

Einfluss von Streptomycin in Apfelanlagen auf Antibiotika-Resistenzen in der Umwelt

Fiona Walsh¹, Cosima Pelludat², Brion Duffy³, Daniel P. Smith⁴,
Sarah M. Owens⁴, Jürg E. Frey², Eduard Holliger²

¹National University of Ireland, Department of Biology, Maynooth, Co Kildare Ireland

²Agroscope, Institut für Pflanzenbauwissenschaften IPB, 8820 Wädenswil, Schweiz

³ZHAW Life Sciences und Facility Management, Umweltgenomik und Systembiologie, Grüental, 8820 Wädenswil, Schweiz

⁴Argonne National Laboratory, 60439 Illinois, United States

Auskünfte: Fiona Walsh, E-Mail: fiona.walsh@nuim.ie



Apfelanlage in Vollblüte.

Einleitung

Das Antibiotikum Streptomycin wurde erstmals 1943 aus dem Bakterium *Streptomyces griseus* isoliert. Die Entdeckung seiner besonders guten Wirkung gegen den Tuberkulose-Erreger (*Mycobacterium tuberculosis*) wurde 1952 gar mit dem Nobelpreis für Medizin gewürdigt. Streptomycin hemmt die bakterielle Proteinsynthese an den Ribosomen, was zum Absterben der Bakterien führt. In Streptomyceten selber, und natürlich auch

in anderen Bakterien, die Streptomycin ausgesetzt werden, entstehen Mechanismen, um die tödliche Wirkung des Antibiotikums zu umgehen und zu verhindern – es entwickeln sich Streptomycin-Resistenzen.

Eine Streptomycin-Resistenz kann vielerlei Ursachen haben. Eine Modifikation der Ribosomen durch genetische Mutationen kann dazu führen, dass das Streptomycin nicht mehr an Ribosomen binden kann und somit nicht mehr in der Lage ist, die Proteinsynthese zu hemmen. Eine weitere Möglichkeit sind Resistenzgene (z. B.

strA (*aph3*), *strB* (*aph6*) und *aadA* (*ant3*)), welche auf mobilen DNA-Elementen liegen und für Enzyme kodieren, die Streptomycin inaktivieren. Solche mobilen Resistenzgene können nicht nur innerhalb einer Bakterienart, sondern auch an «verwandte» Bakterien weitergegeben werden. Es sind vor allem diese mobilen Resistenzgene, die in der Humanmedizin für die Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen verantwortlich sind und Befürchtungen wecken, dass ein Resistenzgentransfer vom Agro-Ökosystem in das Umfeld humanpathogener Bakterien erfolgt.

Agroscope konnte im Vorfeld der hier beschriebenen Untersuchungen zeigen, dass die in Apfelanlagen applizierten Streptomycin-Formulierungen keine Resistenzgene enthalten (Rezzonico *et al.* 2009).

Antibiotika-Resistenzen kommen natürlicherweise in Bakterien vor. Es ist jedoch weitgehend ungeklärt, wie hoch der Anteil der natürlich vorkommenden, antibiotikaresistenten Bakterien ist, und in welchem Ausmass dieser durch menschliche Einwirkung verändert wird. Es konnte bereits festgestellt werden, dass die Düngung mit Gülle von antibiotikabehandeltem Mastvieh die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt fördert. Die letzten 35 Jahre zeigten zudem, dass das Auftreten von Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika mit deren Einsatz in der Viehzucht korreliert. Daher wird in der Europäischen Union und in der Schweiz der Antibiotika-Einsatz in der Viehzucht streng reguliert und überwacht.

Feuerbrand ist eine Pflanzenkrankheit, die wichtige Kulturpflanzen wie beispielsweise Apfel, Birne und Quitte befällt und durch das Bakterium *Erwinia amylovora* ausgelöst wird. Bei starkem Feuerbrandbefall müssen Einzelbäume oder ganze Kernobstanlagen gerodet werden, um ein Ausbreiten und Übergreifen der Krankheit auf umliegende Pflanzen zu verhindern. In den USA wird deshalb in Obstanlagen schon seit 1955 Streptomycin zur Bekämpfung des Feuerbrandes eingesetzt. Streptomycin weist gegen Blüteninfektionen eine Wirksamkeit zwischen 70% bis 90% auf und ist damit zur Zeit der beste Wirkstoff gegen den Feuerbrand. Um einer Ausbreitung antibiotikaresistenter Bakterien in der Nahrungskette und dem damit verbundenen möglichen Gesundheitsrisiko vorzubeugen, besteht jedoch in der EU für Streptomycin keine Zulassung im Obstbau. Ausnahmen sind Deutschland und Österreich, in denen dieser Wirkstoff für die Feuerbrandbekämpfung durch eine Notfallzulassung bewilligt wurde.

Ein Jahr nach dem katastrophalen Feuerbrandjahr 2007 liess das Bundesamt für Landwirtschaft erstmals einen örtlich begrenzten und befristeten Einsatz von Streptomycin zur Bekämpfung von *E. amylovora* in Kern-

Zusammenfassung

Das Bundesamt für Landwirtschaft (BLW) liess 2008 den Einsatz von Streptomycin zur Bekämpfung von Feuerbrand unter kontrollierten Bedingungen zu. Es knüpfte diese Zulassung an die Auflage, die behandelten Flächen auf die Entwicklung von Antibiotika-resistenzen hin zu beobachten.

Agroscope in Wädenswil führte dazu eine erste quantitative Analyse von mobilen Streptomycin-, Tetrazyklin-Resistenzgenen (*strA*, *strB*, *aadA*, *tetB*, *tetM*, *tetW*) und der Insertionssequenz IS1133 in Streptomycin-behandelten Kernobstanlagen durch. Von drei Streptomycin-behandelten Apfelanlagen wurden in den Jahren 2010, 2011 und 2012 Blüten-, Blätter- und Bodenproben entnommen. Die Häufigkeit und Verteilung der Resistenzgene wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und in Abhängigkeit der Behandlung untersucht. Die mobilen Streptomycin- und Tetrazyklinresistenzgene konnten bereits vor der Streptomycin-Applikation in fast allen Proben nachgewiesen werden, was das Vorkommen dieser Resistenzgene in der Natur dokumentiert. Statistisch relevante Anstiege in der Häufigkeit der Resistenzgene traten gelegentlich auf, waren aber nicht konstant und traten im Folgejahr nicht wieder auf. Zusätzlich wurde in der Studie die bakterielle Zusammensetzung in Bodenproben mit und ohne Streptomycin-Applikation untersucht. Es zeigten sich ebenfalls keine signifikanten und konstanten Veränderungen.

obstanlagen in der Schweiz zu. Nur während der Blütezeit und unter sehr strengen Auflagen durften bis zu maximal drei Anwendungen in den blühenden Anlagen erfolgen, bei denen das Antibiotikum in einer Aufwandmenge von rund 130 Gramm Wirkstoff pro Hektare appliziert wurde. Um die Auswirkungen dieser Streptomycin-Applikationen auf die Umwelt zu evaluieren, führte Agroscope in Wädenswil im Auftrag der EFBS (Eidgenössische Fachkommission für biologische Sicherheit) während drei Jahren (2010–2012) eine detaillierte Studie durch.



Abb. 1 | Beispiel für eine Blüten- und Blattprobe, sowie «Blütenproben» zur Erntezeit (insgesamt drei Standorte und je drei Wiederholungen für jede Behandlung).

Material und Methode

Versuchsaufbau

In dieser Studie wurden die bakteriellen Populationen von Boden-, Blätter und Blütenproben verschiedener Streptomycin-behandelter Apfelanlagen (Wädenswil, Güttingen, Lindau ZH) untersucht. Da in den USA auch das Antibiotikum Tetrazyklin bei der Bekämpfung des Feuerbrands eingesetzt wird, wollten wir auch eine eventuelle Kreuzwirkung der Streptomycin-Applikation auf die Tetrazyklin-Resistenz untersuchen. Deshalb wurden alle Proben mit einer für die Tetrazyklin-Resistenzgene *tetB*, *tetM* und *tetW* entwickelten qPCR zusätzlich getestet.

In allen Anlagen wurde Streptomycin in gleicher Aufwandmenge pro Hektare dreimal pro Blühsaison auf dieselben Bäume appliziert. Die dreimalige Applikation entspricht dem Maximum der jemals in der Schweiz zugelassenen Anzahl pro Blühsaison (nur 2008 und 2009). In Schweizer Obstanlagen wurden in den folgenden Jahren nur zwei Applikationen zugelassen, in der Versuchsreihe von Agroscope hat man aber weiterhin mit der dreifachen Applikation gearbeitet. Somit waren die untersuchten Anlagen einer höheren Streptomycin-Menge ausgesetzt als kommerziell genutzte Anlagen auf Obstbaubetrieben. Als Kontrolle wurde die gleiche Anzahl Apfelbäume pro Anlage mit Wasser behandelt. Die Verfahren Streptomycin und Wasser wurden in jeder

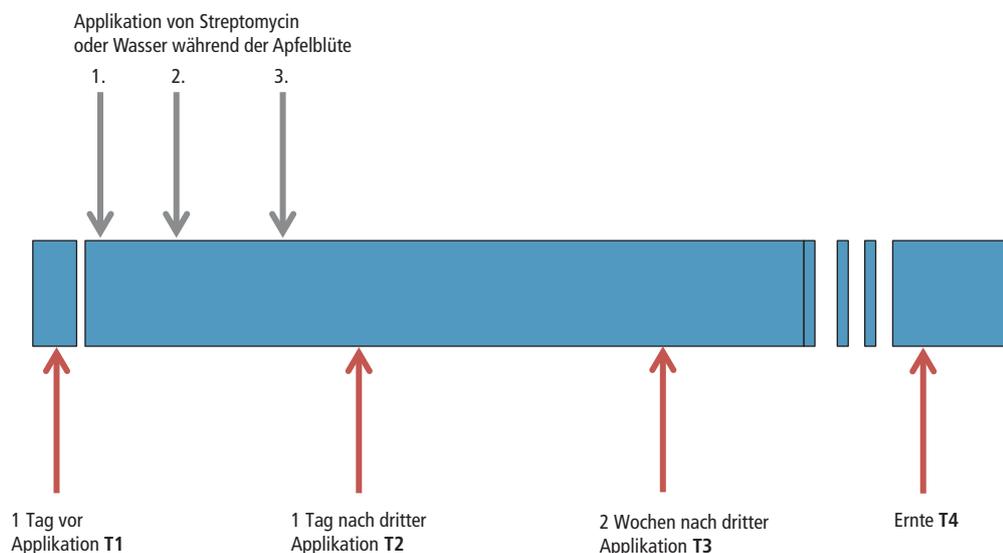


Abb. 2 | Versuchsplan mit den Streptomycin/Wasser-Applikationen und den Zeitpunkten der Probenentnahme zur Analyse.

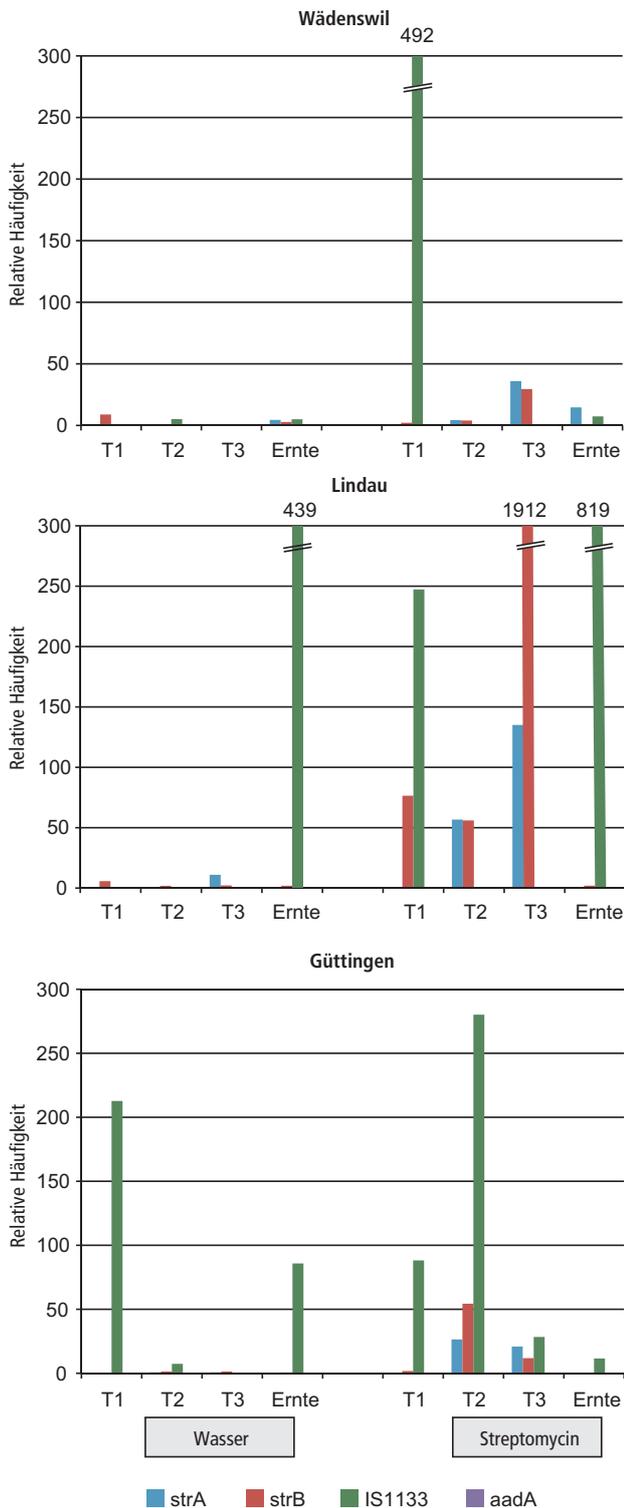


Abb. 3 | Relative Häufigkeit der Streptomycin-Resistenzgene *strA*, *strB*, *aadA* und des Insertionselement IS1133 (normalisiert mit definierten PCR Produkten) der Blütenproben aus den drei Apfelanlagen (Wädenswil, Lindau ZH und Güttingen). In den Anlagen erfolgte während der Blühsaison drei Streptomycin- bzw. Wasser- (als Kontrolle) Applikationen. Die Probeentnahmen erfolgten vor der ersten (T1) und an drei verschiedenen Zeitpunkten nach der dritten Streptomycin-Applikation (T2,T3, Ernte).

Anlage dreifach wiederholt. Aus jeder dieser Wiederholung wurden je Zeitpunkt Proben von Blüte/Frucht, Blatt und Erde entnommen (Abb. 1).

Die erste Probenentnahme erfolgte zum Zeitpunkt T1, einen Tag vor der ersten Streptomycin-Applikation. Die drei folgenden Probenahmen erfolgten einen Tag (T2) nach der dritten Streptomycin-Applikation bzw. nach zwei Wochen (T3) und zur Erntezeit (T4) (Abb. 2).

Nachweis und Quantifizierung der Resistenzgene

Aus allen Proben wurde die gesamte DNA isoliert und für anschließende Analyseverfahren verwendet. Die mobilen Streptomycin-Resistenzgene *strA* (*aph3*), *strB* (*aph6*) und *aadA* (*ant3*) sowie die Insertionssequenz IS1133, die mit dem Vorkommen von *strA* (*aph3*), *strB* (*aph6*) assoziiert wird, wurden durch eine von Agroscope entwickelte multiplex (Untersuchung mehrerer Gene in einem Reaktionsansatz) quantitative PCR (qPCR) nachgewiesen (Walsh *et. al.* 2011). Als interner Standard zur Bestimmung der Gesamtanzahl vorkommender Bakterien wurde die in allen Bakterien vorkommende 16S rRNA bestimmt. Dieses Vorgehen und die eingesetzten Techniken berücksichtigten, dass ein grosser Anteil an Umweltbakterien unter Laborstandard-Bedingungen nicht kultiviert werden kann. Die gewählten Verfahren ermöglichen die Bestimmung der Bakterienanzahl in den einzelnen Proben, die dann in Relation zur Anzahl detektierter Antibiotika-Resistenzen gesetzt wird. Die gewonnenen Daten wurde mit der Xlstat 2011 Software und ANOVA ($P < 0,05$) statistisch ausgewertet.

Analyse der bakteriellen Bodenpopulation

In neun Bodenproben von Parzellen, die mit Streptomycin oder Wasser behandelt worden sind und in Güttingen, Lindau und Wädenswil (2008, 2011) stehen, wurde zusätzlich die Zusammensetzung der Bakterienpopulationen auf mögliche Veränderungen hin untersucht. In der isolierten DNA dieser Proben wurde die V4-Region der bakteriellen 16S rRNA sequenziert, um Populationen zu definieren und miteinander vergleichen zu können.

Resultate und Diskussion

Bis auf *aadA* konnten die untersuchten Streptomycin- und Tetracyclin-Resistenzgene in nahezu allen Proben bereits vor der ersten Streptomycin-Behandlung nachgewiesen werden. In 15 Proben trat auch *aadA* auf. 2010 gab es einen Tag und auch zwei Wochen nach erfolgter Streptomycin-Applikation (T2, T3) einen statistisch relevanten Anstieg der Resistenzgene *strA* und *strB* in den Blütenproben aller Apfelanlagen. Dieser

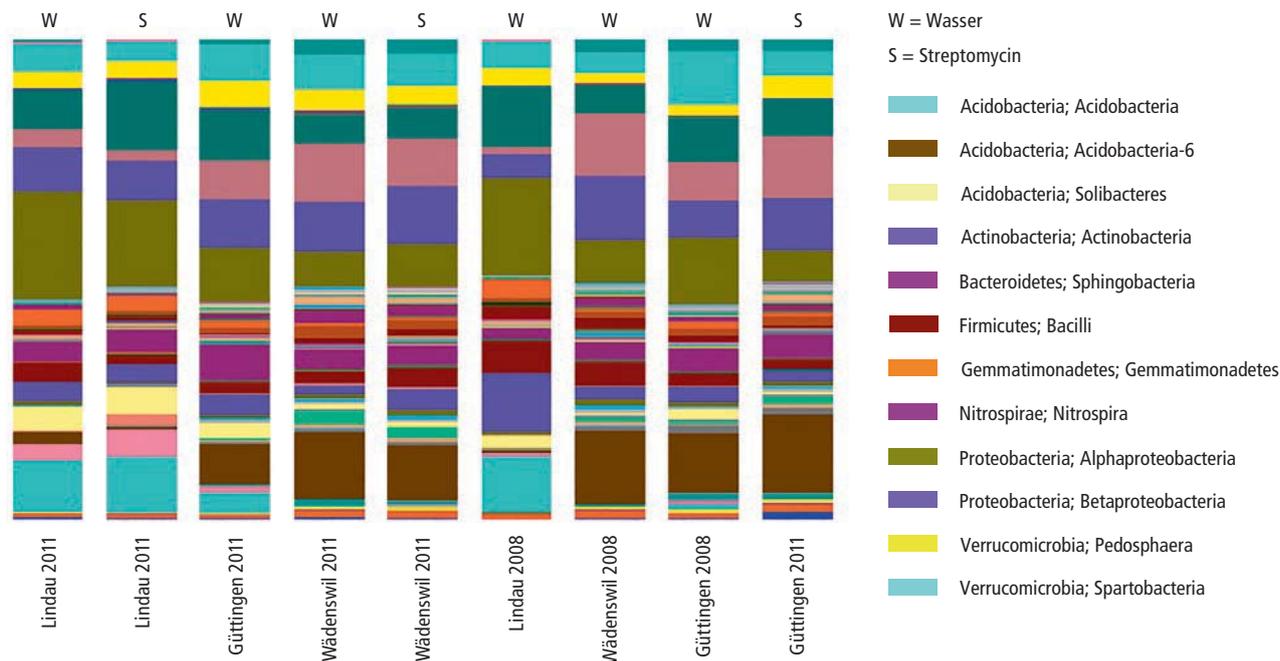


Abb. 4 | Bakterielle Zusammensetzung der untersuchten Erdproben von Apfelanlagen (2008, 2011). Aufgelistet sind die in den untersuchten Erdproben vorkommenden bakteriellen Klassen.

Anstieg konnte 2011 nicht beobachtet werden. Bei *aadA* konnte zu keinem Zeitpunkt und in keiner der Proben eine statistisch relevante Veränderung im Vorkommen festgestellt werden.

Ein Vergleich der T1-Proben aus den Jahren 2010 und 2012 hat ebenfalls keinen statistisch relevanten Unterschied in der Resistenzgenhäufigkeit ergeben. Dies ist ein Hinweis darauf, dass durch drei Streptomycin-Applikationen pro Jahr keine Langzeiteffekte auf die Häufigkeit der untersuchten Resistenzgene hervorgerufen werden.

Bei den Tetrazyklin-Resistenzgenen konnte 2011 eine statistisch relevante Erhöhung des *tetM*-Gens in T3 Bodenproben von Güttingen detektiert werden, aber nicht mehr zur Erntezeit und auch zu keinem Zeitpunkt im folgenden Jahr. *tetM* war ebenfalls nur zum Zeitpunkt T2 in Blütenproben von Güttingen erhöht vorhanden, *tetB* und *tetW* nur zur Erntezeit auf Früchten aus Lindau.

Statistisch relevante Anstiege des untersuchten Resistenzpools waren in den untersuchten Boden-, Blätter- und Blütenproben über die Jahre sporadisch, instabil und nicht wiederholbar (Abb. 3). Wir folgern daraus, dass die dreimalige Applikation von Streptomycin pro Saison in diesen Apfelanlagen keine anhaltende Erhöhung von Streptomycin- oder Tetrazyklin-Resistenzgenen zur Folge hat (Duffy *et al.* 2014).

Nicht nur die Auswirkungen einer Streptomycin-Behandlung auf die Resistenzgenhäufigkeit, sondern

auch auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft war von Interesse. Die ermittelten Daten (Abb. 4) zeigen, dass die Applikation von Streptomycin in den Apfelanlagen zu keiner signifikanten Verschiebung der bakteriellen Populationszusammensetzung führte (Walsh *et al.* 2014). Bedenkt man, dass die im Boden vorkommenden Bakterien der Ordnung *Actinomycetales*, zu denen auch *S. griseus* gehört, bekannte Antibiotikaproduzenten sind, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Bodenbakterien hatten Millionen von Jahren Zeit, sich an Antibiotika und ihre Wirkung anzupassen.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ziehen wir die Schlussfolgerung, dass die Applikation von Streptomycin in den ausgewählten Apfelanlagen nicht zu einem dauerhaften Anstieg der untersuchten Streptomycin- und Tetrazyklinresistenzgene führte und auch keine Auswirkung auf die Zusammensetzung der bakteriellen Population hatte. Die sehr strengen Auflagen für den begrenzten und befristeten Einsatz von Streptomycin bewähren sich im Hinblick auf die Antibiotikaresistenzentwicklung in der Umwelt. ■

Dank

Agroscope dankt dem Bundesamt für Landwirtschaft (BLW) für die Finanzierung dieses Forschungsprojektes. Ein weiterer Dank gehört den Betriebsleitern für das zur Verfügungstellen der Kernobstanlagen und für das Durchführen der Applikationen in den Versuchspartzellen.

Riassunto**Effetto dello streptomycin nei meleti sulle resistenze agli antibiotici d'nell'ambiente**

Nel 2008 l'Ufficio federale dell'agricoltura (UFAG) ha autorizzato l'uso regolamentato di streptomycin nella lotta contro il fuoco batterico. Una delle condizioni poste era il monitoraggio dello sviluppo della resistenza all'antibiotico usato negli appezzamenti trattati.

Inoltre Agroscope ha condotto i primi studi inerenti l'analisi quantitativa dei geni trasferibili di resistenza alla streptomycin e alla tetraciclina (strA, strB, aadA, tetB, tetM, tetW), così come quella della sequenza di inserzione IS1133 in appezzamenti trattati con streptomycin. Nel 2010, 2011 e 2012 sono stati raccolti campioni di fiori, foglie e terreno da tre diverse parcelle trattate con streptomycin. La presenza e la distribuzione delle suddette sequenze è stata analizzata per identificare gli effetti dovuti ai trattamenti. I geni mobili di resistenza agli antibiotici sono stati trovati in quasi tutti i campioni raccolti prima dei trattamenti con la streptomycin, cosa che indica la naturale distribuzione di questi geni nelle popolazioni del patogeno. Sporadicamente sono stati riscontrati aumenti significativi nella frequenza di questi geni, ma questi non sono stati osservati sistematicamente tra appezzamenti e non sono stati confermati con i campioni raccolti l'anno seguente. Infine è stata comparata la composizione batterica tra suoli prelevati da appezzamenti con e senza trattamento con streptomycin senza trovare differenze costanti e significative. Dai risultati ottenuti è stato possibile concludere che l'applicazione di streptomycin in meleti, seguendo le raccomandazioni attuali, non porta all'aumento dei geni mobili di resistenza agli antibiotici indagati in questo studio e non ha effetti negativi sulle popolazioni batteriche nel terreno.

Literatur

- Rezzonico F., Stockwell V.O. & Duffy B., 2009. Plant agricultural streptomycin formulations do not carry antibiotic resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* **53** (7), 3173–3177.
- Walsh F., Ingenfeld A., Zampiccoli M., Hilber-Bodmer M., Frey J. E. & Duffy B., 2011. Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems. *Journal of Microbiological Methods* **86** (2), 150-5.

Summary**Impact of streptomycin applications on antibiotic resistance in apple orchards**

The Federal Office for Agriculture (FOAG) authorized the use of streptomycin to fight fire blight under controlled conditions in 2008 with the provision that the development of antibiotic resistance in the treated plots is monitored.

Agroscope in Wädenswil thus performed the first study to quantitatively analyze the influence of streptomycin use in agriculture on the abundance of the mobile streptomycin and tetracycline resistance genes (strA, strB, aadA, tetB, tetM, tetW) and the insertion sequence IS1133. Furthermore, the effect of the streptomycin treatment on the bacterial community structure was assessed. Flowers, leaves and soil were collected from three streptomycin-treated orchards in 2010, 2011 and 2012. The abundance and distribution of the resistance genes was analyzed at different time-points and included as a function of the treatment. The mobile antibiotic resistance genes were detected prior to streptomycin treatment in almost all samples, indicating the presence of these genes in nature. Statistically significant increases in the resistance gene abundance were occasional, inconsistent and not reproducible from one year to the next. Analysis of the bacterial community in soils from orchards with or without streptomycin treatment revealed no statistically significant or constant alterations.

We conclude that the application of streptomycin in these orchards led neither to an increase in streptomycin or tetracycline resistance gene abundance nor to a negative impact on the bacterial community.

Key words: streptomycin, antibiotics, apple orchard, development of resistance, bacterial community in soil.

- Duffy B., Holliger E. & Walsh F., 2014. Streptomycin use in apple orchards did not increase abundance of mobile resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* **350** (2), 180-9.4.
- Walsh F., Smith D. P., Owens S. M., Duffy B. & Frey J. E., 2014. Restricted streptomycin use in apple orchards did not adversely alter the soil bacteria communities. *Front Microbiol* **31** (4), 383.