pechman, et al. (1977). "Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics." Int J Syst Bacteriol **27**(1): 44.
- Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, et al. (1992). "How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity." Int J Syst Bacteriol **42**(1): 166-70.
- Frances, N., H. Hornby, et al. (1991). "The isolation of *Listeria* species from fresh-water sites in Cheshire and North Wales." Epidemiology and Infection **107**(01): 235-238.
- Fredrickson, J. K., D. L. Balkwill, et al. (1991). "Physiological diversity and distributions of heterotrophic bacteria in deep cretaceous sediments of the atlantic coastal plain." Appl Environ Microbiol **57**(2): 402-11.
- Gandhi, M. and M. L. Chikindas (2007). "*Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive." Int J Food Microbiol **113**(1): 1-15.
- Gans, J., M. Wolinsky, et al. (2005). "Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil." Science **309**(5739): 1387-90.
- Garrec, N., L. Sutra, et al. (2003). "Development of a protocol for the isolation of *Listeria monocytogenes* from sludge." Water Res **37**(19): 4810-4.
- Gerhardt, P., R. G. E. Murray, et al. (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington D.C.
- Geuenich, H. H. and H. E. Muller (1984). "Isolation and germ count of *Listeria monocytogenes* in raw and biologically treated waste water." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B **179**(3): 266-73.
- Gitter, M., R. S. Stebbings, et al. (1986). "Relationship between ovine listeriosis and silage feeding." Vet Rec **118**(8): 207-8.
- Glaser, P., L. Frangeul, et al. (2001). "Comparative genomics of *Listeria* species." Science **294**(5543): 849-52.
- Goh, S. H., S. Potter, et al. (1996). "HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci." J Clin Microbiol **34**(4): 818.
- Goris, J., K. T. Konstantinidis, et al. (2007). "DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities." Int J Syst Evol Microbiol **57**(Pt 1): 81-91.
- Gorski, L., D. Flaherty, et al. (2006). "Competitive fitness of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed cultures with and without food in the U.S. Food and Drug Administration enrichment protocol." Appl Environ Microbiol **72**(1): 776-83.
- Gotelli, N. J. and R. K. Colwell (2001). "Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness." Ecology Letters **4**(4): 379-391.
- Graves, L. M., L. O. Hiesel, et al. (2009). "*Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest." Int J Syst Evol Microbiol **60**(1280-1288): 1280-1288.
- Graves, L. M. and B. Swaminathan (2001). "PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis." Int J Food Microbiol **65**(1-2): 55-62.
- Gray, M. L. (1960). "A possible link in the relationship between silage feeding and listeriosis." J Am Vet Med Assoc **136**: 205-8.
- Gray, M. L. and A. H. Killinger (1966). "*Listeria monocytogenes* and listeric infections." Bacteriol Rev **30**(2): 309-82.

- Gronstol, H. (1979). "Listeriosis in sheep. Isolation of *Listeria monocytogenes* from grass silage." Acta Vet Scand **20**(4): 492-7.
- Gudmundsdottir, K. B., B. Aalbaek, et al. (2004). "The diversity of *Listeria monocytogenes* strains from 10 Icelandic sheep farms." J Appl Microbiol **96**(5): 913-21.
- Guerra, M. M., F. Bernardo, et al. (2002). "Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*." Syst Appl Microbiol **25**(3): 456-61.
- Halpin, J. L., N. M. Garrett, et al. "Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*." Foodborne Pathog Dis **7**(3): 293-8.
- Hansen, C. H., B. F. Vogel, et al. (2006). "Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in Danish aquatic and fish-processing environments." J Food Prot **69**(9): 2113-22.
- Harte, J., A. Kinzig, et al. (1999). "Self-similarity in the distribution and abundance of species." Science **284**(5412): 334-6.
- Hayes, P. S., L. M. Graves, et al. (1992). "Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods." J Food Prot **55**(12): 952-959.
- Hein, I., D. Klein, et al. (2001). "Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay." Res Microbiol **152**(1): 37-46.
- Helm, D., H. Labischinski, et al. (1991). "Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy." J Gen Microbiol **137**(1): 69-79.
- Henry, B. S. (1933). "Dissociation in the genus *Brucella*." J Infect Diseases **52**(3): 374-402.
- Ho, A. J., R. Ivanek, et al. (2007). "*Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes." Prev Vet Med **80**(4): 287-305.
- Ho, A. J., V. R. Lappi, et al. (2007). "Longitudinal monitoring of *Listeria monocytogenes* contamination patterns in a farmstead dairy processing facility." J Dairy Sci **90**(5): 2517-24.
- Holah, J. T., J. H. Taylor, et al. (2002). "Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*." Symp Ser Soc Appl Microbiol(31): 111S-120S.
- Holt, C., D. Hirst, et al. (1995). "Discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variate analysis." Appl Environ Microbiol **61**(1): 377-8.
- Hubner, R. J., E. M. Cole, et al. (1995). "Types of *Listeria monocytogenes* predicted by the positions of *EcoRI* cleavage sites relative to ribosomal RNA sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 5234-8.
- Hughes, J. B., J. J. Hellmann, et al. (2001). "Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity." Appl Environ Microbiol **67**(10): 4399-406.
- Hunter, P. R. and M. A. Gaston (1988). "Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity." J Clin Microbiol **26**(11): 2465-6.
- Hurlbert, S. H. (1971). "The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters." Ecology **52**(4): 577-586.

- Huß, V. A. R., H. Festl, et al. (1983). "Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates." Syst Appl Microbiol **4**: 184–192.
- Husu, J. R. (1990). "Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle." Zentralbl Veterinarmed B **37**(4): 276-82.
- Ivanek, R., Y. T. Grohn, et al. (2009). "Modeling of spatially referenced environmental and meteorological factors influencing the probability of *Listeria* species isolation from natural environments." Appl Environ Microbiol **75**(18): 5893-909.
- Jacquet, C., J. Rocourt, et al. (1993). "Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant and characterization of the strains isolated." Int J Food Microbiol **20**(1): 13-22.
- Jersek, B., P. Gilot, et al. (1999). "Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR." J Clin Microbiol **37**(1): 103-9.
- Jung, Y. S., J. F. Frank, et al. (2003). "Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* on frankfurters using oligonucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB." J Food Prot **66**(2): 237-41.
- Junttila, J. R., S. I. Niemela, et al. (1988). "Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*." J Appl Bacteriol **65**(4): 321-7.
- Kampfer, P., S. Buczolits, et al. (2003). "Towards a standardized format for the description of a novel species (of an established genus): *Ochrobactrum gallinifaecis* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **53**(Pt 3): 893-6.
- Kerouanton, A., A. Brisabois, et al. (1998). "Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*." Int J Food Microbiol **43**(1-2): 61-71.
- Kerr, K. G., P. Kite, et al. (1995). "Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA." J Food Prot **58**(6): 609-613.
- Klima, C. L., T. W. Alexander, et al. (2010). "Comparison of repetitive PCR and pulsed-field gel electrophoresis for the genotyping of *Mannheimia haemolytica*." J Microbiol Methods **81**(1): 39-47.
- Koeleman, J. G., J. Stoof, et al. (1998). "Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*." J Clin Microbiol **36**(9): 2522-9.
- Konstantinidis, K. T., A. Ramette, et al. (2006). "The bacterial species definition in the genomic era." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1475): 1929-40.
- Krämer, J. (2007). Lebensmittelmikrobiologie.
- Lammerding, A. M. and M. P. Doyle (1989). "Evaluation of enrichment procedures for recovering *Listeria monocytogenes* from dairy products." Int J Food Microbiol **9**(3): 249-68.
- Lawrence, L. M. and A. Gilmour (1994). "Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR." Appl Environ Microbiol **60**(12): 4600-4.
- Lawrence, L. M. and A. Gilmour (1995). "Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis." Appl Environ Microbiol **61**(6): 2139-44.

- Lawrence, L. M., J. Harvey, et al. (1993). "Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*." Appl Environ Microbiol **59**(9): 3117-9.
- Leclercq, A., D. Clermont, et al. (2010). "*Listeria rocourtiae* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **60**: 2210-2214.
- Lee, W. H. and D. McClain (1986). "Improved *Listeria monocytogenes* selective agar." Appl Environ Microbiol **52**(5): 1215-7.
- Lin, S. F., H. Schraft, et al. (1998). "Identification of *Bacillus cereus* by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)." J Food Prot **61**(7): 921-3.
- Liu, D. (2006). "Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen." J Med Microbiol **55**(Pt 6): 645-59.
- Loessner, M. J. and M. Busse (1990). "Bacteriophage typing of *Listeria* species." Appl Environ Microbiol **56**(6): 1912-8.
- Logan, N. A., O. Berge, et al. (2009). "Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria." Int J Syst Evol Microbiol **59**(Pt 8): 2114-21.
- Logue, J. B., H. Bürgmann, et al. (2008). "Progress in the ecological genetics and biodiversity of freshwater bacteria." BioScience **58**(2): 103-113.
- Lomonaco, S., L. Decastelli, et al. (2009). "*Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time." Int J Food Microbiol **128**(3): 516-20.
- Loncarevic, S., W. Tham, et al. (1996). "The clones of *Listeria monocytogenes* detected in food depend on the method used." Lett Appl Microbiol **22**(5): 381-4.
- Lovett, J. (1988). "Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products." J Assoc Off Anal Chem **71**(3): 658-60.
- Lozniewski, A., A. Humbert, et al. (2001). "Comparison of sludge and clinical isolates of *Listeria monocytogenes*." Lett Appl Microbiol **32**(5): 336-9.
- Lukinmaa, S., K. Aarnisalo, et al. (2004). "Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis." Clin Microbiol Infect **10**(6): 562-8.
- Ly, T. M. and H. E. Muller (1989). "Heat tolerance of free living and of intracellular *Listeria*." Zentralbl Hyg Umweltmed **189**(3): 272-6.
- Ly, T. M. and H. E. Muller (1990). "Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa." J Med Microbiol **33**(1): 51-4.
- Lyautey, E., D. R. Lapen, et al. (2007). "Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River watershed, Ontario, Canada." Appl Environ Microbiol **73**(17): 5401-10.
- MacDonald, F. and A. D. Sutherland (1994). "Important differences between the generation times of *Listeria monocytogenes* and *List. innocua* in two *Listeria* enrichment broths." J Dairy Res **61**(3): 433-6.
- MacGowan, A. P., K. Bowker, et al. (1994). "The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources." Int J Food Microbiol **21**(4): 325-34.
- Malak, M., A. Vivier, et al. (2001). "RAPD analysis, serotyping, and esterase typing indicate that the population of *Listeria monocytogenes* strains recovered from cheese and from patients with listeriosis in Belgium are different." Can J Microbiol **47**(9): 883-7.

- Mariey, L., J. P. Signolle, et al. (2001). "Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics." Vibrational Spectroscopy **26**(2): 151-159.
- Martin, P., C. Jacquet, et al. (2006). "Pulsed-field gel electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe Feasibility Study." Foodborne Pathog Dis **3**(3): 303-8.
- Martinez, I., L. M. Rørvik, et al. (2003). "Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing." Int J Food Microbiol **84**(3): 285-297.
- Mazurier, S. I. and K. Wernars (1992). "Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA." Res Microbiol **143**(5): 499-505.
- McCray Batzli, J., W. R. Graves, et al. (1992). "Diversity among Rhizobia Effective with Robinia pseudoacacia L." Appl Environ Microbiol **58**(7): 2137-43.
- Mead, P. S., L. Slutsker, et al. (1999). "Food-related illness and death in the United States." Emerg Infect Dis **5**(5): 607-25.
- Meinersmann, R. J., R. W. Phillips, et al. (2004). "Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages." Appl Environ Microbiol **70**(4): 2193-203.
- Meng, J. and M. P. Doyle (2002). "Introduction. Microbiological food safety." Microbes Infect **4**(4): 395-7.
- Mesbah, M., U. Premachandran, et al. (1989). "Precise measurement of the G+ C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography." Int J Syst Bacteriol **39**(2): 159-167.
- Micheli, M. R., R. Bova, et al. (1993). "Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting using combinations of oligonucleotide primers." Biotechniques **15**(3): 388-90.
- Miettinen, H. and G. Wirtanen (2006). "Ecology of *Listeria* spp. in a fish farm and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from fish farming and processing companies." Int J Food Microbiol **112**(2): 138-46.
- Miya, S., B. Kimura, et al. (2008). "Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains." Int J Food Microbiol **124**(3): 239-49.
- Mohapatra, B. R., K. Broersma, et al. (2007). "Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds." FEMS Microbiol Lett **277**(1): 98-106.
- Monfort, P., J. Minet, et al. (1998). "Incidence of *Listeria* spp. in Breton live shellfish." Lett Appl Microbiol **26**(3): 205-8.
- Morales, S. E., T. F. Cosart, et al. (2009). "Extensive phylogenetic analysis of a soil bacterial community illustrates extreme taxon evenness and the effects of amplicon length, degree of coverage, and DNA fractionation on classification and ecological parameters." Appl Environ Microbiol **75**(3): 668-75.
- Moshtaghi, H., S. R. Garg, et al. (2003). "Prevalence of *Listeria* in soil." Indian J Exp Biol **41**(12): 1466-8.
- Mueller, U. G. and L. L. Wolfenbarger (1999). "AFLP genotyping and fingerprinting." Trends Ecol Evol **14**(10): 389-394.
- Murray, E. G. D., R. A. Webb, et al. (1926). "A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.)." J Pathol **29**(4): 407-439.

- Nesbakken, T., G. Kapperud, et al. (1996). "Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry." Int J Food Microbiol **31**(1-3): 161-71.
- Nightingale, K. K., E. D. Fortes, et al. (2005). "Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants." J Am Vet Med Assoc **227**(11): 1808-14.
- Nightingale, K. K., Y. H. Schukken, et al. (2004). "Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment." Appl Environ Microbiol **70**(8): 4458-67.
- Nightingale, K. K., K. Windham, et al. (2005). "Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods." J Bacteriol **187**(16): 5537-51.
- Norton, D. M., M. A. McCamey, et al. (2001). "Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry." Appl Environ Microbiol **67**(1): 198-205.
- Olive, D. M. and P. Bean (1999). "Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms." J Clin Microbiol **37**(6): 1661-9.
- Oliver, H., M. Wiedmann, et al. (2007). "Environmental reservoir and transmission into the mammalian host." Pathogenesis Host Response **10**: 111-137.
- Oravcova, K., T. Trncikova, et al. (2008). "Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*." J Appl Microbiol **104**(2): 429-37.
- Ottaviani, F., M. Ottaviani, et al. (1997). "Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*." Industrie Alimentari **36**(361): 888-895.
- Oust, A., T. Møretrø, et al. (2004). "FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli." J Microbiol Methods **59**(2): 149-162.
- Paillard, D., V. Dubois, et al. (2003). "Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23S rRNA gene fragments." Appl Environ Microbiol **69**(11): 6386-92.
- Paillard, D., V. Dubois, et al. (2005). "Occurrence of *Listeria* spp. in effluents of French urban wastewater treatment plants." Appl Environ Microbiol **71**(11): 7562-6.
- Parish, M. E. and D. P. Higgins (1989). "Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems." J Food Prot **52**: 144-147.
- Parisi, A., L. Latorre, et al. (2009). "Amplified Fragment Length Polymorphism and Multi-Locus Sequence Typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment." Food Microbiol **27**(1): 101-8.
- Peel, M., W. Donachie, et al. (1988). "Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting." J Gen Microbiol **134**(8): 2171-8.
- Petran, R. L. and K. M. J. Swanson (1993). "Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*." J Food Prot **56**(7): 616-618.
- Piffaretti, J. C., H. Kressebuch, et al. (1989). "Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(10): 3818-22.
- Pinto, B. and D. Reali (1996). "Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other listerias in Italian-made soft cheeses." Zentralbl Hyg Umweltmed **199**(1): 60-8.
- Portnoy, D. A., V. Auerbuch, et al. (2002). "The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity." J Cell Biol **158**(3): 409-14.

- Preston, F. W. (1948). The commonness, and rarity, of species, *Eco Soc America* **29**: 254-283.
- Quessy, S. and S. Messier (1992). "Prevalence of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*)." *J Wildl Dis* **28**(4): 526-31.
- Raaijmakers, J. G. (1987). "Statistical analysis of the Michaelis-Menten equation." *Biometrics* **43**(4): 793-803.
- Rebuffo-Scheer, C. A., J. Dietrich, et al. (2008). "Identification of five *Listeria* species based on infrared spectra (FTIR) using macrosamples is superior to a microsample approach." *Anal Bioanal Chem* **390**(6): 1629-35.
- Rebuffo, C. A., J. Schmitt, et al. (2006). "Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy." *Appl Environ Microbiol* **72**(2): 994-1000.
- Rhuland, L. E., E. Work, et al. (1955). "The behavior of the isomers of a, e-diaminopimelic acid on paper chromatograms." *J Am Chem Soc* **77**: 4844-4846.
- Roberts, A. J. and M. Wiedmann (2003). "Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis." *Cell Mol Life Sci* **60**(5): 904-18.
- Rocourt, J., F. Grimont, et al. (1982). "DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes* sensu lato." *Curr Microbiol* **7**(6): 383-388.
- Rocourt, J., P. Boerlin, et al. (1992). "Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*." *Int J Syst Bacteriol* **42**(1): 171-4.
- Rocourt, J. and P. A. D. Grimont (1983). "*Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov." *Int J Syst Bacteriol* **33**(4): 866-869.
- Rodas-Suarez, O. R., J. F. Flores-Pedroche, et al. (2006). "Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water." *Appl Environ Microbiol* **72**(11): 7410-2.
- Roesch, L. F., R. R. Fulthorpe, et al. (2007). "Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity." *Isme J* **1**(4): 283-90.
- Rorvik, L. M., D. A. Caugant, et al. (1995). "Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant." *Int J Food Microbiol* **25**(1): 19-27.
- Ryser, E. T., S. M. Arimi, et al. (1996). "Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media." *Appl Environ Microbiol* **62**(5): 1781-7.
- Ryser, E. T., S. M. Arimi, et al. (1997). "Effects of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay, and grass silage." *Appl Environ Microbiol* **63**(9): 3695-7.
- Ryser, E. T. and E. H. Marth (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*. New York, CRC.
- Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol* **4**(4): 406-425.
- Salcedo, C., L. Arreaza, et al. (2003). "Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones." *J Clin Microbiol* **41**(2): 757-62.
- Sallen, B., A. Rajoharison, et al. (1996). "Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species." *Int J Syst Bacteriol* **46**(3): 669-74.
- Samelis, J., A. Bleicher, et al. "FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese." *Food Microbiol* **28**(1): 76-83.

- Sauders, B. D., M. Z. Durak, et al. (2006). "Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments." J Food Prot **69**(1): 93-105.
- Sauders, B. D., Z. M. Durak, et al. (2006). "Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* from Natural and Urban Environments." Journal of Food Protection **69**(1): 93-105.
- Sauders, B. D., E. D. Fortes, et al. (2003). "Molecular subtyping to detect human listeriosis clusters." Emerg Infect Dis **9**(6): 672-80.
- Sauders, B. D., Y. Schukken, et al. (2006). "Molecular epidemiology and cluster analysis of human listeriosis cases in three U.S. states." J Food Prot **69**(7): 1680-9.
- Schaffter, N. and A. Parriaux (2002). "Pathogenic-bacterial water contamination in mountainous catchments." Water Res **36**(1): 131-9.
- Schaffter, N., J. Zumstein, et al. (2004). "Factors influencing the bacteriological water quality in mountainous surface and groundwaters." Act Hydroch Hydrob. **32**(3): 225-234.
- Schlech III, W. F. (2000). "Foodborne listeriosis." Clin Infect Diseases **31**: 770-775.
- Schlech, W. F., 3rd, P. M. Lavigne, et al. (1983). "Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food." N Engl J Med **308**(4): 203-6.
- Schleifer, K. H. and O. Kandler (1972). "Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications." Bacteriol Rev **36**(4): 407-77.
- Schlöter, M., M. Leubhn, et al. (2000). "Ecology and evolution of bacterial microdiversity." FEMS Microbiol Rev **24**(5): 647-60.
- Schonberg, A., E. Bannerman, et al. (1996). "Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*." Int J Food Microbiol **32**(3): 279-87.
- Schuchat, A., B. Swaminathan, et al. (1991). "Epidemiology of human listeriosis." Clin Microbiol Rev **4**(2): 169-83.
- Seaby, R. M. and P. A. Henderson (2006). Species Diversity and Richness IV. L. Pisces Conservation Ltd. Lymington, England.
- Seeley, H. W., P. J. VanDemark, et al. (1997). Microbes in action: a laboratory manual of microbiology, WH Freeman.
- Seeliger, H. P. R. (1981). "Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. n.(Seeliger et Schoofs, 1977)." Zentralbl Bakteriell Parasitenkd. **A 249**: 487-493.
- Seeliger, H. P. R. and K. Hohne (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. London, Academic Press.
- Senczek, D., R. Stephan, et al. (2000). "Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period." Int J Food Microbiol **62**(1-2): 155-9.
- Simpson, E. H. (1949). "Measurement of diversity." Nature **163**(4148): 688.
- Skerman, V. B. D., V. McGowan, et al. (1980). "Approved lists of bacterial names." Int J Syst Bacteriol **30**: 225-420.
- Skovgaard, N. and C. A. Morgen (1988). "Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin." Int J Food Microbiol **6**(3): 229-42.
- Smith, J. H., J. D. Wickham, et al. (2001). "Utilization of landscape indicators to model potential pathogen impaired waters." JAWRA **37**(4): 805-814.
- Stackebrandt, E., W. Frederiksen, et al. (2002). "Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology." Int J Syst Evol Microbiol **52**(Pt 3): 1043-7.

- Swaminathan, B., T. J. Barrett, et al. (2001). "PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States." Emerg Infect Dis **7**(3): 382-9.
- Swaminathan, B., S. B. Hunter, et al. (1996). "WHO-sponsored international collaborative study to evaluate methods for subtyping *Listeria monocytogenes*: restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using ribotyping and Southern hybridization with two probes derived from *L. monocytogenes* chromosome." Int J Food Microbiol **32**(3): 263-78.
- Tamaoka, J. and K. Komagata (1984). "Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography." FEMS Microbiology Letters **25**(1): 125-128.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, et al. (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucleic Acids Res **25**(24): 4876-82.
- Tilney, L. G. and D. A. Portnoy (1989). "Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*." J Cell Biol **109**(4 Pt 1): 1597-608.
- Tindall, B. J., R. Rossello-Mora, et al. (2010). "Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes." Int J Syst Evol Microbiol **60**(Pt 1): 249-66.
- Torsvik, V., K. Salte, et al. (1990). "Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria." Appl Environ Microbiol **56**(3): 776-81.
- Tyler, K. D., G. Wang, et al. (1997). "Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens." J Clin Microbiol **35**(2): 339-46.
- Udelhoven, T., D. Naumann, et al. (2000). "Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria." Appl Spectroscopy **54**(10): 1471-1479.
- van Belkum, A., P. T. Tassios, et al. (2007). "Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology." Clin Microbiol Infect **13 Suppl 3**: 1-46.
- Van de Peer, Y. and R. De Wachter (1997). "Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites." Comput Appl Biosci **13**(3): 227-30.
- van Netten, P., I. Perales, et al. (1989). "Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp." Int J Food Microbiol **8**(4): 299-316.
- Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, et al. (2001). "*Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants." Clin Microbiol Rev **14**(3): 584-640.
- Verborg, S., A. Fruhling, et al. (2008). "Biostraticola tofi gen. nov., spec. nov., a novel member of the family Enterobacteriaceae." Curr Microbiol **56**(6): 603-8.
- Versalovic, J., T. Koeuth, et al. (1991). "Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes." Nucleic Acids Res **19**(24): 6823-31.
- Versalovic, J., M. Schneider, et al. (1994). "Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction." Methods Mol Cell Biol **5**(1): 25-40.
- Vlaemynck, G., V. Lafarge, et al. (2000). "Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium." J Appl Microbiol **88**(3): 430-41.

- Vogel, B. F., L. V. Jorgensen, et al. (2001). "Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses." Int J Food Microbiol **65**(1-2): 83-92.
- Volokhov, D., A. Rasooly, et al. (2002). "Identification of *Listeria* species by microarray-based assay." J Clin Microbiol **40**(12): 4720-8.
- Vos, P., R. Hogers, et al. (1995). "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." Nucleic Acids Res **23**(21): 4407-14.
- Wagner, M., A. Maderner, et al. (1999). "Development of a multiple primer RAPD assay as a tool for phylogenetic analysis in *Listeria* spp. strains isolated from milkproduct associated epidemics, sporadic cases of listeriosis and dairy environments." Int J Food Microbiol **52**(1-2): 29-37.
- Warburton, D. W., J. M. Farber, et al. (1991). "A comparative study of the 'FDA' and 'USDA' methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods." Int J Food Microbiol **13**(2): 105-17.
- Ward, T. J., L. Gorski, et al. (2004). Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol. **186**: 4994-5002.
- Watkins, J. and K. P. Sleath (1981). "Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water." J Appl Bacteriol **50**(1): 1-9.
- Wayne, L. G., D. J. Brenner, et al. (1987). "Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics." Int J Syst Bacteriol **37**(4): 463-464.
- Weis, j. (1974). "Listerienfunde bei heimischen Wildtieren." Fortschritte der Veterinärmedizin **20**(10. Kongreßbericht): 240-244.
- Weis, J. and H. P. Seeliger (1975). "Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature." Appl Microbiol **30**(1): 29-32.
- Welsh, J. and M. McClelland (1991). "Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers." Nucleic Acids Res **19**(19): 5275-9.
- Welshimer, H. J. (1960). "Survival of *Listeria monocytogenes* in soil." J Bacteriol **80**: 316-20.
- Welshimer, H. J. (1968). "Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation." J Bacteriol **95**(2): 300-3.
- Welshimer, H. J. and J. Donker-Voet (1971). "*Listeria monocytogenes* in nature." Appl Microbiol **21**(3): 516-9.
- Wenning, M., N. R. Buchl, et al. "Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks." J Biophotonics **3**(8-9): 493-505.
- Wenning, M., S. Scherer, et al. (2008). Infrared spectroscopy in the identification of microorganisms. Handbook of Vibrational Spectroscopy. P. R. G. Max Diem, John M. Chalmers, Wiley Online Library. **1**: 71-96.
- Wenning, M., H. Seiler, et al. (2002). "Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts." Appl Environ Microbiol **68**(10): 4717-21.
- Wiedmann, M., J. L. Bruce, et al. (1997). "Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential." Infect Immun **65**(7): 2707-16.

- Wiedmann, M., J. L. Bruce, et al. (1996). "Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants." J Clin Microbiol **34**(5): 1086-90.
- Wiedmann, M., J. Czajka, et al. (1994). "Diagnosis and epidemiological association of *Listeria monocytogenes* strains in two outbreaks of listerial encephalitis in small ruminants." J Clin Microbiol **32**(4): 991-6.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, et al. (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." Nucleic Acids Res **18**(22): 6531-5.
- Wilson, I. G. (1995). "Occurrence of *Listeria* species in ready to eat foods." Epidemiol Infect **115**(3): 519-26.
- Wulff, G., L. Gram, et al. (2006). "One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses." Appl Environ Microbiol **72**(6): 4313-22.
- Yang, H. H., R. T. Vinopal, et al. (2004). "High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot." Appl Environ Microbiol **70**(3): 1528-36.
- Yarza, P., M. Richter, et al. (2008). "The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains." Syst Appl Microbiol **31**(4): 241-50.
- Yoshida, T., M. Takeuchi, et al. (1999). "Typing *Listeria monocytogenes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting." J Vet Med Sci **61**(7): 857-60.
- Zhang, W., B. M. Jayarao, et al. (2004). "Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*." Appl Environ Microbiol **70**(2): 913-20.

Publikationen

Evi Lang Halter and Siegfried Scherer. The water plant *Ranunculus fluitans* and Creek Sediments are Continuously Populated by *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* and *L. seeligeri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, in revision.

Evi Lang Halter, Klaus Neuhaus and Siegfried Scherer. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov. isolated from limnic sediments and water plants. *Int J Syst Evol Microbiol.*, manuscript in preparation.

Posterpräsentationen

Evi Lang Halter, Galina Mai and Siegfried Scherer (2009) Prevalence and Biodiversity of *Listeria* Species in a Natural Habitat. Milchkonferenz 2009, Wien

Curriculum Vitae

Evi Lang Halter

Persönliche Angaben

Geburtsdatum:	16. Januar 1973
Geburtsort:	Bozen (Südtirol, Italien)
Familienstand:	verheiratet, 2 Söhne
Staatsangehörigkeit:	italienisch

Ausbildung

09/1987-06/1992	Staatliche Frauenoberschule Meran, Allgemeine Hochschulreife (Matura)
10/1992-11/1997	Studium an der Technischen Universität München, Freising Diplom Ökotoxikologie
12/1997-12/1998	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie der TU München, Freising Thema: Einfluss von Phagenlysin auf das Wachstum von Listerien durch rekombinante Starter- und Reifungskulturen auf der Oberfläche von Weichkäse
03/2006-04/2011	Promotion am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie der TU München, Freising