

DISS. ETH NO. 20619

**ENVIRONMENTAL SURVIVAL, GENOMIC AND  
TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF A EUROPEAN FRESH  
VEGETABLE OUTBREAK STRAIN OF *SALMONELLA*  
*ENTERICA* SEROVAR WELTEVREDEN**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

**KERSTIN BRANKATSCHK**

Diplom Geoökologin, Technische Universität Bergakademie Freiberg

Born 26 April 1983

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Loessner, examiner

Dr. Markus Schuppler, co-examiner

Dr. Brion Duffy, co-examiner

2012

# Summary

Occurrence of foodborne disease outbreaks caused by enteric pathogens traced to consumption of contaminated vegetables has been increasingly reported over the past few years and poses an emerging public health threat. One of the major epidemiological sources for preharvest contamination leading to foodborne outbreaks is the usage of animal manure as a crop fertilizer, which is beneficial in terms of environmental protection and sustainability. Recycling of animal waste is an unavoidable necessity for animal production systems and presents an useful alternative fertilization option in organic vegetable production systems. However, potential carriage of human pathogens in animal waste (e.g., manure) poses a particularly problematic risk when such waste is applied to crops, such as leafy vegetables (e.g., head, lettuce, spinach, lambs lettuce, alfalfa sprouts) that are consumed without further processing. There is currently a limited understanding of the prevalence of fresh vegetable contamination in Europe, particularly in organic systems, critical for making regulatory decision. Moreover, there is a gap in understanding the interactions between pathogens and the abiotic and biotic environment that determine contamination risk, especially concerning the influence of soil factors and host plant on survival, fitness and gene expression of the pathogen.

The first chapter of this thesis describes a survey on the enteric pathogens *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. as well as *Staphylococcus aureus* isolated from animal manure conducted in European countries Austria, Germany, Denmark, Sweden, and Switzerland. We found that 83 % of all investigated waste samples were positive for at least one pathogen with highest prevalence of pathogens detected in liquid slurry in comparison to solid manure. In Switzerland, the pathogen showing the highest incidence was *Salmonella enterica*. Moreover, chemical analysis revealed a clear correlation of

pathogen incidence and substrate composition. For example, dissolved organic carbon and dissolved nitrogen were positively correlated with pathogen incidence.

The second chapter focuses more on the influence of edaphic (soil) parameters on the survival of *Salmonella* in differently fertilized soils. As a model organism *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Weltevreden 2007-60-3289-1 was used, which was isolated after a multinational outbreak linked to alfalfa sprouts in Europe. The soils were taken from the DOK long-term field experiment, which includes farming systems like bioorganic, biodynamic, conventional, mineral treatments and use of no fertilizer. A clear impact of the type of fertilization treatment on the survival of *Salmonella* Weltevreden was observed, with highest cell counts in bioorganic treated soils ( $5.6 \times 10^4$  cfu [g soil dw]<sup>-1</sup>) and absence of the pathogen in unfertilized soils 56 days after inoculation. Principal component analysis of multifactorial experiments revealed a strong positive influence for calcium, potassium, organic carbon concentrations and high soil pH, whereas a strong negative correlation was observed for manganese, nickel and magnesium. First experiments indicated a significant influence of the pH on survival of *S. Weltevreden* in soil. These results provided the basis for the development of mitigation strategies based on soil manipulations.

The third and fourth chapters present a thorough analysis of the genome of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Weltevreden 2007-60-3289-1. This is the first published genome sequence for this serovar, and one of the first for any plant foodborne outbreak isolates of *Salmonella*. Sequencing and polished genome assembly resulted in 67 contigs and estimated 4,858 coding sequences after automated genome annotation. Comparative genomics in order to complete genomes of other *S. enterica* serovars by the advanced bioinformatics tool EDGAR revealed in a resistance metabolism profile, serovar specific islands, presence of two type VI secretion systems and a unique *S. Weltevreden* plasmid pSW82. Comparison to a draft sequence of a meat isolate showed a lack of habitat specific determinants, which underscored the need for transcriptional analysis of *S. Weltevreden* on vegetables.

The fifth chapter describes the analysis of the complete transcriptome of *S. Weltevreden* *in vitro* and *in planta* period. Comparison of both growth conditions revealed that 5.27 % of genes were up-regulated during plant-pathogen interactions. These genes are mainly involved in attachment, motility and biofilm formation. However, up-regulation of genes involved in sulfur uptake and reduction was also observed, indicating that sprouts surfaces are poor in sulfate. Confirmation of RNA-seq analysis by qRT-PCR resulted in similar expression ratios for seven target genes on lettuce, spinach and lambs lettuce. Expression of genes encoding T3SS and *csg* operon indicated similar expression conditions as during infection of animal tissue. This study describes the first transcriptome data of *Salmonella enterica* during colonization of sprouts resulting in similar up-regulation of genes found for *E. coli* O157:H7 but also up-regulation of unique genes that are important for interactions between *Salmonella* and alfalfa sprouts. Transcriptome analysis of a pathogen in the context of abiotic interactions provides the basis for further investigation of specific gene-abiotic mechanisms and/or mitigation strategies at a gene level. Such work holds tremendous potential for designing innovative and practical solutions to increasing food safety problems associated with fresh vegetable production.

# Zusammenfassung

Lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche, die durch den Verzehr von Gemüseprodukten verursacht werden, die mit humanpathogenen Bakterien kontaminiert sind, stellen ein hohes Gesundheitsrisiko für die Allgemeinheit dar. Eine der Hauptursachen für solch eine Kontamination des Gemüses, ist die Verwendung von biologischem Dünger, welcher zur Verbesserung der Bodenqualität beiträgt. Die Verwertung tierischer Ausscheidungen zur Düngung ökologischer Gemüseprodukte stellt eine nützliche Verwertungsstrategie dar, welche in der Tierproduktion unumgänglich ist. Gleichzeitig erhöht diese Strategie jedoch das Risiko der Kontamination des Gemüses mit humanpathogenen Bakterien. Dies trifft besonders auf Gemüse zu, das nur wenig verarbeitet oder roh verzehrt wird, wie zum Beispiel Blattsalat, Spinat, Feldsalat oder Sprossen. Zur Abschätzung und Verringerung des Risikos innerhalb von Europa ist es notwendig, die Verteilung von pathogenen Bakterien in biologischem Dünger zu untersuchen, um Massnahmen zu ihrer Reduktion einleiten zu können. Ebenso fehlen bislang Informationen zur Interaktion von humanpathogenen Bakterien mit biotischen und abiotischen Umweltfaktoren, im Speziellen der Einfluss von Bodenfaktoren und Wirtspflanzen auf das Überleben, die Fitness und der Genexpression der Pathogenen.

Das erste Kapitel dieser Dissertation umfasst eine Studie zum Vorkommen von *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. und *Staphylococcus aureus* in organischen Düngern der europäischen Länder Österreich, Deutschland, Dänemark, Schweden und der Schweiz. In 83% aller 154 untersuchten Proben wurde mindestens ein Pathogen nachgewiesen. In der Schweiz wurde von den untersuchten Pathogenen *Salmonella enterica* am häufigsten detektiert. Eine Korrelationsanalyse zwischen der chemischen Zusammensetzung und der Präsenz Humanpathogener Bakterien ergab einen klaren Zusammenhang zwischen

der chemischen Zusammensetzung und dem Auftreten der Pathogenen. Ein positiver Zusammenhang wurde beispielweise für gelösten organischen Kohlenstoff und gelösten Stickstoff gefunden.

Das zweite Kapitel beschäftigt sich detaillierter mit dem Einfluss edaphischer Bodenfaktoren in verschiedenartig gedüngten Böden auf das Überleben von Salmonellen. Als Modelorganismus wurde *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Weltevreden 2007-60-3289-1 (*S. Weltevreden*) verwendet, ein Stamm, der nach einem multinationalen Ausbruch in Europa isoliert wurde. Für die Experimente wurden Böden eingesetzt, die organisch-biologische, biologisch-dynamische, konventionelle, mineralische und ungedüngte Anbausysteme repräsentieren. Die Untersuchung zeigte eine deutliche Korrelation zwischen Düngemenge und der Zelldichte von *S. Weltevreden* 56 Tage nach Inokulation des Bodens, mit höchsten Werten ( $5.6 \times 10^4$  cfu [g soil dw]<sup>-1</sup>) für den im bioorganischen Verfahren gedüngten Boden und keinem Nachweis von Salmonellen im ungedüngten Boden. Eine Hauptkomponentenanalyse des multifaktoriellen Experiments ergab einen starken positiven Einfluss des Düngeverfahrens bezogen auf Kalzium, Natrium, organischen Kohlenstoff und hohem Boden pH, wogegen ein starker negativer Einfluss für Mangan, Nickel und Magnesium gefunden wurde. Erste Untersuchungen zeigten darüber hinaus einen starken Einfluss des pH-Werts auf *S. Weltevreden* im Boden und stellen damit die Grundlage für weiterführende Experimente dar.

Kapitel drei und vier beinhalten die Genomanalyse von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Weltevreden 2007-60-3289-1. Es handelt sich um die erste publizierte Genomsequenz dieses Serovars und eine der ersten Pflanzenisolate. Die Genomsequenzierung des Stammes resultierte in 67 Contigs, die nach automatischer Annotation 4.858 kodierende Sequenzen aufwiesen. Vergleichsanalysen mit den Genomen von 17 *Salmonella* Serovaren führte zu Informationen hinsichtlich des Resistenzprofils, horizontalen Gentransfers, Präsenz von Typ VI Sekretionssystemen und eines für *S. Weltevreden* spezifischen Plasmides. Der Genomvergleich von *S. Weltevreden* mit einem Fleischisolat (SL 484) ergab keine Habitat-spezifischen Unterschiede in den kodierenden Sequenzen und unterstreicht daher die Notwendigkeit einer Transkriptomanalyse von *S. Weltevreden* auf Gemüse.

Das fünfte Kapitel umfasst das komplette Transkriptom, das durch RNA Sequenzierung von *S. Weltevreden* *in vitro* und *in planta* erstellt wurde. Der Vergleich dieser zwei Wachstumsbedingungen ergab eine Hochregulierung der Expression von 5.27 % der Gene während Pflanzen-Pathogen Interaktionen, welche beim Anhaften (Adhäsion), in der Mobilität und in der Biofilmbildung des Bakteriums involviert sind. Ebenso waren die Expression von Genen hochreguliert, die bei der Sulfataufnahme und Sulfatreduktion beteiligt sind. Dies deutet auf eine Sulfatarmut beim Wachstum auf Sprossen hin. Die Bestätigung der RNA-basierten Analyse mittels qRT-PCR ergab gleiche Expressionsverhältnisse nach dem Wachstum auf Salat, Spinat und Feldsalat. Ebenso waren Gene, welche das Type III Sekretionssystem und das *csg* Operon kodieren, hochreguliert, wie es auch für Infektionsbedingungen bei tierischem Gewebe gefunden wird. Damit beschreibt diese Studie das erste Transkriptom von *Salmonella enterica* während des Wachstums auf Sprossen.

Die erworbenen Erkenntnisse bezüglich der Bodenzusammensetzung und ihr Einfluss auf die Zellzahl und das Überdauern von *S. Weltevreden* legen die Grundsteine für Strategien zur Reduktion von Salmonellen in der Gemüseproduktion durch die Verwendung entsprechender Böden. Die Transkriptomanalyse von *S. Weltevreden* zusammen mit der Analyse der abiotischen Interaktionen stellt damit die Grundlage dar für weitere Untersuchungen zu spezifischen Gen-Abiotischen Mechanismen und Strategien zur Risikoreduzierung.