

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Der Einfluss von Zink als Futterzusatzstoff
auf die porcine intestinale *Escherichia coli*-Population
beim Ferkel**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae
(Dr. med. vet.)
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Vanessa Catharina Johanns
Tierärztin
aus Bad Oldesloe

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4313

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c.mult. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Elke Genersch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): piglets, *Escherichia coli*, coliform bacteria, intestinal microorganisms, zinc, mineral supplements, digestion, virulence, bacteriocins, diets

Tag der Promotion: 22.12.2021

"Man darf nie an die ganze Straße auf einmal denken, verstehst du?
Man muss nur an den nächsten Schritt denken, an den nächsten Atemzug,
an den nächsten Besenstrich. Und immer wieder nur an den nächsten. [...]

Dann macht es Freude; das ist wichtig, dann macht man seine Sache gut.

Und so soll es sein. [...]

Auf einmal merkt man, dass man Schritt für Schritt die ganze Straße gemacht hat.

Man hat gar nicht gemerkt wie,
und man ist nicht außer Puste."

Auszug aus dem Buch „Momo“ von Michael Ende

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung	1
1.1. Zielsetzung.....	1
2. Literatur.....	3
2.1. Steckbrief <i>Escherichia coli</i>	3
2.2. <i>E. coli</i> als Kommensale und Infektionserreger beim Schwein.....	4
2.3. <i>E. coli</i> -Infektionskrankheiten beim Schwein.....	6
2.3.1. <i>E. coli</i> -assoziierte Diarrhö (Kolidiarrhö) der Neonaten	7
2.3.2. <i>E. coli</i> -assoziierte Diarrhö (Kolidiarrhö) der Absetzferkel.....	7
2.3.3. Ödemkrankheit beim Schwein.....	7
2.4. Virulenzfaktoren	8
2.4.1. Virulenzfaktoren von enterotoxischen <i>E. coli</i> beim Schwein	8
2.4.2. Virulenzfaktoren von enterpathogenen <i>E. coli</i> beim Schwein	10
2.4.3. Virulenzfaktoren von Shigatoxin-produzierenden <i>E. coli</i> beim Schwein.....	10
2.5. Diagnostik von <i>E. coli</i> -Infektionen beim Schwein.....	10
2.6. Colicine	11
2.7. Prävention und Therapie der Post-Weaning Diarrhea (PWD).....	12
2.7.1. Biologische Bedeutung von Zink	13
2.7.2. Einsatz von Zink zur Prävention und Behandlung von PWD.....	14
2.8. Zink-Homöostase in <i>E. coli</i>	15
2.8.1. Aufnahme von Zink durch <i>E. coli</i>	15
2.8.2. Abgabe von Zink durch <i>E. coli</i>	17
2.9. Mögliche Ursachen von Schwermetallresistenz.....	18
2.9.1. Zinktoleranz	19

INHALTSVERZEICHNIS

2.10. Assoziation zwischen bakterieller Schwermetalltoleranz und Antibiotika-Resistenz in der Umwelt	23
2.11. Vorausgegangene Studien	25
3. Veröffentlichungen	27
3.1. Veröffentlichung I	27
3.2. Veröffentlichung II	28
4. Weiterführende Diskussion.....	29
4.1. Die Herausforderungen im Hinblick auf den phänotypischen und genotypischen Nachweis einer Zink- resp. Schwermetallresistenz gegenüber dem Nachweis einer antimikrobiellen Resistenz.....	29
4.1.1. Der phänotypische Nachweis	29
4.1.2. Der genotypische Nachweis	32
4.2. Die Verbreitung von Schwermetall-Resistenzen in der Umwelt	35
4.3. Colicine im (Konkurrenz-)Kampf gegen Pathogene	38
4.4. Ausblick auf mögliche Forschungsvorhaben bezüglich der für Zinktoleranz verantwortlichen Mechanismen	40
5. Zusammenfassung.....	42
6. Summary.....	44
7. Literaturverzeichnis	46
8. Anhang.....	67
8.1. Tabelle A Diagnostische Marker von porzinen pathogenen <i>E. coli</i>	67
8.2. Tabelle B Prozentuale Verteilung der Zinkhomöostase- und Schwermetall- bzw. Biozidresistenzgene in der <i>E. coli</i> -Studiensammlung	68
9. Publikationsverzeichnis	69
10. Danksagung.....	71
11. Finanzierungsquelle.....	73
12. Conflict of Interest.....	73
13. Selbstständigkeitserklärung	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht zu Infektionen durch <i>E. coli</i> beim Ferkel.....	6
Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung der Zinkhomöostase und ihrer Regulation in <i>E. coli</i> 16	
Abbildung 3 Die enge Verteilung der ZnCl ₂ -MHKs der <i>E. coli</i> aus Publikation I	60
Abbildung 4 Beurteilung der Colicinwirkung bei <i>E. coli</i> mittels Spot-Bioassay.....	68

Abbildungsverzeichnis von Publikation I

FIGURE 1 Distribution of zinc chloride MICs among 179 intestinal <i>E. coli</i> from piglets	
FIGURE 2 Antibiotic resistance pattern and zinc chloride MICs of porcine intestinal <i>E. coli</i>	
FIGURE 3 Sequence types and serotypes of 179 <i>E. coli</i> showing three different zinc chloride MICs	
FIGURE 4 Schematic circular representation of plasmids pRKI3099a and pRKI3099b from <i>E. coli</i> isolate RKI3099	

Abbildungsverzeichnis von Publikation II

FIGURE 1 Maximum Common Genome Alignment of 179 commensal <i>E. coli</i> isolates, six porcine pathogenic <i>E. coli</i> and a high-zinc tolerant reference.	
--	--

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	O-Serotypen aus enterotoxischen <i>E. coli</i> (ETEC), die laut Literatur am häufigsten mit PWD beim Ferkel assoziiert sind	9
Tabelle 2	Faktoren mit möglichem Einfluss auf die Zinktoleranz in <i>E. coli</i>	21
Tabelle 3	Literaturübersicht über Zinkhomöostase- Gene, die bisher mit einer Zinkresistenz assoziiert worden sind	62
Tabelle 4	Übersicht der nachgewiesenen Antibiotika-, Schwermetall- und Biozid-Toleranz- resp. Resistenzgene auf zwei neuen Plasmiden aus der Publikation I	64
Tabelle A	Diagnostische Marker von porzinen pathogenen <i>E. coli</i>	95
Tabelle B	Prozentuale Verteilung der Zinkhomöostase- und Schwermetall- bzw. Biozid-resistenzgene in der <i>E. coli</i> -Studiensammlung	96

Tabellenverzeichnis von Publikation I

TABLE 1	Distribution of <i>E. coli</i> among sampling sites, feeding groups, pigs, ZnCl ₂ MICs and antibiotic resistance profiles
TABLE 2	Results of mixed linear regression model examining the influence of feeding group and sample site on lg ₂ ZnCl ₂ (dependent factor) for 179 <i>E. coli</i> with pig as random variable
TABLE 3	Results of mixed linear regression model examining the influence of antimicrobial resistance, feeding group and sampling site on lg ₂ ZnCl ₂ MIC (dependent factor) for 179 <i>E. coli</i> with pig as random variable
TABLE 4	Distribution of biocide- and heavy metal MICs among 179 porcine commensal <i>E. coli</i>
TABLE 5	Screening results of factors involved in zinc homeostasis for 179 porcine commensal <i>E. coli</i>
TABLE 6	Antibiotic resistance genes (ARGs)

Tabellenverzeichnis von Publikation II

- TABLE 1 | Occurrence and distribution of VAGs associated with different types of intestinal pathogenic *E. coli* of relevance for pigs
- TABLE 2 | Distribution of VAG profiles including major diagnostic markers and additional determinants associated with intestinal *E. coli* pathotypes
- TABLE 3 | Occurrence and distribution of 31 BAGs among 179 porcine *E. coli*

Abkürzungsverzeichnis

AE	engl. attaching and effacement
aEPEC	atypische EPEC
Ag ²⁺	zweiwertige Silberionen
AGPs	antimicrobial growth promoters
AIDA	adhesin involved in diffuse adherence
APEC	aviäre pathogene <i>Escherichia coli</i>
Bae	bacterial adaptive response
<i>bfp</i>	engl. bundle-forming pilus
CARB-3	engl. Carbenicillinase-3 beta-lactamase
Cd ²⁺	zweiwertige Cadmiumionen
CDF	Cation Diffusion Facilitator
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
<i>C. metallidurans</i>	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
Cpx	Conjugative pilus expression
CVMP	Committee for Medicinal Products for Veterinary Use
Czc	Cobalt-, Zink-, Cadmium- Resistenz
DAEC	diffus adhärenzte <i>Escherichia coli</i>
DIN	Deutsche Institut für Normung e.V.
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EAST-1	enteroaggregatives hitzestabiles Enterotoxin
ECOFF	epidemiologischer Cut-Off-Wert
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EMA	European Medicines Agency
ENOVAT	European Network for Optimization of Veterinary Antimicrobial Treatment
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
EPS	Exopolysaccharide
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
EU	Europäische Union
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ExPECs	extraintestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>
Fur	Ferric uptake regulator
GIT	Gastrointestinaltrakt
H ⁺	Proton
H-Antigen	"Hauch"-Antigen, Flagellin
Hg ²⁺	zweiwertige Quecksilberionen
HGT	Horizontaler Gentransfer
InPECs	intestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>
K-Antigene	Kapsel-Polysaccharide
kg	Kilogramm
LB	Luria-Bertani
LEE	locus for enterocyte effacement
LPS	Lipopolysaccharide
LT	hitzelabiles Toxin
M ²⁺	zweiwertiges Metallion
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization — Time of Flight
MDR	Multidrug-Resistance
Mdt	multidrug transporter
MerR	Mercury resistance operon regulatory system

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MFP	Membran Fusion Protein
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
mg	Milligramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
MIC	minimum inhibitory concentration
mM	Millimolar
MNEC	Meningitis-assoziierte <i>Escherichia coli</i>
MT	Metallothionein
MTGs	Schwermetalltoleranzgene
Ni ²⁺	zweiwertige Nickelionen
NM3	Neidhardt MOPS Minimal Medium
OIE	World Organisation for Animal Health
OXA	Oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paa</i>	porcine AE-associated gene
Pb ²⁺	zweiwertige Bleiionen
pCol	Colicin enthaltendes Plasmid
pColE1	Colicin E1 enthaltendes Plasmid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PWD	Post-weaning Diarrhea
QC	quality control
RND	Resistance Nodulation Cell Division
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCFAs	shorty-chain fatty acids
SFB	Sonderforschungsbereich
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
spp.	species pluralis
Spy	Spheroplast Protein Y
STa	hitze stabiles Enterotoxin Typ A
STb	hitze stabiles Enterotoxin Typ B
Tir	translocated intimin receptor
UPEC	uropathogene <i>Escherichia coli</i>
USA	United States of America
VEB	Vietnamese extended-spectrum beta-lactamases
VetCAST	Veterinary Committee on Antimicrobial Suceptibility Testing
ZIP	zinc-regulated transporter-, iron-regulated transporter-like proteins
Zn ²⁺	zweiwertige Zinkionen
ZnCl ₂	Zinkchlorid
ZnuABC	Zinc uptake system
ZraP	zinc resistance-associated protein
Zur	zinc uptake regulator

1. Einleitung

Schon seit Jahrhunderten werden Schwermetalle wie Arsen, Kupfer, Quecksilber, Silber und Zink als heilende Substanzen in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt (Rensing et al. 2018; Hobman und Crossman 2015): In einem Schiffswrack aus dem zweiten Jahrhundert vor Christus wurden beispielsweise Behälter zur Verwahrung von medizinischen Produkten gefunden. Die Ergebnisse der Spektroskopie der Inhalte dieser Gefäße lieferten den Beweis für die Verwendung von Zink als „Medizin“ bereits in der Antike (Giachi et al. 2013). Die antimikrobielle Wirkung von Schwermetallen wurde jedoch erst spät, im 20. Jahrhundert, entdeckt (Hobman und Crossman 2015). Darüber hinaus ist seit 1919 bekannt, dass Zink eine wichtige Funktion als Spurenelement für den Stoffwechsel höherentwickelter Tiere hat (Birckner 1919). Studien belegen seit Ende der 1980er Jahre zudem einen positiven Effekt hoher Zinkmengen im Futter im Hinblick auf Prävention und Therapie von Durchfallerkrankungen bei Ferkeln (Hill et al. 2001; Poulsen 1995; Hahn und Baker 1993). Neben diversen anderen Erregern wie *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., Rotaviren der Gruppe A sowie Coronaviren zählen insbesondere pathogene *Escherichia (E.) coli* zu den Erregern der Diarrhö beim Schwein, insbesondere auch bei Ferkeln (Mesonero-Escuredo et al. 2018). In Folge der gesetzlich vorgeschriebenen Reduktion des Antibiotikaeinsatzes in der konventionellen Schweineproduktion nahm der Einsatz von Zinkoxid zur Prävention von *E. coli*-assoziierten Durchfallerkrankungen beim Ferkel daher deutlich zu (Ciesinski et al. 2018; Han und Thacker 2010; Fairbrother et al. 2005).

Hohe Zinkkonzentrationen sind toxisch für Bakterien (Zhou et al. 2015; Wang und Fierke 2013). Da bei *E. coli* die genetische Information für Schwermetallresistenzen sowie Resistenzen gegen Antibiotika und Biozide häufig gemeinsam auf einem mobilen genetischen Element (MGE) liegt, beispielsweise auf einem Plasmid (Argudín et al. 2019; Pal et al. 2015; Yazdankhah et al. 2014), könnte der Einsatz von Zink die Selektion von weiteren Resistenzen begünstigen. Daraus stellte sich zu Beginn dieser Arbeit die generelle Frage nach dem Einfluss der Zinkfütterung auf die Zusammensetzung der porzinen intestinalen *E. coli*-Population und deren womöglich durch Zink beeinflussten phäno- und genotypischen Eigenschaften, insbesondere der Resistenzen gegen Antibiotika und Biozide.

1.1. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte einer zinkreichen Fütterung auf die porzine intestinale *E. coli*-Populationen, vor allem im Genotyp, anhand der stratifizierten Zufallsstichprobe von 179 ausgewählten *E. coli*-Isolate aus einer vorausgegangenen Fütterungsstudie (99 Isolate aus der Zinkgruppe, 80 Isolate aus der Kontrollgruppe) zu untersuchen.

Hierfür wurden mehrere Fragestellungen entworfen:

1. Inwieweit tolerieren die aus der Fütterungsstudie gewonnenen *E. coli* unterschiedliche Zinkkonzentrationen?
2. In welchem Zusammenhang steht die Diversität der *E. coli*-Population mit der Zinkfütterung?
3. Zeigen die *E. coli*-Populationen der unterschiedlichen Fütterungsgruppen Unterschiede im Hinblick auf die phänotypischen Antibiotika- und/oder Schwermetall- und/oder Biozidempfindlichkeiten?
4. Treten genetische Unterschiede zwischen *E. coli*- Isolaten der Zinkfütterungs- und der Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Resistenz sowie Zink- (Schwermetall-) und Biozidtoleranz auf?
5. Treten Virulenz-assoziierte Gene (einschließlich definierter Pathotypen) und Bakteriozin-assoziierte Gene in den *E. coli* aus der Fütterungsstudie auf und gibt es in diesem Zusammenhang Unterschiede zwischen beiden Gruppen?

Zur Beantwortung der genannten Fragestellungen wurden zu Beginn bei *E. coli*-Isolaten aus einer vorausgegangenen Fütterungsstudie Empfindlichkeitsprüfungen von Schwermetallen, insbesondere Zink, sowie Bioziden und antimikrobiellen Wirkstoffen (**Frage 1 und 3**) durchgeführt und ausgewertet. Auf Grundlage von Ganzgenomanalysen wurden bei allen *E. coli*-Isolaten zum einen die Resistenzeigenschaften gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen sowie Zink (Schwermetalle) und Bioziden anhand des Auftretens spezifischer Resistenzgene sowie deren Veränderungen in Gen- bzw. Proteinsequenzen untersucht (**Frage 4**) zum anderen wurden Virulenz-assoziierte Gene einschließlich Einteilung von definierten Pathotypen und Bakteriozin-assoziierte Gene detektiert (**Frage 5**). Darüber hinaus wurden alle Ganzgenomdaten mittels eines Maximum Common Genome Alignments verglichen und zu einem phylogenetischen Baum erstellt (**Frage 2**).

Ergebnisse sowie Methodik zu diesen Forschungsfragen werden in den folgenden zwei Publikationen (Abschnitt 3 „Veröffentlichungen“) vorgestellt und ausführlich diskutiert.

2. Literatur

2.1. Steckbrief *Escherichia coli*

E. coli als Gram-negative, fakultativ anaerobe stäbchenförmige Spezies der Familie der *Enterobacteriaceae* werden von Leimbach et al. (2013) passend als „Allrounder“ beschrieben. *E. coli* treten oftmals als Kommensale des Gastrointestinaltraktes von Warmblütern, Vögeln und Reptilien auf (Hobman et al. 2007; Gordon und Cowling 2003). Gelangen diese Kommensale in andere Habitate, beispielsweise in die Lunge, in Wunden sowie Blut oder Körperhöhlen, können sie hier pathogene Wirkung zeigen (Kaper et al. 2004). Zusätzlich können Erkrankungen von Kommensalen verursacht werden, wenn die Immunantwort des Wirtes temporär geschwächt oder geschädigt ist (nach chirurgischen Eingriffen, nach Verletzungen oder durch vorhandene immunsupprimierte Erkrankungen). Nun wirken die kommensalen Bakterien als opportunistische Pathogene (Lazar et al. 2018). Der Hauptbestandteil der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien sind Lipopolysaccharide (LPS). Teile dieser LPS wirken unter anderem als Endotoxine (Lipid A). Entweder werden diese bei lebenden Bakterien mittels Abspaltung von Vesikeln freigesetzt oder sie gelangen nach Absterben der Bakterien in den Wirtskreislauf (Schwechheimer und Kuehn 2015). Durch Aufnahme von spezifischen Virulenzgenen, wie beispielsweise die genetischen Informationen für das Adhäsin Intimin oder das Shigatoxin, können sich *E. coli* darüber hinaus zu sehr vielfältigen Pathogenen entwickeln (Kaper et al. 2004). Deutlich wird diese Veränderung auch in der Größe des Genoms: Kommensale *E. coli* haben ein deutlich kleineres Genom als pathogene Erreger (Chaudhuri und Henderson 2012).

Das Bakterium wächst optimal bei 37°C (Boniece und Mallmann 1950) und ist entweder non-motil oder zeigt mittels peritricher Begeißelung durch Flagellen eine Beweglichkeit (Haiko und Westerlund-Wikström 2013). Die Flagellen werden auch als H-Antigene („Hauch“-Antigene) bezeichnet, wobei der Name auf das schwärmende Wachstum auf einer Agarplatte zurückzuführen ist (Poolman und Wacker 2016). 44 von 53 H-Antigene werden durch die Expression von Varianten des Flagellin-Gens *fliC* gebildet. Der Rest der H-Antigene ist abhängig vom Auftreten der Varianten von *fliA* (H3, H35, H36, H47 und H53), *fliA* (H44 und H55), *flmA* (H54) und *fliA* (H17) (Joensen et al. 2015). Die Flagellen sind in der äußeren Membran verankert (Haiko und Westerlund-Wikström 2013), die aus der LPS-Schicht besteht. Die LPS-Schicht umfasst das innere Endotoxin Lipid A, die mittleren Kern-Oligosaccharide und die äußeren vielfältigen O-Polysaccharide, auch als O-Antigene bekannt (DebRoy et al. 2016). Die Mehrzahl der O-Antigene wird über die Membran transloziert und von O-Antigen-Prozessproteinen polymerisiert, die von *wzx* (O-Antigen-Flippase) und *wzy* (O-Antigen-Polymerase) codiert werden. Bei den O-Typen O8, O9, O52 sowie O99 sind alternative Proteine, ein Transportprotein (*wzm*) sowie eine ATP-Bindungskomponente (*wzF*) bekannt (Joensen et al. 2015). Darüber hinaus werden von *E. coli*

noch Kapsel-Polysaccharide (K-Antigene) gebildet, die mit der Umwelt interagieren (Orskov und Orskov 1977). Diese bedeutenden Zellwandkomponenten der Enterobacterales sind Grundlage für das Typisierungsschema zur Klassifizierung von Salmonellen („Kauffmann und White Schema“), welcher auf dem serologischen Nachweis bestimmter O- und H-Antigene beruht (Kauffmann 1964). Zur Anwendung in der Differentialdiagnostik von *E. coli* wurde eine Serotypisierung auf Basis dieser Oberflächenstrukturen durch Kauffmann und Vahlne entwickelt, die „*E. coli*-Serologie“ (Kauffmann und Vahlne 1945). Wenige Laboreinrichtungen konnten K-Antigene typisieren, so dass die Serotypisierung von O- und H-Antigenen als „Goldstandard“ etabliert wurde (DebRoy et al. 2016). Somit wird *E. coli* mit der O:H-Seroformel in verschiedene Serotypen, wie beispielsweise O101:K32 differenziert. Zurzeit sind etwa 186 verschiedene O-Antigene und 55 H-Antigene bei *E. coli* bekannt (Fratamico et al. 2016). Anhand von Ganzgenomdaten gibt es auch die Möglichkeit der *in silico* Serotypisierung von *E. coli* anhand der oben genannten Gene für die O-Antigene (*wzx*, *wzy*, *wzm* und *wzt*) sowie Flagellin-Gene (*fliC*, *fliA*, *fliB*, *fliM* und *fliN*) (Joensen et al. 2015).

2.2. *E. coli* als Kommensale und Infektionserreger beim Schwein

E. coli treten ubiquitär in der Umwelt auf und können hier oftmals persistieren, bis sie von Wirten aufgenommen werden (Wirth et al. 2006; Conway et al. 2004). Neuere Studien legen zudem nahe, dass *E. coli* sich auch speziell an Wasser / Gewässer anpassen kann. Die Anpassungsstrategien von *E. coli* werden gleichermaßen durch den phylogenetischen Hintergrund sowie die ökologische Nische beeinflusst (Touchon et al. 2020).

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) eines adulten Schweines beherbergt eine große, facettenreiche und komplexe mikrobiologische Gemeinschaft von 1×10^{10} – 1×10^{11} Bakterien pro Gramm Darminhalt (Guevarra et al. 2019). Der GIT eines Säugertiers gilt vor der Geburt als kaum durch Bakterien besiedelt. Erst nach der Geburt beginnt im Neonaten eine bemerkenswerte Metamorphose von einem nahezu keimfreien Zustand hin zu einer hohen mikrobiellen Populationsdichte (Guevarra et al. 2019; Alain B. Pajarillo et al. 2014; Isaacson und Kim 2012). Dieser Vorgang der Etablierung der wirtseigenen Mikrobiota dauert allerdings mehrere Wochen und ändert sich auch im Zuge des weiteren Lebens immer wieder (Knecht et al. 2020). Mikroorganismen wie *E. coli* als Bestandteil der Mikrobiota der Mutter oder aus der Umgebung werden während des Geburtsvorgangs oder im Laufe der ersten Lebensstunden vom Ferkel aufgenommen bzw. auf dieses übertragen (Kenworthy und Crabb 1963). Bedingt durch die Kolostrum- und spätere Milchaufnahme beherrschen zu Beginn der Besiedlung des Darms Milchsäurebakterien die intestinale Mikrobiota des Ferkels (Konstantinov et al. 2006). Danach beeinflussen vor allem Umweltfaktoren und die Aufnahme fester Nahrung die Zusammensetzung der Bakterienpopulation unterschiedlicher Körperregionen bis hin zu einer Phase der

Stabilisierung (Guevarra et al. 2019; Guevarra et al. 2018). Nach etwa 120 Lebenstagen beinhaltet z.B. der Darmtrakt vor allem Gram-positive und etwas mehr als 10% Gram-negative Anaerobier. Die aktuelle Zusammensetzung der Mikrobiota, dominiert von den Phyla Bacteroidetes, Proteobacteria, Spirochaetes und Synergistetes sowie der Firmicutes, ähnelt dem eines adulten Tieres nun sehr (Knecht et al. 2020). Der Stoffwechsel von *E. coli* hat sich erfolgreich an die ökologische Nische des GIT adaptiert und konkurriert erfolgreich mit mehr als 500 andere Bakterienspezies (Tenaillon et al. 2010). Diese starke Anpassungsfähigkeit erklärt unter anderem das sehr häufige Vorkommen von *E. coli* im Gastrointestinaltrakt bei Säugetieren, vor allem in den Mucusschichten von Caecum und Colon (Tenaillon et al. 2010).

Die genetische Informationen zur Funktionen und Aufrechterhaltung des allgemeinen Stoffwechsels und zur Vervielfältigung der Erbinformation wird als so genanntes Kerngenom bezeichnet (Vieira et al. 2011). Die variablen Gene werden im akzessorischen Genom zusammengefasst (McNally et al. 2016). Darüber hinaus sind vielfältige individuelle Charaktereigenschaften auf mobilen genetischen Elementen (MGE) codiert. Zum Beispiel befinden sich die genetischen Informationen für Shigatoxine auf Bakteriophagen (Muniesa et al. 2000) und die für das Hitze-stabile Enterotoxin STa auf einem Transposon (So und McCarthy 1980). Viele weitere Virulenzfaktoren und Resistenzgene befinden sich auf Plasmiden (Johnson et al. 2011; Carattoli 2009; Johnson und Nolan 2009; Diaz-Aroca et al. 1984). Der Austausch von genetischer Information zwischen lebenden Organismen wird als horizontaler Gentransfer (HGT) bezeichnet (La Cruz und Davies 2000). Die Aufnahme solcher Virulenzfaktoren kann einen kommensalen, eher apathogenen *E. coli* zu einem Pathogen transformieren (Leimbach et al. 2013; Stecher et al. 2012). Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Entstehung der enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) O157:H7, deren Entstehung auf die Aufnahme des Toxin-codierenden Gensegments von *Shigella dysenteriae* Typ 1 durch *E. coli* der Serogruppe O55 zurückzuführen ist (Lathem et al. 2003). In diesem Zusammenhang gelten Kommensale allgemein auch als Reservoir von Resistenzgenen für pathogene Erreger (Lambrecht et al. 2019; Blake et al. 2003).

Pathogene *E. coli* können ein breites Spektrum an Erkrankungen hervorrufen. Während intestinal pathogene *E. coli* (InPECs) für Infektionskrankheiten des Gastrointestinaltraktes verantwortlich sind, können extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPECs) zu bakteriellen Erkrankungen des Urogenitaltraktes, des Blutes oder des zentralen Nervensystems führen (Kaper et al. 2004). Die Kombination von spezifischen Virulenzfaktoren bedingt hierbei die spezifische Adaption an das entsprechende Organ bzw. die entsprechende Umgebung. Die Art und Zusammensetzung der jeweiligen Virulenzfaktoren wird bei pathogenen *E. coli* für die Klassifizierung in sogenannte Pathotypen genutzt: Die InPECs werden in sechs gut beschriebene Gruppen aufgeteilt: enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und diffus adhärenzte

E. coli (DAEC). Extraintestinale Erkrankungen werden am häufigsten durch uropathogene *E. coli* (UPEC, Verursacher von Infektionen des Urogenitaltrakts) sowie Meningitis-assoziierte *E. coli* (MNEC, Verursacher von Meningitiden und Septikämien) induziert. Zusätzlich gibt es die aviären pathogenen *E. coli* (APEC), die v.a. in Zusammenhang mit respiratorischen Infektionen, Perikarditis und Septikämien beim Geflügel auftreten (Kaper et al. 2004).

2.3. *E. coli*-Infektionskrankheiten beim Schwein

VanderWaal und Deen (2018) zeigten, dass in mehr als 57.000 Veröffentlichungen über Schweinekrankheiten weltweit *E. coli* zu den Bakterien gehören, die am häufigsten als Infektionserreger in der Schweineproduktion identifiziert werden. Dabei treten verschiedene mit *E. coli* assoziierten Erkrankungen, meist in bestimmten Lebensabschnitten auf (Abb. 1). Direkt nach der Geburt steht die neonatale Diarrhö im Vordergrund (2.3.1). In folgenden Lebenswochen bis zum Absetztermin (7.-28. Lebenstag) kann eine weitere Durchfallproblematik bei Ferkeln beobachtet werden, die so genannte „Pre-weaning“-Diarrhö. Nach dem Absetzen ab dem 28. Lebenstag schließt sich die Lebensphase an, in der die „Post-weaning“-Diarrhö (PWD) auftreten kann (2.3.2). Zur gleichen Zeit können Ferkel Erkrankungen durch andere spezifische *E. coli* erleiden, besonders zu erwähnen ist hier die Ödemkrankheit (2.3.3) (Fairbrother und Nadeau 2019; Kongsted et al. 2018; Luppi et al. 2016).

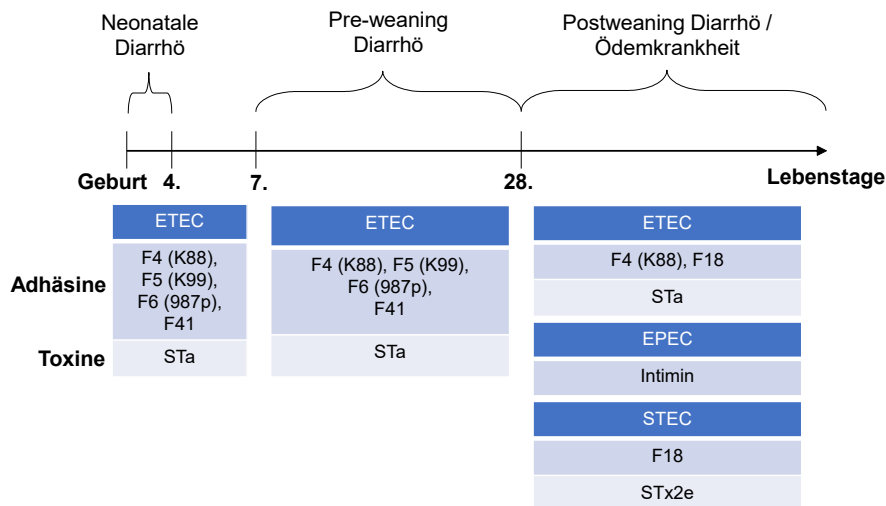


Abbildung 1 | Übersicht zu Infektionen durch *E. coli* beim Ferkel

Abkürzungen: EPEC, enteropathogene *E. coli*; ETEC, enterotoxische *E. coli*; STEC, Shigatoxin-produzierende *E. coli*; F4-F41, Fimbrien; STa, Enterotoxin Typ A, STx2e, Shigatoxin Typ 2e

Referenzen: (Kongsted et al. 2018; Luppi 2017)

2.3.1. *E. coli*-assoziierte Diarrhö (Kolidiarrhö) der Neonaten

E. coli werden über das Muttertier ausgeschieden. Somit können die *E. coli* entweder direkt von der Sau, durch andere infizierte Ferkel desselben Wurfes oder über Exkremente in der Umwelt auf das Neugeborene übertragen werden. Direkt nach der Geburt oder im Verlauf der ersten Lebenstage folgen dann ein wässriger Durchfall, der zum Großteil mit hohen Mortalitätsraten verbunden ist (Fairbrother und Nadeau 2019; J. Genovese et al. 2001). Liegt ein endemisches Geschehen vor, können Ferkel aus dem ersten Wurf einer Sau in Folge fehlenden Schutzes durch die passive Immunität vermehrt infiziert werden (Luppi 2017). Hier lösen vorrangig ETEC typische Durchfallsymptomatik aus (Dubreuil et al. 2016; Fairbrother et al. 2005).

2.3.2. *E. coli*-assoziierte Diarrhö (Kolidiarrhö) der Absetzferkel

Der Zeitraum des Absetzens ist einer der kritischen Faktoren im Leben eines Ferkels. In der konventionellen Haltung werden Ferkel zwischen der 3. und 4. Lebenswoche von der Muttersau getrennt, obwohl das natürliche Absetzen erst nach 17 Lebenswochen erfolgt (Jensen 1986).

Die mit *E. coli*-assoziierte Diarrhö der Absetzferkel, auch als (engl.) „Post-weaning Diarrhea“ (PWD) bezeichnet, ist mit großen finanziellen Verlusten in der Schweineindustrie weltweit verbunden. In Europa sterben 17% der Ferkel nach dem Absetzen (Lallès et al. 2007). Die Ferkel verenden entweder perakut oder zeigen charakteristische Symptome wie Durchfall, Dehydratation und Wachstumseinbußen (Fairbrother et al. 2005). Bei der Sektion fällt ein dilatierter Darm mit zum Teil ödematösen Darmwänden und hochgradig hämorrhagischen Bereichen auf (Luppi 2017). Diverse Stressfaktoren, unter anderem die Trennung von der Muttersau, eine Futterumstellung und die Neuaufstallung zusammen mit Tieren aus verschiedenen Betrieben, beeinflussen das Immunsystem negativ und können zu einer enteralen Dysbiose führen (Sutherland et al. 2014; Campbell et al. 2013). Unter diesen Voraussetzungen können ETEC sowie EPEC proliferieren und durch die Entfaltung ihrer lokalen Schadwirkung Durchfall verursachen (Luppi et al. 2016).

2.3.3. Ödemkrankheit beim Schwein

Die Ödemkrankheit tritt bei Schweinen nach der Phase des Absetzens auf. Diese Erkrankung führt durch hohe Mortalitätsraten zu großen Verlusten bei Absetzferkeln (Casanova et al. 2018). Typische klinische Anzeichen sind ein subkutanes Ödem der Augenlider sowie neurologische Symptome wie Ataxie, Konvulsionen und Paralyse (Imberechts et al. 1992). Hier lösen STEC die Krankheit aus (Casanova et al. 2018). Das Shigatoxin zerstört nach Eindringen

in den Wirtskreislauf die Gefäßendothelzellen. Eine verstärkte Durchlässigkeit des Kapillargefäßsystems ist die Folge. Flüssigkeit kann in das umliegende Gewebe durchtreten und es entstehen die namensgebenden Ödeme (Casanova et al. 2018; Imberechts et al. 1992).

2.4. Virulenzfaktoren

2.4.1. Virulenzfaktoren von enterotoxischen *E. coli* beim Schwein

Spezifisch für enterotoxische *E. coli* ist das Zusammenwirken von Enterotoxinen und Adhäsinen, die zur Ausprägung der gastrointestinalen Krankheitssymptome führen. Zu Beginn kommt es zu einer Interaktion zwischen den Adhäsinen (Fimbrien) und den Liganden der Mikrovilli des Dünndarms ohne eine morphologische Veränderung des Darmepithels (Luppi 2017).

Bei der neonatalen Diarrhö werden hauptsächlich diagnostisch *E. coli* im gesamten Jejunum und Ileum nachgewiesen, die Fimbrien F4 (K88) exprimieren. Außerdem gelangen *E. coli* aus Ende des Jejunums und Ileums zum Nachweis, die die Fimbrien F5 (K99), F6 (F987p) und F41 (Luppi 2017) besitzen. Bei der PWD werden neben F4(K88)-enthaltenen *E. coli* auch F18-positive *E. coli* festgestellt. Nach Bindung der Fimbrien an spezifischen Rezeptoren im Dünndarm folgt die Phase der Kolonisierung der Darmwand (Luppi et al. 2016; Delisle et al. 2012). Dubreuil et al. (2016) berichten detailliert über den Aufbau aller Fimbrientypen, die wirtsseitigen Rezeptoren, die fimbriale Biogenese sowie die Stratifizierung der codierenden Gene in „Fimbriencluster“ und deren Regulation bei ETECs. Zusätzlich gehört das nicht-fimbriale Adhäsin AIDA (adhesin involved in diffuse adherence) zur Gruppe der ETEC-spezifischen Virulenzfaktoren beim Schwein (Moredo et al. 2015). Jedoch ist deren Rolle in der PWD noch nicht genau geklärt (Zajacova et al. 2013).

Nach erfolgreicher Adhäsion und Kolonisation des Dünndarms produzieren ETEC unter anderem die namensgebenden Enterotoxine. Dies sind extrazellulär sezernierte Proteine oder Peptide. Diese Toxine greifen das intestinale Epithel an (Gyles 1992) und führen zum Elektrolyt- und Flüssigkeitsverlust (Loos et al. 2012). Bei Schweinen ohne Rezeptoren für die Adhäsine ist eine Darmbesiedlung nicht möglich, sie weisen eine natürliche Resistenz gegenüber diesen Bakterien auf (Luise et al. 2019). Bei einer Infektion durch ETEC-Isolate, welche die Fimbrien F18 (F18⁺) besitzen, erkrankten nur 6% der Schweine mit F18-resistenter Genetik. Dagegen wurde eine Infektionsrate von bis zu 87% bei genetisch empfindlichen Tieren gegenüber F18 festgestellt (Frydendahl et al. 2003).

Bei den ETEC-spezifischen Enterotoxinen differenziert man zwischen den hitzestabilen Enterotoxinen vom Typ A und Typ B (STa, STb) (Zhang et al. 2006), einem enteroaggregativen hitzestabilen Enterotoxin (EAST-1) (Savarino et al. 1993) sowie einem hitzelablen Toxin (LT) (Johnson et al. 2009).

Die neonatale Diarrhö wird häufig mit Enterotoxin STa in Verbindung gebracht, wohingegen alle oben aufgeführten Enterotoxine die PWD hervorrufen können (Luppi 2017).

Tabelle 1 | O-Serotypen von enterotoxischen *E. coli* (ETEC), die laut Literatur am häufigsten mit PWD beim Ferkel assoziiert sind.

O- Serotypen	Assoziierte fimbriale F-Antigene	Referenzen
8	F4ab (K88ab), F4c (K88ac)	(Frydendahl 2002; Harel et al. 1991)
138	F18, F4ac	(Frydendahl 2002; Harel et al. 1991; Nagy et al. 1990)
139	F18	(Frydendahl 2002; Nagy et al. 1990)
141	F18, F4ab, F4ac	(Frydendahl 2002; Nagy et al. 1990)
147	F4ac, F18	(Harel et al. 1991; Nagy et al. 1990)
149	F4ac, F18	(Frydendahl 2002; Salajka et al. 1992; Harel et al. 1991; Nagy et al. 1990)
157	F4ac	(Nagy et al. 1990)

Referenz: (Heo et al. 2013)

In der Literatur werden bestimmte Serotypen häufiger als andere mit PWD in Verbindung gebracht. Die häufigsten ETEC-Serotypen, die bei Fällen von PWD detektiert wurden, sind O8, O138, O139, O141, O147, O149, sowie O157 (Tabelle 1). Dabei scheint die Prävalenz der Serotypen geografisch unterschiedlich zu sein (Vu-Khac et al. 2007). Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Virulenz innerhalb eines Serotyps variieren kann (Zhang et al. 2007). Sobald eine Kolonisation von ETEC im Magen-Darm-Trakt des Schweins begonnen hat, wird die mikrobiotische Vielfalt im Darm reduziert (Messori et al. 2013).

2.4.2. Virulenzfaktoren von enterpathogenen *E. coli* beim Schwein

Die enteropathogenen *E. coli* beinhalten wie die enterohämorrhagischen *E. coli* die Pathogenitätsinsel „LEE“, (engl. „Locus for enterocyte effacement“), die sich aus fünf Genloci zusammensetzt. Die Genloci LEE1-3 enthalten Gene, die Komponenten des Typ-III-Sekretionssystem codieren, LEE4 besteht aus Genen für Effektorproteine und LEE5 enthält die genetische Information für Intimin und dem Intimin-Rezeptor Tir (engl. translocated intimin receptor) (Franzin und Sircili 2015). Nach der engen Intimin-vermittelten Adhäsion von *E. coli* am Darmepithel (engl. attaching) kommt es zur lokalen Zerstörung der Mikrovilli (engl. effacing), die auch als AE-Läsion bezeichnet wird (Zhu et al. 1994; Moon et al. 1983).

Nicht nur bei kranken Schweinen können EPEC-typische Virulenzfaktoren nachgewiesen werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass von 198 Kotproben von gesunden Schweinen aus dem Schlachthof 89% der Proben das Intimin-Gen *eae* enthalten (Fröhlicher et al. 2008). Die AE-Läsionen bei Schweinen werden häufig noch mit dem Intimin-ähnlichen Gen *paa* (engl. „porcine AE-associated gene“) in Verbindung gebracht (Nagy und Fekete 1999). Wenn darüber hinaus das Gen *bfp* (engl. „bundle-forming pilus“) nicht identifiziert werden kann, werden die Isolate als atypische EPECs (aEPECs) klassifiziert (García-Meniño et al. 2018).

Der häufigste Serotyp, der mit dem LEE-Locus in der Literatur assoziiert wird, ist der O-Serotyp O45 (An et al. 2000; Zhu et al. 1994).

2.4.3. Virulenzfaktoren von Shigatoxin-produzierenden *E. coli* beim Schwein

Die wichtigsten und namensgebenden Virulenzfaktoren der STEC sind die Shigatoxine. Es gibt zwei Varianten, STx1 und Stx2. Die Stx1 kann man in drei (Stx1a, Stx1b und Stx1c) und STx2 in sieben (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f und Stx2g) Subtypen einteilen (Baranzoni et al. 2016). Bei Schweinen wird nur Stx2e nachgewiesen (Tseng et al. 2014b) und in Kombination mit der Fimbrie F18 löst es die Ödemkrankheit aus (Frydendahl 2002; Imberechts et al. 1992).

Die Tabelle A im Anhang gibt eine Übersicht über die wichtigsten Virulenz-assoziierten Gene von porzinen enteralen *E. coli*-Pathotypen.

2.5. Diagnostik von *E. coli*-Infektionen beim Schwein

Bei Durchfallerkrankungen des Schweines eignen sich zur Identifizierung pathogener Erreger zum einen frische Kot- sowie Kottupferproben zum anderen können aus der Sektion entnommene Darmabschnitte für die Diagnostik hilfreich sein. Zum Erhalt der Frische des Materials sollten die Proben bei 4 °C gekühlt und innerhalb von 24 Stunden zum Labor transportiert werden (Luppi 2017). Die bakteriologische Untersuchung beginnt mit der Anzucht der

Proben für 24-48 Stunden bei 37°C auf Blutagar sowie Selektivnährböden, welche die unerwünschte Begleitflora hemmen, wie zum Beispiel Wasserblau-Metachrom-Gelb Laktoseagar (Gassner Medium, Oxoid Deutschland GmbH, Deutschland) oder McConkey, (Burow et al. 2019; Mesonero-Escuredo et al. 2018). Auf der Gassner-Agarplatte wachsen *E. coli* grundsätzlich als tiefblaue Kolonien mit blauem Hof. Ursächlich hierfür ist der Farbumschlag des Indikatorfarbstoffs Wasserblau bei saurem pH-Wert durch die Laktose-Verwertung von *E. coli* (Mesonero-Escuredo et al. 2018). Der McConkey-Agar enthält Neutralrot als Indikator, der Laktose-verwertende Isolate auf dem Agar rötlich bzw. pink mit Präzipitation wachsen lässt (Baban 2017). Die endgültige Erreger-Identifizierung kann zum einen mittels der „Bunten Reihe“, die standardisierte biochemische Reaktionen beinhaltet, oder mittels der MALDI-TOF Massenspektrometrie, die eine Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation mit einer Flugzeit-Messung (time of flight, TOF) kombiniert, erfolgen (Shell et al. 2017; Petersen und Abu-Ghazaleh 1960). Im Anschluss können enteropathogene *E. coli* durch serologische Agglutination mittels spezifischer Antiseren auf einem Objektträger identifiziert werden (Osek 1999; Kauffmann und Vahlne 1945). Der hier ermittelte Sero- bzw. Fimbrientyp wird durch das O- /H-Antigen bzw. F-Antigen definiert (DebRoy et al. 2016). Kreuzreaktionen zwischen absorbierten O-Antigen und kreuzreagierenden Antikörper, die in polyklonalen Kaninchen-Seren vorhanden sind, führen zu fehlerhaften Typisierungsergebnissen (DebRoy et al. 2016). Der Verlust vom O-Antigen durch Mutationen der Oligosaccharide im LPS führt zu einer Autoagglutination in Kochsalzlösung. Hier liegen die *E. coli* in „Rauform“ vor (DebRoy et al. 2011). Abschließend können durch den Einsatz weiterführender molekularbiologischer Verfahren wie z.B. die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, kurz PCR) die für bestimmte Pathotypen kennzeichnenden Virulenzfaktoren identifiziert werden (Casey und Bosworth 2009).

2.6. Colicine

Wenn die Darmmikroben von Säugetieren eine stabile und resiliente Biozönose formen, kann die Etablierung von Pathogenen im Darm oftmals verhindert werden (Pickard et al. 2017). Zur Aufrechterhaltung der für den Wirt vorteilhaften Zusammensetzung der Mikrobiota zählen komplexe Mechanismen, die auf den Wettbewerb von Kommensalen und Pathogenen um dasselbe Habitat Einfluss nehmen (Jin et al. 2000). Hierzu zählt unter anderem das Konkurrieren der Bakterien um Nahrung (Sweeney et al. 1996) und die Aktivierung der Wirts-Immunantwort (Pickard et al. 2017). Außerdem wird vermutet, dass die sogenannte „Kolonisationsresistenz“ durch das gezielte Abtöten oder Unterdrücken des Wachstums von Pathogenen gefördert wird (Pultz et al. 2005). Hierzu zählt auch die Produktion von inhibitorischen Metaboliten wie kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs, short-chain fatty acids), die sich zum Beispiel negativ auf die Expression von Virulenzfaktoren bei Pathogenen auswirken kann (Gantois et al. 2006; Shin et al.

2002). Auch Polypeptide mit bakterizider Wirkung, sogenannte Bakteriozine, können zur Kolonisationsresistenz beitragen. Diese werden in die unmittelbare Umgebung freigegeben und inhibieren meist Bakterienspezies derselben oder einer (nah-)verwandten Spezies (Hammami et al. 2013). Somit können Pathogene „ausgeschaltet“ werden (Schamberger und Diez-Gonzalez 2002) und gleichzeitig wird der Erhalt von Bakteriozin-produzierenden Kommensalen wie *E. coli* im Darmtrakt gesichert (Gillor et al. 2009).

Diese Bakteriozine sind in *E. coli* als Colicine bekannt (Cameron et al. 2019). Die genetische Information für die Colicine sind auf Plasmiden, den sogenannten Col Plasmiden (pCol), codiert (Hardy et al. 1973). Die genetische Grundstruktur der Operons für die Colicinbildung, beispielsweise auf dem Plasmid pColE1, beinhaltet mindestens zwei, meistens drei Gene: (1) das eigentliche Colicin (Strukturgen), z.B. *col* oder *cea*, (2) Gen für ein Immunitätsprotein (z.B. *imm*) und (3) ein weiteres Gen, welches für das Lysisprotein oder ein Bakteriozin-Freisetzungprotein (*kil* oder *lys*) codiert (Cursino et al. 2002). Insgesamt werden die Colicine nach (i) ihrer bakteriziden Wirkung, (ii) ihren Membranrezeptoren und/oder (iii) ihrem Mechanismus eingeteilt, auf welchem sie das Periplasma passieren (Cascales et al. 2007). Für den Transport gibt es zwei unterschiedlichen Systeme, Tol und TonB (Cascales et al. 2007). Der Gruppe A zugeordneten Colicine (A, E1-E9, K, L, N, S4, U und Y) (Webster 1991) nutzen das Tol-System, während die Gruppe der B-Colicine (B, D, H, Ia, Ib, M, 5 und 10) über das TonB-System transloziert werden (Braun 1989).

2.7. Prävention und Therapie der Post-Weaning Diarrhea (PWD)

Die prophylaktische Gabe von Antibiotika zur Prävention vor *E. coli*-assoziiertes Diarrhö der Absatzferkel hat die Akkumulation von antimikrobiellen Resistenzen in ETEC gefördert (Smith et al. 2010; Docic und Bilkei 2003). Als Folge wurde neben dem Einsatz von antimikrobiellen Wachstumsförderern („antimicrobial growth promotors“, AGPs) auch die prophylaktische Gabe von Antibiotika von der EU (seit 2006), Korea (seit 2005) und USA (seit 2013) verboten (Maron et al. 2013; FDA, 2013). Im 3. Bericht der World Organisation for Animal Health (OIE) aus dem Jahr 2019 gaben 110 Länder (n=155; 71%) an, keine antimikrobiellen Wachstumsförderer bei der Produktion von fleischliefernden Tieren zu nutzen. Weitere 45 Länder (18 amerikanische, 14 asiatische, 10 afrikanische Länder sowie zwei Länder in Europa und ein Land im Mittleren Osten) nutzen diese AGPs noch, vor allem Tylosin und Bacitracin. Beide Substanzen sind auf der OIE Liste der antimikrobiellen Wirkstoffe mit veterinärmedizinischer Bedeutung zu finden und sollten daher nicht unkritisch, ohne entsprechende Indikation und in großen Mengen verwendet werden (OIE, 2019).

Derzeit gibt es unterschiedliche Strategien zur Prävention und Therapie von PWD (Rhouma et al. 2017a): Die bedeutendste Präventionsmaßnahme zur Vorbeugung der neonatalen Diarrhö in

Ferkel-erzeugenden Betrieben beruht auf der Reduktion von pathogenen *E. coli* in der unmittelbaren Umgebung der Tiere durch gezielte Hygienemaßnahmen sowie ein Biosicherheitssystem für die Versorgung und Betreuung der Tiere (Luppi 2017).

Für die Therapie von PWD wird Colistinsulfat häufig als oral zu verabreichendes Antibiotikum eingesetzt (Rhouma et al. 2017b). Im Sinne der Reduktion von Antibiotikaeinsätzen in der Schweineproduktion werden zudem diverse Alternativen angewandt: Organische Säuren senken nachweislich den pH-Wert des Magens und verringern auf diesem Weg die Infektion des Darms durch pathogene Erreger (Knarreborg et al. 2002; Tsioloyannis et al. 2001). Darüber hinaus gibt es eine Studie, die einen positiven Effekt auf das Wachstums der Ferkel beschreibt (Le Thanh et al. 2017). Jedoch ist der konkrete Effekt der organischen Säuren auf die porcine Mikrobiota noch weitestgehend unerforscht (Suiryanrayna und Ramana 2015). Die Gabe von Prä-, Pro- und Synbiotika soll laut dem Review-Artikel von Heo et al. (2013) die intestinale Gesundheit stärken und ETEC-Infektionen verringern, in dem die Adhäsion pathogener ETEC kompetitiv inhibiert wird (Liu et al. 2015; Bednorz et al. 2013a; Badia et al. 2012). Des Weiteren kommen Impfprogramme gegen F4-exprimierenden ETEC zum Einsatz (Melkebeek et al. 2013).

Zu den weiteren präventiven Maßnahmen zählt der Einsatz von vergleichsweise großen Mengen an Zinkoxid (bis zu 3000 mg/kg Futter) in der Schweinefütterung (Kloubert et al. 2018; Bednorz et al. 2013b; Vahjen et al. 2011). Im folgenden Abschnitt werden die Eigenschaften und der Einsatz von Zink ausführlich beschrieben.

2.7.1. Biologische Bedeutung von Zink

Zink ist nach Eisen das zweithäufigste vorkommende Übergangsmetall im Körper von Säugetieren und dem Menschen und gehört zu den essentiellen Spurenelementen. Die zweiwertigen Zinkionen (Zn^{2+}) spielen als katalytische und strukturelle Co-Faktoren in über hundert Biomolekülen eine wichtige Rolle und sind unersetzliche Ionen bei der Neurotransmission, dem Zellwachstum und der Apoptose (Andreini et al. 2006; Vallee und Falchuk 1993; Vallee und Auld 1990). Mehr als 30% aller Proteine benötigen mindestens einen Metall-Cofaktor (Nies und Grass 2009; Waldron et al. 2009). Der Anteil der Zink-Metalloproteine beträgt bei Prokaryoten 5-6% dieser Co-Faktor-abhängigen Proteine (Andreini et al. 2006). In höheren Konzentrationen bilden Schwermetallionen unspezifische Komplexe, welche zu toxischen Effekten führen können. Zum Beispiel führen Komplexe aus Quecksilber- (Hg^{2+}), Cadmium- (Cd^{2+}), Silber- (Ag^{2+}), Nickel- (Ni^{2+}) und Zinkionen (Zn^{2+}) zu Einschränkungen der physiologischen Zellfunktionen und zeigen zelltoxische Eigenschaften (Wang und Fierke 2013; Silver und Phung 2005). Nach dem Säure-Base-Konzept von G.N. Lewis agiert Zn^{2+} als elektrophiler Elektronenpaarakzeptor und kann daher als sogenannte Lewis-Säure Elektronenpaare binden (Crichton 2008).

2.7.2. Einsatz von Zink zur Prävention und Behandlung von PWD

Zinkoxid wird seit den frühen 1990er Jahren zur Prävention von PWD eingesetzt (Kloubert et al. 2018; Højberg et al. 2005; Poulsen 1995). Zum einen reduziert der Zink-Zusatz im Futter das Auftreten von PWD-Fällen, zum anderen beeinflusst dieser anscheinend den Stoffwechsel der Ferkel, da eine erhöhte Futteraufnahme der Ferkel beobachtet wurde. Die durch Zinkoxid bedingte geringere Aufnahme von Natrium und Kalium reduziert die Wassersekretion in das Darmlumen und steigert so die fäkale Trockenmasse (Walk et al. 2015; Hollis et al. 2005; Hill et al. 2001). Die positiven Effekte der Zinkoxid-haltigen Fütterung beim Schwein sowie das Verbot des Einsatzes von antimikrobiellen Wachstumsförderern wie Colistin in der EU (2006) haben die Gabe von Zinkoxid in der Schweineproduktion deutlich gesteigert (Kloubert et al. 2018; Vahjen et al. 2015; Fairbrother et al. 2005).

Die derzeitige Ernährungsempfehlung für die physiologische Versorgung der Ferkel mit Zink liegt zwischen 80 und 100 mg/kg Futter und ist in der EU bei maximal 150 mg/kg gedeckelt (Regulation (EC) No 1334/2003). Außerhalb der EU wird Zink in Konzentrationen von 2000-3000 mg/kg dem Futter zugesetzt (Poulsen 1995).

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Zink scheinbar einen nützlichen Effekt gegen pathogene *E. coli*, wie EPEC, STEC und EAEC hat, indem deren Adhäsion, Biofilm-Bildung sowie Expression von Virulenzgenen verringert wird (Medeiros et al. 2013; Crane et al. 2011; Crane et al. 2007). Als weitere mögliche Effekte des Zinkfütterungszusatzes wurde eine gesteigerte Synthese von antimikrobiellen Peptiden im Dünndarm diskutiert (Wang et al. 2004).

Die Wirkung eines hohen Zinkzusatzes im Futter auf die intestinale Mikrobiota der Ferkel ist bislang nicht vollkommen geklärt: Starke et al. (2014) haben eine Reduktion der *E. coli*- und *Enterobacteriaceae*-Häufigkeiten im Magen und Dünndarm verzeichnet. Dagegen kamen Højberg et al. (2005) zu einem gegenteiligen Ergebnis.

Die „Kehrseite“ der großen Mengen Zinkoxid in Schweinefutter ist sowohl die co-selektive Wirkung des Schwermetalls, die im Hinblick auf gleichzeitig auftretende antimikrobielle und Schwermetall- (Zink-) Resistenzen zu vermuten ist (Argudín et al. 2019; Yu et al. 2017; Pal et al. 2015; Seiler und Berendonk 2012; Hölzel et al. 2012; Fard et al. 2011), wie auch die Akkumulation des Schwermetalls Zink auf Ackerflächen durch das Auftragen der Schweinegülle (Noulas et al. 2018; Jensen et al. 2016; Romeo et al. 2014; Shi et al. 2011). Als Konsequenz hat die europäische Kommission auf Empfehlung des Europäischen Arzneimittel-Agentur (engl. European Medicines Agency, EMA) -Komitees für Tierarzneimittel (engl. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use, CVMP) einen Durchführungsbeschluss verabschiedet, laut dem ab Juni 2022 bestehende Zulassungen für zinkoxidbasierte Tierarzneimittel widerrufen und keine neuen Zulassungen mehr erteilt werden (Commission Implementing Decision of 26.6.2017, C (2017) 4,529 Final).

2.8. Zink-Homöostase in *E. coli*

Wie viel Zink benötigen Bakterien für einen physiologischen Stoffwechsel? Schätzungen gehen von einer erforderlichen Konzentration im pico- (Wang et al. 2012) bis femtomolaren (Outten et al. 2001) Bereich für freie Zinkionen bei *E. coli* aus. Für Bakterien ist es wichtig, die Balance zwischen einer ausreichenden Zinkkonzentration zur Aufrechterhaltung diverser Zellfunktionen zu sichern und Zinkakkumulationen in Richtung toxischer Konzentrationen zu verhindern. In Enterobacterales wird die Homöostase durch ein komplexes System aufrechterhalten: Membranständige In- und Effluxpumpen (Wang et al. 2012) sowie die Sequestration von Metallionen im periplasmatischen Spalt durch Bindung an entsprechende Proteine halten das System im Gleichgewicht (Porcheron et al. 2013). Über Zink-abhängige Transkriptionsfaktoren, die entweder als Repressor oder als Aktivator reagieren (Mikhaylina et al. 2018), wird die Expression von Transportern (fein-)reguliert (Waldron et al. 2009).

2.8.1. Aufnahme von Zink durch *E. coli*

Zinkionen werden auf unterschiedlichen Wegen in die *E. coli*-Bakterienzelle aufgenommen (Abbildung 2, rechte Seite). Das Zinkaufnahmesystem (1) **ZnuABC** (*znu*, engl. **zinc uptake**) (Patzer und Hantke 1998) ist hier zu nennen, welches bei geringen Zinkkonzentrationen in der Umgebung eine hohe Affinität zu Zinkionen zeigt (Patzer und Hantke 2000). Im periplasmatischen Spalt binden Zink-Ionen an das Zink-Bindeprotein ZnuA, welches diese wie ein „Shuttle“ zur Transmembrankomponente ZnuB transportiert. Mittels ATP-Hydrolyse durch die ATPase ZnuC wird dann genügend Energie frei, um Zink über die Pore, die durch ein Dimer aus ZnuB gebildet wird, in die Zelle zu transportieren (Wang et al. 2016; Patzer und Hantke 2000; 1998).

Der Zinkaufnahmeregulator **Zur** (engl. **zinc uptake regulator**) gehört zur Fur-(engl. **ferric uptake regulator**) Familie der Metalloregulationsproteine und kontrolliert das ZnuABC-System (Gilston et al. 2014; Patzer und Hantke 1998). Er fungiert als Repressor von *znuABC* und *zinT* (Gabbianelli et al. 2011).

Eine weitere Möglichkeit für Zinkaufnahme erfolgt über (2) **ZupT**. Das Protein zählt zu der Familie der ZIP-(engl. **ZRT-, IRT-like protein**) Transporter (engl. **zinc-regulated transporter-, iron-regulated transporter-like proteins**) (Grass et al. 2002). Bei moderaten Zinkkonzentrationen in der Umgebung erfolgt der Zinktransport meist über ZupT (Porcheron et al. 2013). Ansonsten zeigt das Transportprotein eine geringe Affinität zu Zink und kann zusätzlich Eisen, Cobalt, Cadmium und Magnesium transportieren (Grass et al. 2005; Grass et al. 2002).

Ein weiteres Protein, **ZinT** (ehemals YodA), ist für die Aufnahme von Zink bedeutsam (Gabbianelli et al. 2011). Neben Zink bindet ZinT weitere Kationen wie Cd^{2+} , Ni^{2+} und Hg^{2+} (Kershaw et al. 2007). Im periplasmatischen Spalt bindet es freie Zinkionen und ist in der Lage mit dem

Transportprotein ZnuA (siehe oben) eine Bindung einzugehen, jedoch ist dieser ZnuA-ZinT-Komplex nicht stabil (Gabbianelli et al. 2011; Petrarca et al. 2010). Darüber hinaus wird die Fähigkeit der extrazellulären Zinkbindung beim Protein vermutet, in dem ZinT über die äußere Membran sezerniert werden kann (Gabbianelli et al. 2011). Eine weitere Aufnahme von Zink kann über ein nicht-spezifisches Transportprotein (**PitA**) erfolgen. Dieses transportiert anorganisches Phosphat, aber auch Verbindungen wie beispielsweise Zinksulfat, in relativ hohen Dosen (0,5-2,0 mM) (Jackson et al. 2008; Beard et al. 2000). Insgesamt hängt der Zinkeinstrom in die Bakterienzelle nicht nur von der Menge an freien transmembranösen Transportern ab, sondern auch von der Konzentration der für den Transport verfügbaren freien Zinkionen (Nies 2007).

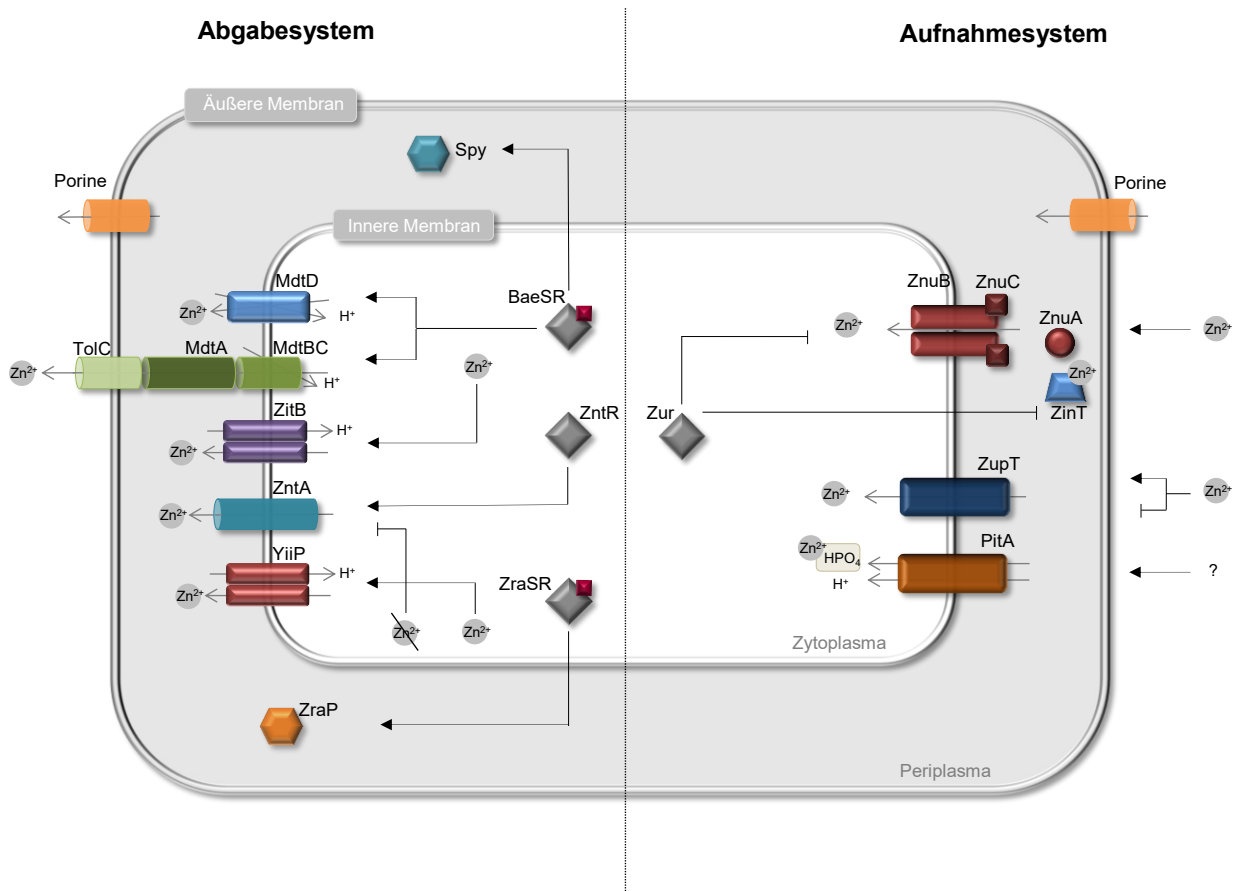


Abbildung 2 | Vereinfachte Darstellung der Zinkhomöostase und ihrer Regulation in *E. coli*

Die vereinfachte Darstellung mit äußerer Membran, periplasmatischem Spalt, innerer Membran und Zytoplasma zeigt auf der linken Seite Transportsysteme des „Abgabesystems“ (ZntA, ZitB, YjiP und MdtABCToIC sowie MdtD) und auf der rechten Seite alle Transportsysteme des „Aufnahmesystems“ (ZnuABC, ZupT und PitA) im zellulären Zinkstoffwechsel. Darüber hinaus sind weitere Proteine im periplasmatischen Spalt lokalisiert, wie ZraP, Spy und ZinT, die das Zink binden können. Der Membrantransport über die äußere Membran erfolgt passiv über Porine (im engl. auch channel). Zinkionen werden aktiv vom Zytoplasma ins Periplasma geschleust oder andersherum, entweder mit oder gegen einen Zn^{2+} -Gradienten. Die Expression der Transportsysteme wird entweder durch Regulationsfaktoren, wie BaeSR oder Zur, aktiviert oder inhibiert bzw. direkt von der Konzentration von Zink beeinflusst (Watly et al. 2016; Blindauer 2015; Porcheron et al. 2013; Waldron et al. 2009).

2.8.2. Abgabe von Zink durch *E. coli*

Die Abgabe von Zink (Detoxifikation; Abbildung 2, linke Seite) wird vor allem durch (1) P-Typ-ATPasen und (2) engl. Cation Diffusion Facilitators (CDF), aber auch durch (3) engl. Resistance Nodulation Cell Division (RND)-Transportsysteme bewältigt (Anes et al. 2015; Wei und Fu 2006; Grass et al. 2001; Rensing et al. 1997a). Metallionen gelangen vom Zyto- ins Periplasma, in dem der Transport durch P-Typ-ATPasen oder CDF-Transporter über die innere Membran durchgeführt wird (Klein und Lewinson 2011). (1) Bei hohen Zinkkonzentrationen fällt der P_{1b}-Typ-ATPase **ZntA** eine entscheidende Rolle in der Entgiftung von *E. coli* zu (Wang et al. 2012; Rensing et al. 1997a). Durch die freiwerdende Energie der ATP-Hydrolyse transportiert ZntA neben Zinkionen auch Cd²⁺ und Pb²⁺ (Binet und Poole 2000). Der Transkriptionsfaktor **ZntR** (engl. **z**inc-**r**esponse **t**ranscriptional **r**egulator), zur MerR (engl. **m**ercury **r**esistance operon regulatory protein) - Familie zählend, steigert die Expression von *zntA*. Bei Abwesenheit von Zink bindet ZntR am ZntA-Promotor und verhindert eine Expression von *zntA*. Sobald Zink in hohen Konzentrationen vorhanden ist, wandelt sich ZntR in einen transkriptionellen Aktivator (Brocklehurst und Morby 2000b; Outten et al. 1999).

(2) CDF-Transporter sind sekundär aktiv und nutzen die Energie, die durch den Antiport von zweiwertigen Metallionen (M²⁺) gegen Protonen (H⁺) entsteht, um Ionen vom Zytoplasma aus der Zelle hinaus oder in andere Zellkompartimente zu tragen (Chao und Fu 2004). Im Gegensatz zu P-Typ-ATPasen oder ABC-Transportern transportieren CDF-Proteine ausschließlich Metallionen (Anton et al. 2004). Neben ZntA ist **ZitB** ein wichtiger Zink-Exporter, der unter normalen Zink-Bedingungen aktiv ist (Wang et al. 2012). Eine gesteigerte Zinktoleranz und reduzierte Aufnahme von Zink führt zu einer Überexpression von ZitB (Grass et al. 2001). Ein weiterer CDF-Vertreter ist **YiiP**, der Zink und Cadmium transportiert (Hoch et al. 2012; Wei und Fu 2005). Die Expression von *yiiP* ist abhängig von Zink (Grass et al. 2001). Eine Deletion oder Überexpression des Gens führen jedoch anscheinend nicht zu einer Zinktoleranz bei *E. coli* (Grass et al. 2001).

(3) Die große Gruppe der Multidrug-Resistance (MDR)-Effluxpumpen gehört zur RND-Efflux-Familie, die mitunter eine wichtige Rolle in der intrinsischen Resistenz bei Gram-negativen Bakterien spielt (Fernando und Kumar 2013). Sie setzen sich aus dem zentralen RND-Substrat-Antiporter, einem periplasmatischen Membranfusionsprotein (MFP) und dem Außenmembrankanalfaktor zusammen (Hincliffe et al. 2013; Kim et al. 2011). In *E. coli* wurden einige solcher RND-Efflux-Systeme beschrieben (Nikaido 2011), die neben vielen anderen Substraten auch Zink transportieren können, zum Beispiel das **MdtABC-ToIC**-Efflux-System (Wang und Fierke 2013). Dieses Efflux-System wird durch das **BaeSR** (engl. **b**acterial **a**daptive **r**esponse)-Zweikomponentensystem reguliert (Leblanc et al. 2011).

Weitere Proteine in *E. coli* tragen zur zellulären Zink-Homöostase bei. Das periplasmatische Protein **ZraP** (engl. **z**inc **r**esistance-**a**ssociated **p**rotein) übernimmt die Funktion eines

Metallochaperons, indem es Zink im Periplasma bindet (Petit-Hartlein et al. 2015). Bei exzessiven Zinkmengen wird dessen Expression hochreguliert. Dieser Prozess wird über das **ZraSR**-Zweikomponentensystem gesteuert (Petit-Hartlein et al. 2015). Ein zusätzliches Bindungsprotein ist das kleine periplasmatische Protein **Spy** (engl. **S**pheroplast **p**rotein **Y**), welches *E. coli* vor Zink-induzierter Proteindenaturierung und Aggregation im Periplasma schützt (Quan et al. 2011). Die Expression von Spy wird über das Cpx (engl. **C**onjugative **p**ilus **e**xpression)- bzw. das Bae-Zweikomponentensystem in *E. coli* reguliert (Bury-Moné et al. 2009).

2.9. Mögliche Ursachen von Schwermetallresistenz

Resistenzen (Definition 1) gegenüber Schwermetallen können bei Bakterien auf Chromosomen und/oder mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden oder Transposons codiert sein (Brown et al. 1995; Rouch et al. 1995; Carlin et al. 1995; Kholodii et al. 1995). Grundsätzlich sind fünf unterschiedliche Mechanismen als Hauptursache für Resistenzen gegen Schwermetalle in Bakterien und anderen Mikroorganismen beschrieben (Tabelle 2): (1) Impermeabilität der Barrieren (Egler et al. 2005; Gupta et al. 1995), (2) Verringerung des aktiven Transportes (Mergeay et al. 2003; Rensing et al. 2000; Srikumar et al. 1998; Odermatt und Solioz 1995), (3) intrazelluläre Sequestration von Metallen durch Bindungsproteine (Kotrba et al. 1999; Gupta et al. 1993), (4) extrazelluläre Sequestration (Slaveykova et al. 2010; Foster et al. 2000) und (5) gesteigerte Detoxifikationsleistung (Wang et al. 2017; Morais et al. 2011; Robinson und Tuovinen 1984).

Definition 1 | Wenn Bakterien durch bestimmte antimikrobielle Wirkstoffe nicht mehr eradiziert oder in ihrem Wachstum gehemmt werden, bezeichnet man sie als „**resistent**“. Der Grad der Empfindlichkeit wird häufig über die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK; engl., minimum inhibitory concentration, MIC) gemessen. Sie beschreibt die geringste wirksame Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) eines bestimmten antimikrobiellen Wirkstoffes, die das Wachstum eines zu untersuchenden Bakterien-Isolates hemmt (Schwarz et al. 2010b).

Grundsätzlich wird zwischen einer natürlich vorkommenden (intrinsische, inherente) und einer erworbenen Resistenz unterschieden. Die **intrinsische Resistenz** ist die Fähigkeit einer Bakterienspezies gegen die Wirkung eines bestimmten antimikrobiellen Wirkstoffs als Ergebnis inhärenter struktureller oder funktionaler Eigenschaften standzuhalten. Ein einfaches Beispiel hierfür ist die Undurchlässigkeit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien gegenüber dem Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin, das normalerweise an Zielpeptiden im Periplasma bindet (Blair et al. 2015). Befindet sich der MHK-Wert aller Isolate einer Bakterienspezies über dem festgelegten Grenzwert (Breakpoint), liegt methodisch eine intrinsische Resistenz vor (Martinez 2014).

Bakterien können ebenfalls Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen durch Mutationen von chromosomalen Genen bzw. die Aufnahme von neuen Genen über den Horizontalen Gentransfer (HGT) erwerben (**erworbene Resistenz**). Generell führen Mutationen von drei Arten bakterieller Gene zu einer Resistenz: (1) Zielstruktur-Gene (2) Transporter (Effluxpumpen)-Gene bzw. deren Regulationsgene und (3) Gene für Antibiotika-

dekontaminierende Elemente (hauptsächlich modifizierende Enzyme und Multidrug-Effluxpumpen) (Martinez 2014). Beispielsweise führen Mutationen an den Zielstrukturgenen der Topoisomerase II und IV (*gyrA* bzw. *gyrC*) zu einer Fluorchinolon-Resistenz (Martinez und Baquero 2000).

Der HGT von Resistenzgenen kann durch drei verschiedene Wege erfolgen: (1) bei Kontakt zweier Bakterienzellen durch Konjugation, (2) durch Transduktion bei Bakteriophagen oder (3) im Fall eines Transposons durch ein „Überspringen“ auf eine Empfängerzelle (Furuya und Lowy 2006). Die Resistenzgene sind beim HGT häufig auf mobilen genetischen Elementen (MGE) wie Plasmide oder Transposons lokalisiert.

Dahingegen überdauern „**tolerante**“ Bakterien die veränderte Umgebung in einem Ruhezustand ohne sich genetisch zu verändern. Darunter können sich „**persistente**“ Subpopulationen befinden, die durch ein epigenetisches Merkmal gekennzeichnet sind. Sie zeigen eine Toleranz gegenüber einem Wirkstoff und ruhen ohne metabolische Aktivität (Levin-Reisman et al. 2019).

2.9.1. Zinktoleranz

Der bislang am genauesten untersuchte Zinkresistenzmechanismus ist das *Czc*-System aus der Gram-negativen Familie *Cupriavidus* (*C.*) (bekannt als Trinkwasserbakterien). Dieses System wurde in dem Wildtyp-Isolat *C. metallidurans* CH34 mit zwei Megaplasmiden festgestellt. Die enthaltenen *czc*-Gene auf dem Plasmid pMOL30 vermitteln Resistenzen gegenüber Cobalt, Zink und Cadmium (Nies et al. 1987). Das System funktioniert als ein Kation/Protonen-Austauscher, der Kationen aus der Zelle transportiert (Rensing et al. 1997b). Ein ähnliches Gencluster hat man im Isolat *Pseudomonas* (*P.*) *aeruginosa* CMG103 als *czr* identifiziert, das ebenfalls bei einer Cadmium- und Zinkresistenz eine Rolle spielt (Hassan et al. 1999).

Ein weiterer Transportmechanismus, der mit Zinktoleranz in Verbindung gebracht wird, sind bestimmte P-typ ATPasen von *E. coli* (Beard et al. 1997) und *P. putida* (Choudhury und Srivastava 2001).

Bevor Zinkionen in die Bakterienzelle gelangen, können sie durch folgende Proteine gebunden werden: Negativ geladene Exopolysaccharide (EPS) an der Außenhülle stehen im Verdacht Schwermetalle zu binden, wie zum Beispiel die Zinkbindungsfähigkeit der Diguanylat-Zyklase *DgcZ* in *E. coli* beweist (Lacanna et al. 2016). Darüber hinaus gibt es Porine an der Außenmembran, wie *OmpF* bei *E. coli*, bei denen die Genexpression unter Zinkstress gesteigert wird (Easton et al. 2006).

Nicht allein der Export kann zur Detoxifikation beitragen, sondern auch die Möglichkeit, Metallionen intrazellulär zu binden und damit die zelluläre Schädigung zu verringern. Metallothionein (MT) beispielsweise ist ein Stress-induziertes Protein mit antioxidativer Wirkung, welches zur intrazellulären Homöostase beiträgt, indem es Zink, Cadmium, Kupfer, Quecksilber und Silber (gesteigerte Affinität nach Reihenfolge) bindet (Henkel und Krebs 2004). Vor allem werden diese Proteine in eukaryotischen Zellen gebildet, jedoch wurden in Cyanobakterien (*Synechococcus* spp.) und in *P. putida* MT-ähnliche Proteine identifiziert, die Kupfer, Cadmium

und Zink binden können (Higham et al. 1984; Olafson et al. 1979). Eine Deletion im MT-Locus *smt*, der die Gene *smtA* und *smtB* beinhaltet, führt zu einer Reduktion der Zink- und Cadmiumtoleranz (Higham et al. 1984). Eine schnelle Antwort des Bakteriums auf Änderungen von Umweltbedingungen ist primär das Ausschleusen von toxischen Metallionen. Halten die hohen Konzentrationen von Metallionen über einen längeren Zeitraum an, können Bindungs- resp. Speicherungsprozesse am oder im Bakterium eine überlebenswichtige Möglichkeit darstellen und somit eine Erklärung für ein tolerantes bzw. resistentes Verhalten sein (Chandrangsu et al. 2017; Choudhury und Srivastava 2001). Die Bakterien *P. syringae*, *E. coli*, sowie *C. metallidurans* CH34 sind in der Lage exzessive Mengen Kupfer im periplasmatischen Spalt zu lagern, um lebensfeindliche Umgebungen mit hohen Konzentrationen zu überdauern (Monchy et al. 2007; Brown et al. 1995; Cooksey 1987). Ein vergleichbares Phänomen kann womöglich durch das Spy-Protein in *E. coli* induziert werden: Mutanten ohne *spy* wuchsen in Gegenwart hoher Zinkkonzentrationen langsamer und es konnten größere Mengen an freiem Zink in der Bakterienzelle gemessen werden (Wang und Fierke 2013).

Betrachtet man zudem übergeordnete Regulationsmechanismen, so gibt es Hinweise auf Veränderungen in Gegenwart großer Zinkmengen. In Transkriptomstudien wurden Gene detektiert, die bei Anwesenheit von Zink hochreguliert werden (Lee et al. 2005; Yamamoto und Ishihama 2005). Zum Beispiel wurde die Expression des Zweikomponentensystems BaeRS und des MdtABC-Operons unter Zinkexzess gesteigert (Lee et al. 2005). Exzessiver Kupfergehalt führt nachweislich zu einer Veränderung der Transkription von Genen, die zur Zink- und Eisenhomöostase gehören (Pontel et al. 2014). Jedoch wurde bisher kein System in *E. coli* gefunden, das ausschließlich für eine erheblich gesteigerte Zinktoleranz verantwortlich ist.

Typ	Wie?	Art	Beispiele			Referenzen
			Gen	Protein-Familie	Protein/ Besonderheiten	
Undurchlässigkeit	Außenmembran	Lipiddoppelschicht, Peptidoglycanschicht, Innenmembran				
	Bindung an Zellwand- komponente	Exopolysaccharide (EPS)	<i>dgcZ</i>		Diguanylatzyklase / Biofilm, reguliert durch Zn ²⁺	(Lacanna et al. 2016)
	Porine	Außenmembranporin	<i>ompF</i>	OMP	Außenmembranporin OmpF / Steigerung nach Zinkstress	(Easton et al. 2006)
		poly-His Peptide	<i>lamB</i>	SP family	Maltoporin LamB	(Kotrba et al. 1999; Sousa et al. 1996)
Export	Höhere Exportrate, Affinitätssteigerung, mehr Proteine	Membrantransporter	<i>cusC</i>	OMF	Außenmembrantunnel	(Delmar et al. 2015)
			<i>cusF</i>		periplasmatisches Metallochaperon	
			<i>cusB</i>	MFP	periplasmatisches Membranfusionsprotein	
			<i>cusA</i>	RND	Kupfer/Silber –Exportsystem-Permease	(Okusu et al. 1996)
			<i>acrA</i>	MFP	Multidrug-Effluxpumpen-Untereinheit	
			<i>acrB</i>	RND	Multidrug-Effluxpumpen-Untereinheit	
			<i>mdtA</i>	MFP	Multidrug-Resistenzprotein	(Kim et al. 2010)
			<i>mdtB</i>	RND	Multidrug-Resistenzprotein	
			<i>mdtC</i>	RND	Multidrug-Resistenzprotein	
			<i>zitB</i>	CDF	Zinktransporter	(Lee et al. 2002)
			<i>yjiP</i>		Zink-/Protonen-Antiporter	(Lu et al. 2009)
			<i>zntA</i>	P-type ATPase	P _{1B} -type ATPase	(Wang et al. 2012)
<i>copA</i>	Kupfer-Effluxpumpe	(Padilla-Benavides et al. 2014)				
Import	Geringere Importrate, Affinitätssenkung, weniger Proteine	Membrantransporter	<i>znuA</i>	ABC-Transporter	periplasmatisches Bindungsprotein	(Gabbianelli et al. 2011)
			<i>znuB</i>		Integralmembrantransporter	
			<i>znuC</i>		ATPase	
			<i>zupT</i>	ZRT/IRT- like Protein (ZIP)	Zinkaufnahmetransporter	(Grass et al. 2005)

Tabelle 2 | Faktoren mit möglichem Einfluss auf die Zinktoleranz in *E. coli*

Typ	Wie?	Art	Beispiele			Referenzen
			Gen	Protein-Familie	Protein/ Besonderheiten	
IZ Sequestration	Metalloproteine/ chaperone	Bindungsproteine	<i>zraP</i>	CpxP Familie	periplasmatisches Protein / mit Zinkresistenz assoziiert	(Petit-Hartlein et al. 2015)
			<i>spy</i>		periplasmatisches Spheroplast Protein y	(Porcheron et al. 2013)
			<i>bmtA</i>	BmtA	Metallothionein (SmtA-ähnlich)	(Blindauer et al. 2002)
Regulation der Homöostase	Steigerung der Zinkabgabe	Regulation des Exports	<i>zntR</i>	MerR	transkriptionaler Regulator / bindet Zink, Blei und Cadmium; Überexpression unter Zinkstress	(Wang et al. 2012)
			<i>baeS</i>	TCS	Histidine-Proteinkinase	(Wang und Fierke 2013)
			<i>baeR</i>		transkriptionaler Regulator / reguliert MdtABC, MdtD und Spy	
			<i>zraS</i>		Histidine-Proteinkinase	
	Senkung der Zinkaufnahme	Regulation des Imports	<i>zur</i>	Fur	Zink uptake regulator	(Choi et al. 2017)
			<i>soxR</i>	MerR	Transkriptionaler Regulator; u.a. Aktivierung von znuABC	(Warner und Levy 2012)
	Stressantwort	Regulation der Stressantwort	<i>Cpx</i>	Cpx	Transkriptionelle Veränderungen der Cpx-regulierten Gene in Gegenwart von Zink	(Pontel et al. 2014; Lee et al. 2005)
Mutation	Gene des Zinkhaushaltes	Veränderungen der Zinkaufnahme				
		Veränderungen der Zinkabgabe				

Die Ursachen einer Zinktoleranz bei *E. coli* können in folgenden Bereichen verankert sein: (1) Undurchlässigkeit, (2) Export und (3) Import, (4) intrazelluläre Sequestrierung, (5) Regulation der Homöostase und (6) Mutation. Bei der Undurchlässigkeit können die Ursachen einer Zinktoleranz in der Außenmembran, in Bindungen an Zellwandkomponenten oder in speziellen Porinen zu finden sein. Eine höhere Exportrate, Affinitätssteigerung zu Zink und/oder die Expressionssteigerung von Exportproteinen können zu einer Zinktoleranz führen. Zusätzlich halten geringere Importraten, Affinitätssenkung und/oder geringere Expression von Importproteinen Zink vom Eintritt in die Zelle ab. Sobald Zink in der Zelle importiert ist, können intrazelluläre Sequestrierungen zu einer Zinktoleranz führen. Auf der Regulationsebene sind mögliche Steigerung des Effluxes und/oder Senkung des Influxes Ursachen einer Zinktoleranz. Mögliche Mutationen in Genen des Zinkhaushaltes lösen Mechanismen aus, die zu einer Zinktoleranz führen können.

Abkürzungen

ABC: ATP binding cassette; CDF: Cation Diffusion Facilitator; Cpx: conjugative pilus expression, Fur: Ferric uptake regulator; IZ: intrazellulär; MerR: Mercury resistance operon regulatory system; MFP: Multidrug Fusion Protein; OMF: Outer Membrane Factor; OMP: Outer Membrane Protein; RND: Resistance Nodulation Devison; SP: Sugar Protein; TCS: two-component signal transduction system; ZIP: Zinc regulated transporter (ZRT)-/ Iron regulated transporter (IRT)- like Protein

2.10. Assoziation zwischen bakterieller Schwermetalltoleranz und Antibiotika-Resistenz in der Umwelt

Nach der zufälligen Entdeckung von Penicillin im Jahre 1928 durch den Bakteriologen Alexander Fleming war die suffiziente antibiotische Behandlung vieler bakterieller Infektionen bei Menschen und Tieren für lange Zeit gesichert (Ventola 2015). Heute wird die Bekämpfung von bakteriellen Infektionskrankheiten durch verschiedene Entwicklungen immer schwieriger: Auf der einen Seite steigt die Anzahl (multi-) resistenter pathogener Bakterien in der Human- und Veterinärmedizin stetig an. Auf der anderen Seite werden nur wenige neue antimikrobielle Wirkstoffe entwickelt, weil Pharmaunternehmen an der Neuentwicklung und Zulassung eines Produkts nur geringes Interesse zeigen bzw. die Entwicklung sehr anspruchsvoll ist. Die Entwicklung neuer Arzneimittel ist mit immensen Kosten verbunden, doch der Vertrieb vergleichsweise geringer Mengen Antibiotika, gar für Tiere, erzielt nicht die Marge wie z.B. ein Blutdrucksenker, der dauerhaft von vielen Menschen eingenommen werden muss (Ventola 2015; Conly und Johnston 2005). Im Fokus der Wissenschaft steht daher unter anderem die Verhinderung der Entstehung und Weitergabe von Resistenzen gegenüber den bisher gängigen Wirkstoffen (Yu et al. 2017). Um die Verbreitung und Entstehung von Antibiotika-resistenzen zu minimieren, sind unter anderem seit 2006 antimikrobielle Wirkstoffe in Form von Futterzusatzstoffen in der EU verboten (Cogliani et al. 2011).

Schätzungen aus 2015 zufolge erwartet man weltweit jedes Jahr einen Durchschnittsbedarf an Antibiotika für die Behandlung von landwirtschaftlichen Nutztieren von 45 mg/kg bei Rindern, 148 mg/kg bei Hühnern und 172 mg/kg bei Schweinen. Voraussichtlich steigt daher der weltweite Antibiotikadurchschnittsverbrauch von 2010 bis 2030 um 67% an (Van Boeckel et al. 2015). Bis zu einem Drittel dieser Steigerung werden Folgen der Umstellung der bäuerlichen Agrarwirtschaft zur Intensivlandwirtschaft in Entwicklungs- und Schwellenländern sein, in der antimikrobielle Wirkstoffe in subtherapeutischen Dosen zur Prävention und Wachstumsförderung statt ausschließlich zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden (Van Boeckel et al. 2015).

Das gleichzeitige Auftreten von Schwermetallresistenzen und antimikrobiellen Resistenzen in Bakterien wird in zahlreichen Veröffentlichungen aufgezeigt. Medardus et al. (2014) konnten bei fast 2/3 der Salmonella-Isolate aus Futter-, Fäkal- und Stallbodenproben aus der Schweineproduktion eine phänotypische Multiresistenz gegenüber Antibiotika nachweisen. Zusätzlich wiesen diese Isolate eine erhöhte phänotypische Zink- (bis zu 8 mM) und Kupfertoleranz (24 mM) auf, die genotypisch mit dem Vorhandensein der Gene *czcD* (Zinktoleranz) und *pcoA* (Kupfertoleranz) assoziiert waren. Insgesamt konnte das phänotypische und genotypische Toleranz-/Resistenzverhalten der Isolate mit der Fütterung von Zink- und Kupferhaltigem Schweinefutter in Zusammenhang gebracht werden (Medardus et al. 2014). Diese

Assoziation zwischen Fütterung von schwermetallhaltigen Zusatzfuttermitteln und dem Auftreten einer Co-Resistenz von Zink-, Kupfer- und Antibiotika-Resistenzgenen wird im Review-Artikel von Yazdankhah et al. (2014) anhand von diversen Studien, wie beispielsweise über *Staphylococcus aureus* (*czrC*, s. 2.9.1) oder *Enterococcus* spp. (Kupferresistenzgen *tcpB* und Erythromycin-Resistenzgen *ermB* auf einem Plasmid) ebenfalls beschrieben.

Weitere Schwermetall-Kontaminationen in der Umwelt sind unter anderem in Abwässern (Becerra-Castro et al. 2015; Ferreira da Silva et al. 2007), Abflüssen von landwirtschaftlichen Nutzflächen (Srivastava et al. 2017) sowie Abwässern aus Industrie und Pharmazie (Deredjian et al. 2011) bekannt. Durch den Kontakt der Bakterien mit diversen Wirkstoffen wie Antibiotika, Schwermetallen und organischen Lösungsmitteln in der Umwelt entsteht ein Selektionsdruck, der zu Toleranzen und letztlich zur Resistenz (Definition 1) gegenüber diesen Substanzen führen kann (Ashbolt Nicholas et al. 2013). Der Review-Artikel von Nguyen et al. (2019) betrachtet 42 Studien und vergleicht die aufgeführten Schwermetall- und Antibiotika-resistenzen in Bakterien aus diversen Umweltreservoirs (Wasser, Abwässer und Boden). Am häufigsten wird über *P. aeruginosa* und *E. coli* berichtet, meist zu phänotypischer Resistenz gegenüber Cadmium, Kupfer und Zink sowie gegenüber verschiedenen Antibiotika, z.B. Aminoglykosiden oder Tetrazyklinen (Nguyen et al. 2019).

Grundsätzlich wird bei Bakterien zwischen Co-Resistenz (engl. co-resistance) und Kreuzresistenz (engl. cross-resistance) unterschieden (Nguyen et al. 2019) (Definition 2).

Definition 2 | Eine **Kreuzresistenz** definiert ein Ereignis, bei dem ein Bakterium gegen zwei oder mehrere Substanzen, wie beispielsweise Desinfektionsmittel und Antibiotika, resistent ist. Entweder zeigen die Substanzen eine ähnliche chemische Struktur oder verfügen über die gleichen Wirkmechanismen in oder an der Bakterienzelle. Die sogenannte **Co-Resistenz** beschreibt das gemeinsame Auftreten von separaten Resistenzmechanismen von phänotypisch resistenten Bakterien auf einem mobilen genetischen Element (MGE, wie zum Beispiel Plasmide, Transposons und Integrone). Die **Co-Regulation / Co-Expression** beinhaltet die gleichzeitige Regulation der Expression von Resistenzgenen gegenüber Antibiotika und Schwermetallen durch einen gemeinsamen Regulator (Pal et al. 2015; Baker-Austin et al. 2006).

Allgemein kommt eine Kreuzresistenz häufig durch (engl.) multidrug resistance (MDR)-Effluxpumpen zum Tragen: Diese Effluxpumpen können verschiedene Substanzen, darunter auch antimikrobielle Wirkstoffe und Schwermetalle, aus der Zelle schleusen. Ein Beispiel hierfür ist das Effluxsystem MdtABC-TolC, das zur Familie der RND-Systeme gehört und Metalle wie Kupfer oder Zink transportiert (Wang und Fierke 2013) sowie diverse Substrate wie Novobiocin und Gallensalze (Nagakubo et al. 2002), Quinolone und Fosfomycin (Nishino und Yamaguchi 2001) und Myricetin (Kim und Nikaido 2012).

Fang et al. (2016) haben folgenden Co-Resistenz in *E. coli*-Isolaten aus Proben von erkrankten, lebensmittelliefernden Tieren beschrieben: Es wurden Plasmide identifiziert, auf denen Gene für Effluxsysteme zur Detoxifikation von Kupfer, Silber und Arsen sowie gleichzeitig Determinanten für Antibiotika- und Schwermetall-Resistenzen lokalisiert waren (Fang et al. 2016). Ein weiteres Beispiel für eine Co-Resistenz beschreiben folgende Studien: Zunächst konnte in einer Studie die phänotypische Assoziation zwischen Zink- und Methicillinresistenz bei *Staphylococcus (S.) aureus*, die aus Proben von dänischen Schweinen isoliert wurden, dargelegt werden (Aarestrup et al. 2010). Darauf folgte eine weitere Studie, die die Gene für die zuvor bestätigte phänotypische Zinkresistenz sowie eine gleichzeitige Cadmiumresistenz (*czr*) identifizierte (Cavaco et al. 2010). Zudem zeigten Cavaco et al. (2010) die Verbindung des Cadmium- und Zinkresistenz-Gens *czrC* mit einer bestimmten Genkassette für die Methicillinresistenz (*SCCmecV*) der *S. aureus*-Isolate.

Ein weiteres Beispiel für eine Co-Regulation verdeutlicht eine Studie an *P. aeruginosa* (Perron et al. 2004). Die Expression des CzcCBA-Effluxsystems in *P. aeruginosa* vermittelt eine Resistenz gegenüber Zink, Cadmium und Cobalt und wird durch das Zweikomponentensystem CzcR-CzcS reguliert. Gleichzeitig reguliert das System die Expression für das OprD-Porin, das mit einer Resistenz gegenüber Carbapeneme (Imipenem) assoziiert wird (Perron et al. 2004). Die Wirkung von Schwermetallen kann also zum Anstieg der Antibiotikaresistenzen in Umweltbakterien, Kommensalen sowie Pathogenen beitragen, da durch diesen Selektionsdruck über den Weg der Co-Selektion die horizontale Verbreitung von MGE einschließlich deren Resistenzdeterminanten gegen Antibiotika und Schwermetallen begünstigt wird.

2.11. Vorausgegangene Studien

Aus den Erkenntnissen zum gemeinsamen Auftreten von Schwermetallresistenz- und Antibiotikaresistenzgenen auf MGEs bei Bakterien (Argudín et al. 2019; Pal et al. 2015; Yazdankhah et al. 2014) und der steigenden Anzahl von multi-resistenten Erregern in der Schweineproduktion (Ciesinski et al. 2018; Bednorz et al. 2013b) ergab sich die Hypothese, dass ein hoher Anteil von Zinkoxid im Ferkelfutter die Ausbreitung multi-resistenter Bakterien in der Schweineproduktion möglicherweise begünstigt.

Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (SFB) 852 „Ernährung, intestinale Mikrobiota und Wirtsinteraktionen beim Schwein“ wurde ein Teilprojekt (A3) zur Klärung dieser Frage eingerichtet. Dieses Projekt analysierte die Effekte und Mechanismen von Probiotika und Zink auf die Mikrobiota des Schweines. Im Rahmen einer Fütterungsstudie konnten sowohl kommensale als auch pathogene *E. coli* aus der Darmmukosa des Colons, der Digesta sowie

dem Kot von Ferkeln isoliert werden. Diese intestinalen *E. coli*-Isolate wurden molekularbiologisch auf ihre klonale Verwandtschaft mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) überprüft, um eine Analyse von Duplikaten auszuschließen. Darüber hinaus wurde die antimikrobielle Resistenz jedes Klons (eine phylogenetisch verwandte Gruppe von Isolaten) mittels Mikrodilutionsverfahren ermittelt. Insgesamt konnte als Ergebnis dieses Teilprojektes im SFB gezeigt werden, dass die Fütterung von Zinkoxid einen erheblichen Effekt auf die intestinale *E. coli*-Population hat. Die mittels Makrorestriktion von genomischer DNA ermittelten klonalen Unterschiede ließen auf (1) eine höhere genetische Variabilität sowie (2) eine höhere Rate resistenter *E. coli* bei zinkgefütterten Ferkeln schließen (Bednorz et al. 2013b). Dennoch konnte statistisch keine signifikante Assoziation zwischen Zinktoleranz und antimikrobieller Resistenz in *E. coli* erfasst werden (Ghazisaeedi et al. 2020; Bednorz et al. 2013b).

Um den Einfluss von Zink auf die Resistenz von *E. coli* besser bewerten zu können und einen Einblick in die möglicherweise zugrundeliegenden Mechanismen zu gewinnen, wurden weitere Studien durchgeführt. Innerhalb eines weiteren Zinkfütterungsversuches mit Ferkeln wurden die absoluten *E. coli*-Zahlen sowohl für die Zinkfütterungsgruppe als auch für die Kontrollgruppe für drei unterschiedliche Entnahmeorte (Fäzes, Digesta und Mukosa) zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Hier konnte ein deutlicher Anstieg des Anteils von antibiotikaresistenten *E. coli* in der Zinkfütterungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe bei gleichzeitiger Abnahme der relativen *E. coli*-Gesamtpopulation in beiden Fütterungsgruppen verzeichnet werden (Ciesinski et al. 2018). Daraufhin wurden Konjugationsexperimente durchgeführt um den möglichen Einfluss von Zink auf die Konjugationsrate der Bakterien zu ermitteln, welche eine mögliche Erklärung für die erhöhte Resistenzrate bei hohen Zinkkonzentrationen bieten könnte. Einzelne Ergebnisse wiesen allerdings eher auf eine verringerte Konjugationsrate in Gegenwart von Zink hin (Ciesinski et al. 2018).

Beide vorausgegangenen Fütterungsstudien konnten die Ursachen für die beobachtete Zunahme der Diversität und die höheren Resistenzraten bei *E. coli* unter Zinkeinfluss nicht abschließend klären. Aus der zweiten Fütterungsstudie standen 817 *E. coli*-Isolate vom letzten Beprobungszeitpunkt (52 ± 2 Tage) für weitere, auf genomische Analysen beruhende Untersuchungen zur Verfügung. Unter Beachtung von Probeentnahmeort, Fütterungsgruppe und phänotypischem Antibiotikaprofil wurde eine stratifizierte Zufallsstichprobe von 179 *E. coli*-Isolaten ausgewählt.

3. Veröffentlichungen

3.1. Veröffentlichung I

V.C. Johanns, F. Ghazisaeedi, L. Epping, T. Semmler, A. Lübke-Becker, Y. Pfeiffer, A. Bethe, I. Eichhorn, R. Merle, B. Walther, L.H. Wieler.

Effects of a Four-Week High-Dosage Zinc Oxide Supplemented Diet on Commensal *Escherichia coli* of Weaned Pigs.

Frontiers in Microbiology, 2019. Nov 28; 10(2734).

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02734>

The manuscript received: 16th July 2019

Accepted: 11th November 2019



Effects of a Four-Week High-Dosage Zinc Oxide Supplemented Diet on Commensal *Escherichia coli* of Weaned Pigs

Vanessa C. Johanns¹, Fereshteh Ghazisaeedi², Lennard Epping³, Torsten Semmler³, Antina Lübke-Becker², Yvonne Pfeifer⁴, Astrid Bethe², Inga Eichhorn², Roswitha Merle⁵, Birgit Walther^{1*†} and Lothar H. Wieler^{6†}

¹ Advanced Light and Electron Microscopy (ZBS-4), Robert Koch Institute, Berlin, Germany, ² Institute of Microbiology and Epizootics, Centre for Infection Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, ³ Microbial Genomics (NG1), Robert Koch Institute, Berlin, Germany, ⁴ Nosocomial Pathogens and Antibiotic Resistances, Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany, ⁵ Institute for Veterinary Epidemiology and Biostatistics, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, ⁶ Robert Koch Institute, Berlin, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Patrick Rik Butaye,
Ross University School of Veterinary
Medicine, Saint Kitts and Nevis

Reviewed by:

Jeroen Dewulf,
Ghent University, Belgium
Catherine M. Logue,
University of Georgia, United States

*Correspondence:

Birgit Walther
waltherb@rki.de

† These authors share senior
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 16 July 2019

Accepted: 11 November 2019

Published: 28 November 2019

Citation:

Johanns VC, Ghazisaeedi F,
Epping L, Semmler T,
Lübke-Becker A, Pfeifer Y, Bethe A,
Eichhorn I, Merle R, Walther B and
Wieler LH (2019) Effects of a
Four-Week High-Dosage Zinc Oxide
Supplemented Diet on Commensal
Escherichia coli of Weaned Pigs.
Front. Microbiol. 10:2734.
doi: 10.3389/fmicb.2019.02734

Strategies to reduce economic losses associated with post-weaning diarrhea in pig farming include high-level dietary zinc oxide supplementation. However, excessive usage of zinc oxide in the pig production sector was found to be associated with accumulation of multidrug resistant bacteria in these animals, presenting an environmental burden through contaminated manure. Here we report on zinc tolerance among a random selection of intestinal *Escherichia coli* comprising of different antibiotic resistance phenotypes and sampling sites isolated during a controlled feeding trial from 16 weaned piglets: In total, 179 isolates from “pigs fed with high zinc concentrations” (high zinc group, [HZG]: $n = 99$) and a corresponding “control group” ([CG]: $n = 80$) were investigated with regard to zinc tolerance, antimicrobial- and biocide susceptibilities by determining minimum inhibitory concentrations (MICs). In addition, *in silico* whole genome screening (WGSc) for antibiotic resistance genes (ARGs) as well as biocide- and heavy metal tolerance genes was performed using an in-house BLAST-based pipeline. Overall, porcine *E. coli* isolates showed three different $ZnCl_2$ MICs: 128 $\mu\text{g/ml}$ (HZG, 2%; CG, 6%), 256 $\mu\text{g/ml}$ (HZG, 64%; CG, 91%) and 512 $\mu\text{g/ml}$ $ZnCl_2$ (HZG, 34%, CG, 3%), a unimodal distribution most likely reflecting natural differences in zinc tolerance associated with different genetic lineages. However, a selective impact of the zinc-rich supplemented diet seems to be reasonable, since the linear mixed regression model revealed a statistically significant association between “higher” $ZnCl_2$ MICs and isolates representing the HZG as well as “lower $ZnCl_2$ MICs” with isolates of the CG ($p = 0.005$). None of the zinc chloride MICs was associated with a particular antibiotic-, heavy metal- or biocide- tolerance/resistance phenotype. Isolates expressing the 512 $\mu\text{g/ml}$ MIC were either positive for ARGs conferring resistance to aminoglycosides, tetracycline and sulfamethoxazole-trimethoprim, or harbored no ARGs at all. Moreover, WGSc revealed a ubiquitous presence of zinc homeostasis and – detoxification genes, including *zitB*, *zntA*,

and *pit*. In conclusion, we provide evidence that zinc-rich supplementation of pig feed selects for more zinc tolerant *E. coli*, including isolates harboring ARGs and biocide- and heavy metal tolerance genes – a putative selective advantage considering substances and antibiotics currently used in industrial pork production systems.

Keywords: *Escherichia coli*, zinc, antimicrobial resistance, pig, heavy metal tolerance

INTRODUCTION

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) are commonly associated with post-weaning diarrhea (PWD) in piglets, a disease causing serious losses in the pig industry worldwide (Fairbrother et al., 2005; Rhouma et al., 2017a). Currently, different strategies are utilized to reduce ETEC-associated economic costs in pig farming, including oral colistin sulfate treatment in some regions of the world (Rhouma et al., 2017b), vaccination (Moon and Bunn, 1993; Blázquez et al., 2018) and probiotics (Li et al., 2018; Yan et al., 2018). In addition, high-level dietary zinc oxide supplementation is used against PWD in the pig production sector (Fairbrother et al., 2005; Vahjen et al., 2011; Bednorz et al., 2013; Starke et al., 2014; Pieper et al., 2015; Kloubert et al., 2018).

However, the effects of zinc-rich diets on porcine intestinal bacterial populations, especially *E. coli*, are not fully understood yet. Zinc is the second most abundant transition metal in most phyla and generally considered as essential for life. Together with copper, it is an important trace element required for hormone function, reproduction, vitamin synthesis, enzyme formation and it promotes a strong immune system function (Yu et al., 2017). Both metals are usually added to animal feed in amounts necessary for physiological body function (Yazdankhah et al., 2014; Yu et al., 2017).

As a divalent cation (Zn^{2+}), zinc plays an important role as a catalytic and structural cofactor in virtually all aspects of cell metabolism (Vallee and Auld, 1990). Keeping a balanced intracellular zinc homeostasis is a prerequisite for mammals and most bacterial species (Nies and Grass, 2009). Therefore, zinc quantities within cells are highly regulated, as zinc deprivation hinders bacterial growth, while an excess of zinc could be toxic (Giella and DiRita, 2012). Factors reported to increase zinc tolerance levels in *E. coli* described so far include the cation diffusion facilitator (CDF) ZitB, the P_{1b} -type ATPase ZntA and the low-affinity inorganic phosphate transporter Pit (Beard et al., 2000; Grass et al., 2005; Deus et al., 2017; Hoegler and Hecht, 2018).

So far, an increased tolerance toward (trace) metals, including zinc, is clearly linked to genes conferring antibiotic resistance in different bacterial species (Cavaco et al., 2011; Agga et al., 2014; Medardus et al., 2014; Becerra-Castro et al., 2015; Song et al., 2017; van Alen et al., 2018), possibly indicating a worrisome co-selective effect of zinc oxide mass utilization (Seiler and Berendonk, 2012; Bednorz et al., 2013; Yazdankhah et al., 2014; Ciesinski et al., 2018). Consequently, the current anthropogenic contamination of the environment with heavy metals is regarded as a serious problem (Seiler and Berendonk, 2012).

In *E. coli*, an extensive, finely tuned network of efflux pumps, ligands and transcription factors is involved in intracellular osmoadaptation and heavy metal detoxification, also warranting maintenance of cellular zinc homeostasis (Hantke, 2005; Nies and Grass, 2009; Porcheron et al., 2013; Watly et al., 2016). Recent studies revealed that zinc tolerance levels differ not only between bacterial species but also within particular species, including *E. coli* of human and avian origin (Deus et al., 2017; Stocks et al., 2019).

The aim of this work is to study the effects of zinc-rich diets on a representatively selected collection of intestinal *E. coli* obtained from post-weaning piglets, considering a putative association of a nutritive zinc oxide excess and (i) phenotypic zinc tolerance levels, (ii) antibiotic- and biocide susceptibility profiles, and (iii) genes involved in antimicrobial resistance, zinc (heavy metal)- and biocide tolerance.

MATERIALS AND METHODS

Sample Size and Isolate Selection

The representative set of *E. coli* isolates investigated here was selected based on a previous feeding trial (Ciesinski et al., 2018) carried out in accordance with the principles of the Basel Declaration following the institutional and national guidelines for the care and use of animals. The protocol was approved by the local state office of occupational health and technical safety “Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin” (LaGeSo Reg. Nr. 0296/13) as described before (Ciesinski et al., 2018).

Briefly, 32 landrace piglets weaned at day 25 ± 1 were separated in two groups for 4 weeks: the first group of piglets, denoted here as the high-zinc group (HZG) was fed with a diet supplemented with a comparatively high amount of zinc oxide (2,103 mg zinc/kg diet), while the second group served as control. This control group (CG) received a common piglet diet containing a physiologic concentration of zinc oxide (72 mg zinc/kg diet) to avoid trace metal malnutrition (Ciesinski et al., 2018). The trial started with 32 piglets, which were sacrificed mid-trial (38 ± 2 days, $n = 16$) and at the end (52 ± 2 days, $n = 16$).

Here we focus on *E. coli* obtained from samples of pigs sacrificed at the end ($n = 16$; 52 ± 2 days) of the feeding trial only. Altogether, 817 *E. coli* collected from the feces, digesta- and mucosa samples obtained from these final 16 pigs were stored in glycerol stocks at -80° (Ciesinski et al., 2018). Using meta data such as sampling site, feeding group and evaluation of growth on plates containing different antibiotics which were available for all the 817 *E. coli* obtained from this initial approach

(Ciesinski et al., 2018) we selected a stratified random sample comprising 179 isolates (Table 1 and Supplementary Table S1).

Phenotype Characterization of Porcine *E. coli*

A broth microdilution assay was carried out for biocides and heavy metal salts using microtiter-plates (Merlin, Bornheim-Hersel, Germany) as described before (Deus et al., 2017) including alkyl diaminoethyl glycin hydrochloride [ADH], benzethonium chloride [BEN], benzalkonium chloride [BKC], guanidine chlorhexidine [CHX], acridine compound acriflavine [ACR], copper sulfate [COP], silver nitrate [SIL] and zinc chloride [ZKC]. *E. coli* strains ATCC25922 and ATCC10536 were used for internal quality control. In addition, *E. coli* strain RKI6122 was used as a reference for growth in the presence of 1024 µg ZnCl₂/ml (Deus et al., 2017).

Antimicrobial susceptibility testing (AST) using the VITEK® 2 system (BioMérieux, Germany; AST card GN38) was performed including amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, cephalixin, chloramphenicol, enrofloxacin, gentamicin, marbofloxacin, piperacillin, tetracycline, tobramycin and trimethoprim/sulfamethoxazole according to the standards given by the CLSI VET01-A4 and M100-S21 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012, 2013).

Molecular Characterization of *E. coli*

Hundred and seventy nine *E. coli* were sequenced using Illumina MiSeq® 300 bp paired-end whole genome sequencing (WGS) with an obtained coverage of >90X. Plasmid DNA of *E. coli* RKI3099, an isolate representing a frequently occurring genomic background associated with increased zinc tolerance together with antimicrobial resistance (Supplementary Table S1), was isolated using Qiagen Plasmid Mini Kit according to manufacturer's instructions. The purified plasmid DNA was sequenced using the Pacific Biosciences RS II platform with the P6C4 chemistry in a single flowcell. Pacific Biosciences

sequencing was completed by generating a sequencing library from 5 to 20 kb using standard methods. PacBio raw data and the Illumina short reads were hybrid assembled using unicycler v4.4 (Wick et al., 2017). Adapter-trimmed reads were used for *de novo* assembly into contiguous sequences (contigs) and subsequently into scaffolds using SPAdes v3.11. All draft genomes were annotated using Prokka (Seemann, 2014).

In previous studies, factors have been described as being capable to confer elevated zinc tolerance levels in *E. coli* (Grass et al., 2005; Deus et al., 2017; Vidhyaparkavi et al., 2017; Stocks et al., 2019). Consequently, we analyzed the presence or absence of a broad set of genes involved in zinc homeostasis ($n = 35$) including zinc-binding metalloenzymes ($n = 69$) (Supplementary Table S2).

Since co-selection of antibiotic- and metal resistance is an issue of utmost importance and metal resistance genes are often co-located on mobile genetic elements (MGEs) alongside antibiotic resistance genes (ARGs) (Baker-Austin et al., 2006; Fard et al., 2011; Holzel et al., 2012; Fang et al., 2016; Song et al., 2017; Argudín et al., 2019), we further investigated the occurrence of genes known to be associated with either antibiotic- or metal resistance on mobile genetic elements among our isolate collection (Supplementary Table S1).

Further investigation included screening of 203 genes described by Pal et al. (2013), particularly known to be associated with increased tolerance or even resistance toward different biocides, for example acridine compound acriflavine [ACR], benzalkonium chloride [BKC] and benzethonium chloride [BEN]. The screening procedure included among others *qacE*, its variant *qacE*(Δ1), *qacL*, *sugE*, *ygiW*, *ymgB* (Supplementary Table S3) and further operons known to be involved in heavy metal detoxification (*arsABCD*, *cusABCF*, *merRT*, *pcoABCDE*, *pcoRS*, *silABCEFP*, *silRS*, *terBCDWZ*, *ygiW*) alongside their regulatory genes (Supplementary Table S3).

Consequently, *in silico* whole-genome screening for all these genes associated with antibiotic resistance (ARGs) [$n = 2570$

TABLE 1 | Distribution of *E. coli* among sampling sites, feeding groups, pigs, ZnCl₂ MICs and antibiotic resistance profiles.

Site	Group	Piglets <i>n</i>	<i>E. coli</i> <i>n</i>	ZnCl ₂ MICs (µg/ml)			Antibiotic resistance profiles						
							AMP/ suscep.	SXT	TET	AMP/ PIP	TET/ SXT	AMP/ PIP/ TET	AMP/ PIP/ TET/ SXT
				128	256	512	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
Mucosa	HZG	7	33	1	22	10	18	0	0	0	6	9	0
	CG	8	25	0	25	0	16	0	2	0	1	6	0
Digesta	HZG	8	33	1	17	15	17	0	0	0	8	8	0
	CG	8	25	3	20	2	16	1	1	0	0	3	4
Feces	HZG	8	33	0	24	9	17	0	0	1	6	2	7
	CG	7	30	2	28	0	18	0	0	0	0	9	3

Distribution of 179 *E. coli* isolates among sampling sites, feeding groups, piglets ($n = 16$), zinc chloride tolerance levels and antibiotic resistance profiles. *n*, number; HZG, high zinc fed group; CG, control group; suscep., fully susceptible toward antibiotics tested; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; TET, tetracycline; AMP, ampicillin; PIP, piperacillin.

included variants of ARGs], biocide resistance or heavy metal tolerance was performed using an in-house BLAST-pipeline with the general identity threshold 95% ID and 90% minimum length based on ResFinder 3.1 (Zankari et al., 2012), CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, Jia et al., 2017) and BacMet (Antibacterial Biocide & Metal Resistance Genes Database; Pal et al., 2013).

Whole genome screening data were used for further genotype characterization including determination of multilocus sequence type (ST) using MLSTFinder 2.0 (Larsen et al., 2012), serotype prediction (SerotypeFinder 2.0, Joensen et al., 2015) and occurrence of plasmid incompatibility groups with PlasmidFinder 2.0 with a threshold of 95% ID (Carattoli et al., 2014). A detailed overview on all isolates and characteristics is provided in **Supplementary Table S1**.

Whole genome sequences for all 179 *E. coli* are deposited into NCBI-Genbank and accession numbers are provided in **Supplementary Table S4**.

Statistical Analysis

Data were analyzed using SPSS software version 25.0 (IBM, New York, NY, United States). *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

A linear mixed-model regression approach was used to test whether feeding group and sampling sites (mucosa, digesta and feces) had an effect on *E. coli* ZnCl₂ MICs, with the individual pig as a random factor. The logarithm (basis 2) of ZnCl₂ MIC values was the dependent variable in all analyses. All two-way interactions were included in the models. Non-significant interactions were removed one by one. Variance components were used to determine the proportion of variance that accounted for differences between individual animals. Model diagnostics included visual inspection of residuals for normality and homoscedasticity.

Further, mixed linear regression models were developed to investigate the influence of

- occurrence of resistance toward one or more antibiotic classes (yes or no),
- the MIC levels of acridine compound acriflavine (logarithmic to the basis 2),
- silver nitrate (logarithmic to the basis 2), or
- chlorhexidine (logarithmic to the basis 2), respectively,

on lg₂ ZnCl₂ MIC values including sample origin and feeding group as fixed factors and the individual pig as a random factor.

RESULTS

Zinc Tolerance Levels of Porcine Intestinal *E. coli*

Here we present results based on a stratified random sample comprising 179 *E. coli* (**Supplementary Table S1**) representing different AST phenotypes, three different sampling sites (digesta, mucosa, feces) and two feeding groups (HZG and CG). For this collection three different levels of tolerance toward zinc chloride (ZnCl₂) were detected (**Table 1**). The lowest level of tolerance toward ZnCl₂ (128 μg/ml) was recorded for 2% of the HZG and 6% of the CG isolates, respectively. Sixty four percent of the HZG and 91% of the CG isolates were associated with a ZnCl₂ MIC of 256 μg/ml. Considering the maximum ZnCl₂ MIC of 512 μg/ml exhibited by isolates in this study, a clear difference between isolates belonging to the distinct feeding groups was obvious: while 34% of the *E. coli* from samples of the HZG clustered here, only 3% of those obtained from the CG reached this particular tolerance level as well (**Figure 1**).

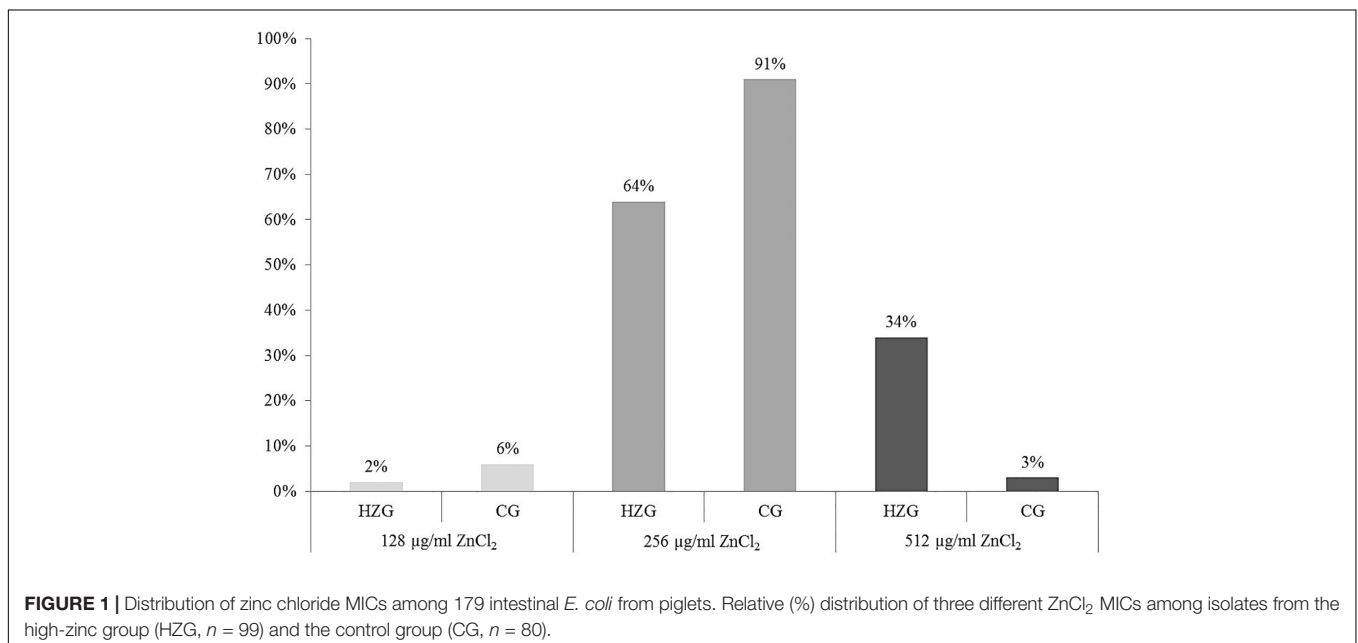


TABLE 2 | Results of mixed linear regression model examining the influence of feeding group and sample site on lg2 ZnCl₂ (dependent factor) for 179 *E. coli* with pig as random variable.

Factor	Regression coefficient	p-value	95% CI
Intercept	8.282	<0.001	8.111–8.453
Mucosa	0.006	0.937	−0.137–0.148
Digesta	0.052	0.358	−0.078–0.202
Feces	0 ^b	0.636 ^a	.
HZG	0 ^b	.	.
CG	−0.332	0.005	−0.552 – (−0.111)

HZG, high zinc group; CG, control group; CI, Confidence interval. ^aGlobal p-value determined for three sampling sites (mucosa, digesta, feces). ^bThis parameter is set to zero because it is redundant. Bold numbers indicate a significant p-value.

Further analysis using a linear mixed regression model taking inter-individual host ($n = 16$ pigs) differences (inter-host variance: 16.7% of total variance) into account revealed a statistically significant association between ZnCl₂ MICs and isolates representing the HZG as well as ZnCl₂ MICs with isolates of the CG ($p = 0.005$) with a regression coefficient of -0.332 (Table 2). Considering *E. coli* from the three sampling sites (mucosa, digesta from *colon ascendence* and feces from the *ampulla recti*), ZnCl₂ MICs lacked significant differences ($p = 0.636$).

Zinc Tolerance, Antibiotic and Biocide Susceptibility Profiles

To answer the question whether a particular level of zinc tolerance is associated with a certain antibiotic resistance phenotype, all *E. coli* were grouped according to their individual resistance profile and zinc tolerance level (Figure 2). Non-susceptibilities detected for the 179 *E. coli* included those to sulfamethoxazole-trimethoprim, tetracycline, ampicillin and piperacillin only (Table 1 and Figure 2). Isolates expressing the “highest” ZnCl₂ MIC (512 μg/ml) showed either a susceptible phenotype toward the panel of antibiotics tested here or yielded non-susceptibility for tetracycline and sulfamethoxazole-trimethoprim. Overall, MICs of antibiotic-resistant (resistance toward one or more antibiotic classes) and susceptible isolates showed no significant difference using mixed linear regression ($p = 0.119$) (Table 3), but drug resistant isolates had slightly higher ZnCl₂ MIC values than susceptible isolates (regression coefficient 0.105). Overall, zinc tolerance levels of *E. coli* investigated in this study lacked a particular association with the occurrence of any antibiotic resistance phenotype concerning the antimicrobial substances included.

Minimum inhibitory concentrations detected for biocides and further inorganic metal compounds showed a unimodal value distribution (Table 4), possibly indicating the lack of a distinct non-wild type *E. coli* subpopulation for any of the substances tested here. The broadest distribution of MICs was recorded for acridine compound acriflavine, silver nitrate and chlorhexidine, comprising four dilution steps each (Table 4).

We have set up mixed linear regression models to investigate a putative association between ZnCl₂ MICs and tolerance levels

toward a specific biocide or inorganic metal. The model including lg2 acridine MICs as an influence factor beside the feeding group and the three sampling sites once again showed a significant association between ZnCl₂ MICs and feeding group ($p = 0.011$), but not with either sampling site ($p = 0.640$) or lg2 acridine MICs ($p = 0.746$) (Supplementary Table 5A).

The silver nitrate model (dependent variable lg2 ZnCl₂ MIC, independent variables lg2 silver nitrate MIC, feeding group and sampling site) also showed a significant association with the feeding group ($p = 0.010$), but not for lg2 silver nitrate ($p = 0.979$) nor the sampling site ($p = 0.643$, Supplementary Table 5B).

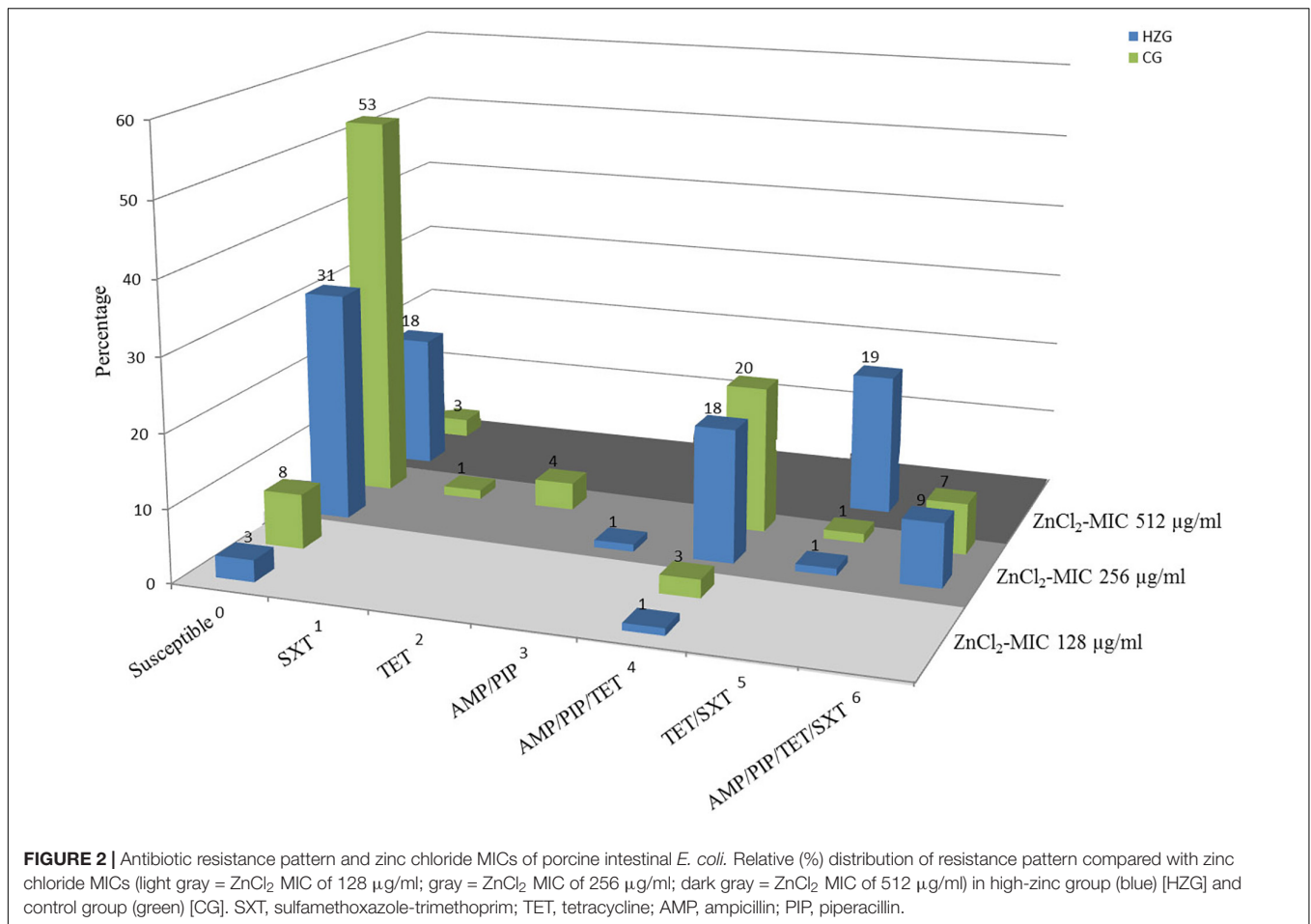
The model build to test the influence of chlorhexidine showed a significant interaction between the feeding group and the lg2 chlorhexidine MICs ($p = 0.047$). While the lg2 ZnCl₂ MICs decreased with increasing lg2 chlorhexidine MICs in the HZG, they increased slightly in the CG with increasing lg2 chlorhexidine MICs. The parameters sampling site ($p = 0.338$) and feeding group ($p = 0.137$) did not have significant effects, but lg2 chlorhexidine MIC ($p = 0.022$) did (Supplementary Table 5C). 15.6% of the variance was due to variance between animals.

Genomic Background and Genes Involved in Zinc Tolerance

Whole genome screening data were used to assign all *E. coli* ST and to predict serotypes among the isolates representing the HZG ($n = 99$) and the CG ($n = 80$). As shown in Figure 2, these 179 isolates representing the two feeding groups were assigned to 15 STs each. Overall, isolates belonging to the sequence type complex (STC) 10 (ST10 and ST34) were most common among the representative isolates of both groups (HZG, 50.5%; CG, 40%).

Considering the corresponding predicted serotypes, *E. coli* O62:H30 (ST34) was common in the representative samples of both feeding groups (20% [HZG]/19% [CG]), followed by the ST10 O88:H12 (9% [HZG]/7% [CG]) (Figure 2). In addition, most *E. coli* representing both feeding groups (141 of 179) showed a ZnCl₂ MIC of 256 μg/ml. These isolates were assigned to 17 STs and 27 serotypes. The isolates with ZnCl₂ MIC 128 μg/ml belonged to three different STs (4 serotypes) and the ZnCl₂ MIC of 512 μg/ml included isolates of seven STs and seven corresponding serotypes (Figure 3). Both groups of *E. coli* representing the two different feeding groups included predicted serotypes which were unique to it, for instance CG isolates belonging to O92:H2 and O157:H43 or O89:H38 and O182:H19 in the HZG (Figure 3).

In particular factors have been described as being capable to confer elevated zinc tolerance levels in *E. coli* (Grass et al., 2005; Deus et al., 2017; Vidhyaparkavi et al., 2017; Stocks et al., 2019). Consequently, we analyzed the presence or absence of a broad set of genes involved in zinc homeostasis ($n = 35$) (Table 5) including zinc-binding metalloenzymes ($n = 69$) (Supplementary Table S2). All 179 isolates harbored genes associated with zinc detoxification such as *zitB*, *zntA* and *pit* (Table 5). Also, factors involved in zinc uptake like ZupT (metal uptake protein, preference for zinc), the ABC



transporter ZnuABC and major regulators such as Zur were identified in each of the genomes. Only the Rac-prophage zinc-binding chaperone protein YdaE (Blindauer et al., 2002) and the Zn(II)-responsive ribosomal proteins YkgM (Hensley et al., 2012) was not ubiquitously distributed among isolates of the three distinct ZnCl₂ MICs (Table 5). In addition, almost all genomes were found positive for genes encoding zinc-binding metalloenzymes involved in a highly diverse net of cell functions (Supplementary Table S2). A detailed overview on gene presence or absence, query protein coverage and number of predicted protein variants for these 104 factors investigated here is provided in Table 5 and Supplementary Table S2. Accordingly, sheer presence or absence of particular factors or even a particular amino acid sequence variant does not explain the different levels of zinc tolerance among the analyzed *E. coli* population.

Antibiotic Resistance – Biocide – And Heavy Metal Tolerance Genes

In total, 87/179 *E. coli* comprising isolates of both feeding groups and each zinc tolerance level lack ARGs, which is in strict concordance with their resistance phenotype (Figure 2 and Table 6). However, genes known to confer antibiotic resistance

have been identified on MGEs within the isolate collection. While the ZnCl₂ MIC 128 µg/ml is associated with the occurrence of 0–4 ARGs and three STs, the ZnCl₂ MIC 256 µg/ml shows a range from 0 to 7 ARGs and ZnCl₂ MIC 512 µg/ml harbors either 0 or 5 ARGs (Supplementary Table S1).

TABLE 3 | Results of mixed linear regression model examining the influence of antimicrobial resistance, feeding group and sampling site on lg2 ZnCl₂ MIC (dependent factor) for 179 *E. coli* with pig as random variable.

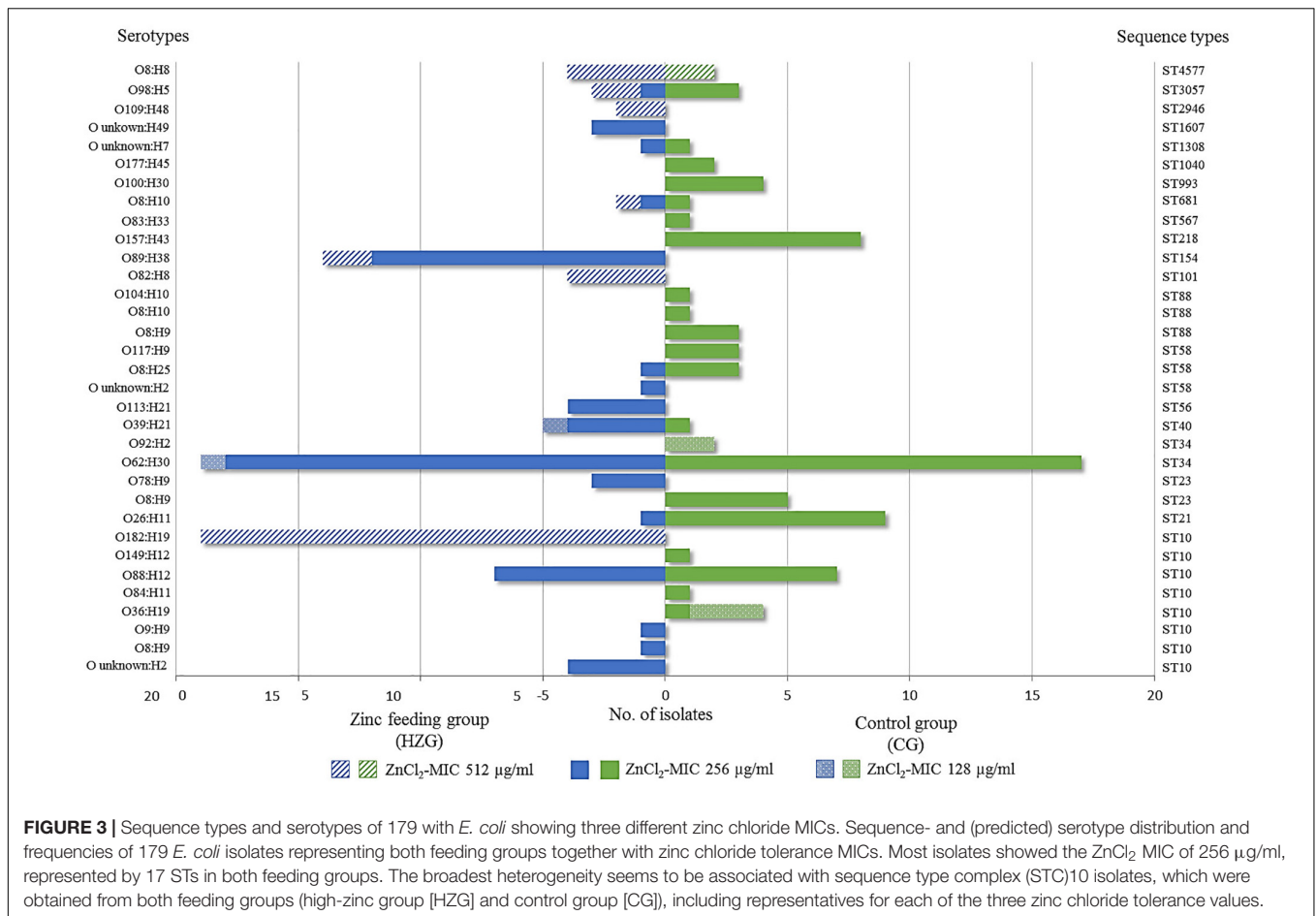
Factor	Regression coefficient	p-value	95% CI
Intercept	8.343	<0.001	8.156–8.530
Mucosa	0.007	0.926	–0.135–0.149
Digesta	0.064	0.365	–0.075–0.203
Feces	0 ^b	0.631 ^a	.
HZG	0 ^b	.	.
CG	–0.327	0.006	–0.548–(–0.106)
Susceptible	–0.105	0.119	–0.236–0.027
Resistant	0 ^b	.	.

HZG, high zinc group; CG, control group; CI, Confidence interval. ^aGlobal p-value determined for the three sampling sites. ^bThis parameter is set to zero because it is redundant. Bold numbers indicate a significant p-value.

TABLE 4 | Distribution of biocide- and heavy metal MICs among 179 porcine commensal *E. coli*.

Substance	Feeding group	MICs ($\mu\text{g/ml}$)																	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
		0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096			8192
ZKC	HZG							0	0	0	0	0	2	63	34	0	0	0	0	256	512
	CG							0	0	0	0	0	5	73	2	0	0	0	0	256	256
CHX	HZG	0	0	0	74	20	5	0	0	0	0	0	0						0.5	1	
	CG	0	0	0	50	22	7	1	0	0	0	0	0						0.5	1	
BKC	HZG						0	0	73	26	0	0	0	0					8	16	
	CG						0	3	59	18	0	0	0	0					8	16	
ACR	HZG					0	0	10	64	25	0	0	0						16	32	
	CG					0	0	19	52	9	0	0	0						16	32	
SIL	HZG				0	18	76	4	1	0	0	0							2	2	
	CG				0	11	68	1	0	0	0	0							2	2	
BEN	HZG					0	0	0	1	98	0	0	0	0					16	16	
	CG					0	0	0	1	79	0	0	0	0					16	16	
COP	HZG										0	1	0	0	0	98	0	0	0	1024	1024
	CG										0	0	0	0	1	79	0	0	0	1024	1024
ADH	HZG	0	0	98	1	0	0	0	0	0									0.25	0.25	
	CG	0	0	79	1	0	0	0	0	0									0.25	0.25	

MIC value ranges for different biocides and heavy metals in $\mu\text{g/ml}$. Distribution is shown for isolates representing both feeding groups (HZG, high zinc group; CG, control group). ACR, acridine compound acriflavine; ADH, alkyl diaminoethyl glycin hydrochloride; BKC, benzalkonium chloride; BEN, benzethonium chloride; CHX, chlorhexidine; COP, copper sulfate; SIL, silver nitrate; ZKC, zinc chloride. MIC₅₀ represents the MIC value at which $\geq 50\%$ of the isolates in a test population are inhibited, MIC₉₀ the MIC value at which $\geq 90\%$ of the isolates within a test population are inhibited (Turnidge et al., 2006). MICs not included in the range tested are shaded in gray.



Seven isolates expressing a ZnCl₂ MIC of 128 µg/ml belonged to ST10 O36:H19 ($n = 3$), ST34 O62:H30 ($n = 1$), O92:H2 ($n = 2$), and ST40 O39:H21 ($n = 1$). ARGs conferring resistance to aminoglycosides, beta-lactams and tetracycline (*aadA1*, *bla*_{TEM-1b}, *strA*, *strB*, and *tetB*) were solely associated with both serotypes belonging to ST34.

Sixty nine of 136 *E. coli* with the 256 µg/ml ZnCl₂ MIC harbored a different ARG combinations, e.g., isolates belonging to ST56 O113:H21 ($n = 4$) were positive for *aadA1* and *sul1* and ST993 O100:H30 ($n = 4$) isolates harbored *tetB*. ST10 O88:H12 ($n = 13$) harbored *aadA1*, *dfrA1*, *bla*_{TEM-1b}, *strA*, *strB*, *sul3*, and *tetA*.

Considering the 36 isolates with the 512 µg/ml ZnCl₂ MIC, ARGs (*aadA1*, *dfrA1*, *sul1*, *sul3* and *tetA*) conferring resistance to aminoglycosides, trimethoprim, sulfonamides and tetracycline were exclusively associated with 19 isolates belonging to ST10 O182:H19. The remaining 17 isolates completely lack ARGs and belong to six different STs (101, 154, 681, 2946, 3057, 4577) (Supplementary Table S1). WGS indicated the presence of more than one plasmid harboring the 5 ARGs and further genes conferring tolerance toward biocides and heavy metals (Figure 4) among the ST10 O182:H19 isolates. Subsequently, PacBio sequencing was employed to further investigate the

composition of these structures extracted from a representative isolate (RKI3099).

As a result, two novel plasmids (Figure 4) with a size of 115 kb (pRKI3099a; accession number MN124285) and 102 kb (pRKI3099b; accession number MN124286) were identified. Both plasmids carry class I integron variants characterized by integrase *IntI1*, and either a disrupted form of the biocide resistance gene *qacE* (*qacEΔ1*) (Paulsen et al., 1996) or the biocide resistance gene *qacL*, as well as the sulfonamide resistance genes *sul1* (RKI3099b) or *sul3* (pRKI3099a). The plasmid pRKI3099a is a IncFII-type plasmid that also carries the tetracycline resistance gene *tetA* and the nearly 40 kb transfer operon (*tra*) which is essential for F-plasmid transfer (Frost et al., 1994). The IncFIB plasmid RKI3099b harbors the mercury resistance operon *merRTPCDAB*, diverse insertion sequences and a *hly-operon* disrupted by IS91. Additionally, both plasmids include typical plasmid partitioning genes such as toxin-antitoxin systems (e.g., *vapB/C* and *hicA/B*) and further mobile element related genes (Figure 4).

Taken together, the occurrence of certain ARGs is more associated with the genomic background and serotype of the *E. coli* investigated here than with a particular zinc tolerance level or feeding group. Consequently, we decided

TABLE 5 | Screening results of factors involved in zinc homeostasis for 179 porcine commensal *E. coli*.

Function	Symbol	Gene	Distribution			Protein				REF
			ZnCl ₂ -MICs (μg/ml)			L AA	AV n	C %	I %	
			128 n = 7 ^a %	256 n = 136 ^a %	512 n = 36 ^a %					
Zinc uptake										
Metal binding protein	ZinT	<i>zinT</i>	100	100	100	216	14	100	98.4	[1]
Zn-binding protein (ABC)	ZnuA	<i>znuA</i>	100	100	100	311	11	100	98.4	[2]
Integral subunit (ABC)	ZnuB	<i>znuB</i>	100	100	100	252	11	100	98.5	[2]
ATPase subunit (ABC)	ZnuC	<i>znuC</i>	100	100	100	261	5	100	99.0	[2]
Zn ²⁺ uptake transporter	ZupT	<i>zupT</i>	100	100	100	257	2	100	99.6	[3]
Zn ²⁺ uptake regulator	Zur	<i>zur</i>	100	100	100	172	10	100	96.4	[4]
Ammonia channel	AmtB	<i>amtB</i>	100	100	100	428	5	100	99.9	[5]
Put. arylsulfatase	AslA	<i>aslA</i>	100	100	100	552	11	100	98.5	[6]
OM channel	OmpC	<i>ompC</i>	100	100	100	368	10	100	90.8	[5]
Put. protein	YdfE	<i>ydfE</i>	100	100	100	255	19	100	96.1	[6]
Efflux protein (cysteine)	EamB	<i>eamB</i>	100	100	100	195	10	100	98.7	[5]
Efflux										
AMG efflux pump	AcrD	<i>acrD</i>	100	100	100	1037	15	100	99.8	[7]
MDR transporter	MdtA	<i>mdtA</i>	100	100	100	415	20	100	99.2	[7]
MDR transporter	MdtB	<i>mdtB</i>	100	100	100	1040	24	100	98.1	[7]
MDR transporter	MdtC	<i>mdtC</i>	100	100	100	1025	24	100	98.0	[7]
MDR transporter	MdtD	<i>mdtD</i>	100	100	100	471	20	100	98.4	[7]
Ferrous-iron efflux pump	FieF	<i>yijp</i>	100	100	100	300	4	100	99.7	[8]
Metal transporter	ZitB	<i>zitB</i>	100	100	100	314	10	100	99.6	[9]
P1b-type ATPase	ZntA	<i>zntA</i>	100	100	100	732	13	100	97.4	[7]
Histidine-protein kinase	BaeS	<i>baeS</i>	100	100	100	467	10	100	94.3	[7]
Transcriptional regulator	BaeR	<i>baeR</i>	100	100	100	240	10	100	99.3	[7]
Transcriptional regulator	SoxS	<i>soxS</i>	100	100	100	108	8	100	99.5	[10]
Transcriptional activator	SoxR	<i>soxR</i>	100	100	100	154	8	100	99.5	[10]
Transcriptional regulator	ZntR	<i>zntR</i>	100	100	100	142	12	100	98.9	[11]
Transglycosylase E	EmtA	<i>emtA</i>	100	100	100	203	4	100	99.7	[6]
Formate dehydrogenase	FdnG	<i>fdnG</i>	100	100	100	1016	9	100	99.5	[6]
Put. Zn ²⁺ protease	PqqL	<i>pqqL</i>	100	100	100	932	10	100	98.1	[12]
GTP cyclohydrolase II	RibA	<i>ribA</i>	100	100	100	197	7	100	99.8	[6]
Periplasmic chaperone	Spy	<i>spy</i>	100	100	100	159	9	100	99.7	[5]
Put. Zn ²⁺ chaperone	YdaE	<i>ydaE</i>	42.9	16.2	52.8	57	3	100	85.0	[5]
Zn ²⁺ -stimulated GTPase	YeiR	<i>yeiR</i>	100	100	100	328	6	100	99.4	[13]
50S ribosomal protein	YkgM	<i>ykgM</i>	57.1	99.3	100	88	8	100	98.4	[14]
Zn ²⁺ resistance as. protein	ZraP	<i>zraP</i>	100	100	100	142	11	100	98.0	[5]
Transcriptional regulator	ZraR	<i>zraR</i>	100	100	100	441	17	100	99.2	[15]
Sensor protein	ZraS	<i>zraS</i>	100	100	100	441	15	100	98.5	[15]

All 179 porcine commensal *E. coli* were screened with respect to the presence or absence of 35 factors involved in zinc homeostasis as described before. Predicted amino acid sequence lengths were compared to those of *E. coli* K-12 MG1655 in order to check for putative premature stop codons or deletions affecting the putative function of the protein. None of the amino acid sequence variations (AV) was solely associated with a particular ZnCl₂ MIC. Amino acid sequence variation among the isolate collection primarily reflects the isolate's genetic backgrounds. Put., putative; OM, outer membrane; MDR, multidrug resistance; AMG, aminoglycoside; as., associated; n, number of isolates; ^a, number of isolates with particular ZnCl₂ MIC; L, length; AA, amino acid sequence; AV, number of amino acid sequence variants; C, amino acid sequence coverage with respect to reference protein in *E. coli* K-12 MG1655; I, maximum amino acid sequence identity among the 179 isolates; REF, references. [1] Colaço et al., 2016; [2] Yatsunyk et al., 2008; [3] Grass et al., 2005; [4] Choi et al., 2017; [5] Lee et al., 2005; [6] Graham et al., 2009; [7] Wang and Fierke, 2013; [8] Lu et al., 2009; [9] Watly et al., 2016; [10] Warner and Levy, 2012; [11] Wang et al., 2012; [12] Subashchandrabose et al., 2013; [13] Blaby-Haas et al., 2012; [14] Hensley et al., 2012; [15] Petit-Hartlein et al., 2015.

to abstain from further statistic calculation for individual resistance genes clearly mirroring frequencies of certain genomic lineages only.

Genes known to confer resistance/tolerance toward biocides and heavy metals located on plasmids seem to have a strong association ($p \leq 0.05$) with isolates of the HZG,

TABLE 6 | Antibiotic resistance genes (ARGs).

Factor	Symbol	Gene	Distribution			Protein				REF
			ZnCl ₂ -MICs (μg/ml)			L	AV	C	I	
			128 <i>n</i> = 7 ^a %	256 <i>n</i> = 136 ^a %	512 <i>n</i> = 36 ^a %					
Streptomycin 3''-adenyltransferase	AadA1	<i>aadA1</i>	28.6	18.4	52.8	263	2	100	99.2	[1]
Aph(3'')-Ib PT	APH(3'')-Ib	<i>strA</i>	14.3	38.2	0	267	2	100	99.9	[2]
Aph(6)-Id PT	APH(6)-Id	<i>strB</i>	14.3	38.2	0	287	1	100	100	[2]
Tetracycline resistance protein	Tet(A)	<i>tet(A)</i>	0	11.0	52.8	399	2	100	99.9	[3]
Tetracycline resistance protein	Tet(B)	<i>tet(B)</i>	14.3	29.4	0	401	1	100	99.9	[4]
Macrolide 2'-PT II	MPH(2')-II	<i>mph(B)</i>	0	2.2	0	302	1	100	100	[5]
β-lactamases	BlaTEM-1b	<i>blaTEM-1b</i>	0	30.9	0	286	1	100	98.6	[6]
Dehydrofolate reductase	DfrA1	<i>dfrA1</i>	0	11.8	52.8	157	2	100	99.9	[7]
Dihydropteroate synthase-type 1	DHPS-1	<i>sul1</i>	0	8.1	52.8	279	2	100	99.9	[8]
Dihydropteroate synthase-type 2	DHPS-2	<i>sul2</i>	0	0.7	0	271	1	100	99.4	[8]
Dihydropteroate synthase-type 3	DHPS-3	<i>sul3</i>	0	9.6	52.8	263	1	100	99.9	[8]

Whole genome sequencing data of 179 porcine commensal *E. coli* were screened with respect to antibiotic resistance genes (ARGs). Predicted amino acid sequence lengths were compared to those of the ResFinder 3.1 data base (Zankari et al., 2012) in order to check for putative premature stop codons or deletions affecting the putative function of the protein. None of the amino acid sequence variations (AV) was solely associated with a particular ZnCl₂ MIC. Isolates with the 512 μg/ml ZnCl₂ MIC which were positive for plasmid-associated ARGs exclusively belonged to ST10 O182:H19 (Figure 4). *n*, number of isolates; ^a, number of isolates with particular ZnCl₂ MIC; L, length; AA, amino acid; AV, number of amino acid sequence variants; C, amino acid sequence coverage with respect to ResFinder 3.1 data base (Zankari et al., 2012); I, maximum amino acid sequence identity among the 179 isolates; REF, references. [1] Hollingshead and Vapnek, 1985; [2] Scholz et al., 1989; [3] Aldema et al., 1996; [4] Roberts, 2005; [5] Pawlowski et al., 2018; [6] Salverda et al., 2010; [7] Sköld, 2001; [8] Antunes et al., 2005.

comprising different STs and serotypes (Supplementary Table S1). However, considering the ZnCl₂ MIC of 512 μg/ml within the HZG, only isolates belonging to ST10 O182:H19 carried the above mentioned plasmids harboring biocide resistance (e.g., quaternary ammonium compound efflux transporters encoded by *qacL* or *qacEΔ1*) and heavy metal tolerance genes (e.g., mercury resistance operon *merRTPCDAB*) alongside further ARGs (Figure 4).

DISCUSSION

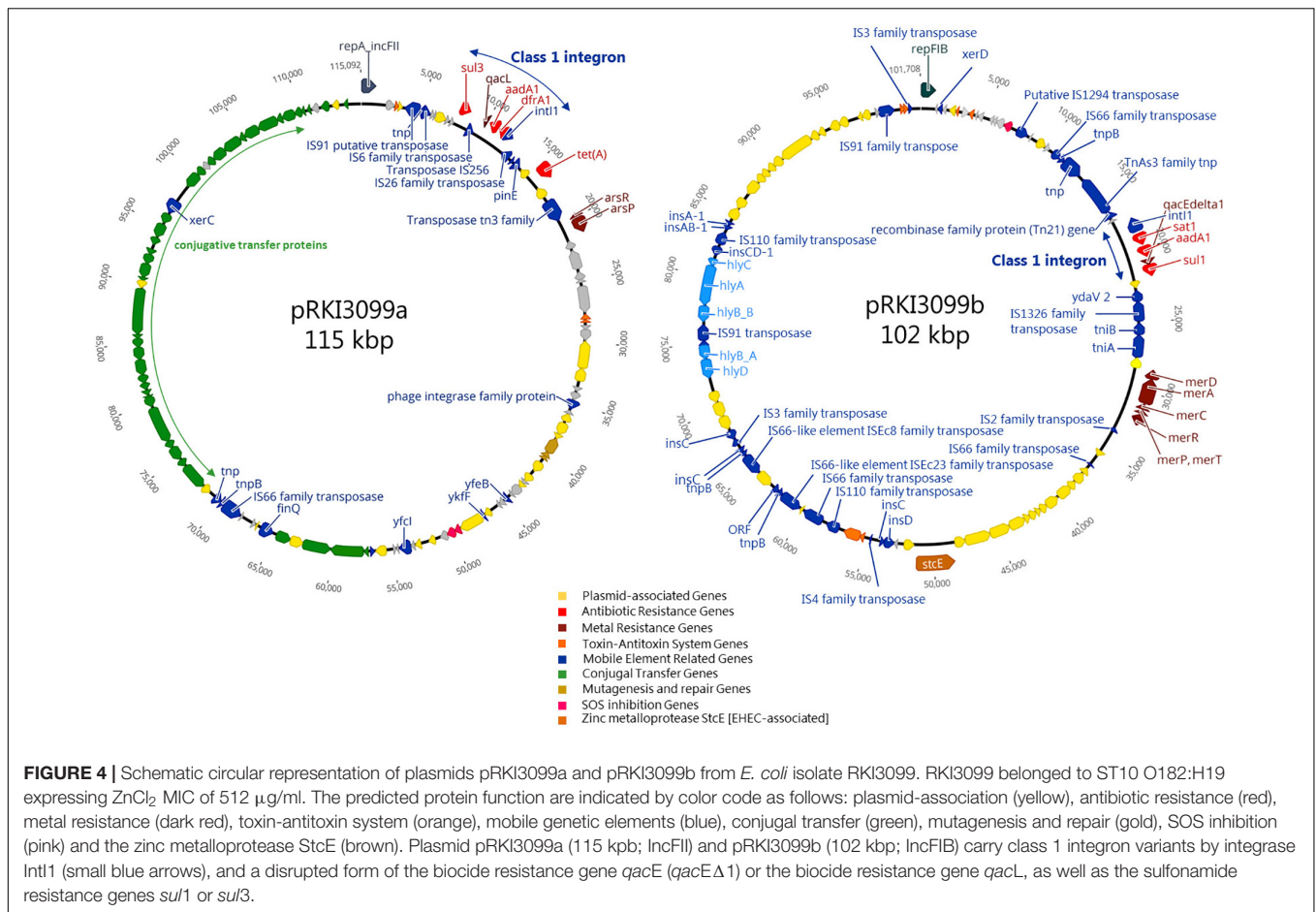
Former studies revealed an increase in antibiotic resistance among *E. coli* (Holzel et al., 2012; Bednorz et al., 2013) and other bacteria (Aarestrup et al., 2010; Cavaco et al., 2010) obtained from pig manure which were previously exposed to high zinc supplemented diets. Although a general correlation between heavy metal – and antibiotic resistance seems to exist (Pal et al., 2015; Yu et al., 2017), so far only a few factors conferring heavy metal resistance in different bacterial species have been identified, mostly located alongside ARGs on mobile genetic elements such as insertion sequences and composite transposons (Rice and Carias, 1998), unit transposons (Rubens et al., 1979; Liebert et al., 1999), gene cassettes and integrons (Kholodii et al., 2003; Petrova et al., 2011) and plasmids (Carattoli, 2013; Fernandez-Lopez et al., 2016). A prominent example might be the zinc-resistance factor Crz identified on the staphylococcal chromosomal cassette conferring methicillin resistance (SCC*mec* type V) in *S. aureus* from livestock (Cavaco et al., 2011).

Zinc Tolerance Levels, Antibiotic- and Biocide Susceptibility of Porcine Intestinal *E. coli*

Here we report about phenotypic and genotypic characteristics of 179 *E. coli* selected from a collection obtained from piglets fed with either a zinc-rich diet (*n* = 8) or a common piglet diet (*n* = 8). Considering the ZnCl₂ MICs in this study, our isolate collection seems to reflect the naturally occurring unimodal distribution of zinc tolerance levels most likely lacking non-wildtype phenotypes, as previously reported for *E. coli* of avian and human origin (Deus et al., 2017). So far, an association between a ZnCl₂ MIC and a particular antibiotic resistance phenotype has not been detected.

Nonetheless, the linear mixed regression model revealed a statistically significant association between “higher” ZnCl₂ MICs and isolates representing the HZG as well as “lower ZnCl₂ MICs” with isolates of the CG (*p* = 0.005), indicating a selective advantage of distinct commensal *E. coli* lineages in the presence of high amounts of zinc in the piglets’ diet. One exception is *E. coli* belonging to ST4577 (O8:H8). This genotype shows a 512 μg/ml zinc MIC, and while it occurs in samples from both feeding groups, it is nonetheless only rarely found among CG isolates (2.5%) (Figure 3).

A recent study showed that zinc inhibits virulence expression of diarrheagenic *E. coli* by inducing the bacterial envelope stress response while inhibiting the SOS response (Bunnell et al., 2017). Moreover, zinc salts were found to be capable of reducing SOS-induced hypermutation through error-prone polymerases in the presence of antibiotics (Bunnell et al., 2017).



Consequently, isolates exhibiting comparatively higher levels of zinc tolerance might reflect a more inert SOS-system activation, gaining a selective advantage by preventing early SOS-induced hypermutation, even at sub-inhibitory concentrations of antibiotics. Clearly, further studies on that particular subject are needed, as our comprehensive *in silico* analysis did not give any explanation about which mechanism might be responsible for the variety of zinc tolerance measured.

The distribution of MICs obtained for further heavy metals and different biocides suggested the lack of a non-wild type population among the isolate collection, as assumed before (Deus et al., 2017). The mixed linear regression model set-up for lg2 chlorhexidine MICs indicated a putative association of lg2 chlorhexidine MICs and lg2 ZnCl₂ MICs in the different feeding groups. However, the complex nature of interactions between biocides and heavy metals and their possible effects on bacterial populations needs to be further investigated.

Genomic Background and Genes Involved in Zinc (Heavy Metal)- and Biocide Tolerance

Escherichia coli belonging to the STC10 (ST10 and ST34) were most common among the isolates of both groups (HZG, 50.5%; CG, 40%). This finding is in accordance with a recent study

which summarizes that in Germany, Denmark, Ireland, and Spain STC10 is the dominant genomic lineage among commensal *E. coli* from pigs (Cortés et al., 2010; Bednorz et al., 2013; Herrero-Fresno et al., 2015; Wang et al., 2016; Ahmed et al., 2017) and reported this lineage as being predominant among intestinal *E. coli* from Australian pigs' as well (Reid et al., 2017). Moreover, *E. coli* belonging to STC10 have been characterized as opportunistic, frequently associated with multidrug resistance and widely distributed among a broad host range (Alcalá et al., 2016; Cordoni et al., 2016; Guenther et al., 2017).

Based on former studies, several genes have been emphasized with respect to their capability to confer increased zinc tolerance or even -resistance in *E. coli*. In this context, the P1b-type ATPase ZntA and the CDF ZitB have been frequently nominated (Hantke, 2005; Ding et al., 2012; Porcheron et al., 2013; Watly et al., 2016; Deus et al., 2017; Ojer-Usoz et al., 2017). In addition, the protein ZraP associated with zinc-resistance, the transcriptional regulatory protein ZraR (synonym: HydG), the serine acetyltransferase CysE and the low-affinity inorganic phosphate transporter PitA have been linked to zinc tolerance (Casewell et al., 2003; Hoegler and Hecht, 2018; Stocks et al., 2019). We were able to provide evidence that genes encoding these and many other factors involved in bacterial zinc hemostasis were present in almost all 179 isolates investigated, indicating that the sheer presence of these factors or even certain

combinations do not confer zinc tolerance MICs deviating from the unimodal distribution.

As was described for ZupT, point mutations are able to change the kinetics of metal uptake systems toward an increase zinc tolerance (Taudte and Grass, 2010). However, isolates investigated here lack any ZupT amino acid sequence variation (Table 5). Considering the predicted amino acid variations of other zinc-associated proteins, differences seem to be lineage-specific and lack particular associations with the distinct zinc MICs (Table 5).

Accumulations of metals such as copper and zinc have also been linked to antibiotic resistance development in environmental bacteria, as thoroughly reviewed by Poole (2017). However, molecular mechanisms responsible for the presence as well as absence of heavy metal-, antibiotic-, and biocide co-resistances are not fully understood yet (Yu et al., 2017). A putative effect of overexpressing non-specific efflux pumps conferring phenotypic resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, as described for *Listeria monocytogenes* (Mata et al., 2000) to the phenotypes reported here cannot be ruled out completely. Therefore, studying the transcriptomic response of distinct genomic lineages with respect to different ZnCl₂ MICs might reveal the most relevant factors explaining our results. However, for each of the antibiotic resistance phenotypes detected in our isolates at least one corresponding ARG was identified (Supplementary Table S1), clearly reasoning against a primary role of any non-specific efflux pumps.

In the past, there has been an extensive and substantial discussion about fitness cost(s) of ARGs for bacteria, especially *E. coli* (Melnyk et al., 2015), which is beyond the scope of this project. However, the ZnCl₂ MIC 512 µg/ml value is associated with either ST10 O182:H19 and the ARGs *aadA1*, *dfrA1*, *sul1*, *sul3*, and *tetA* (Figure 4) conferring resistance to aminoglycosides, trimethoprim, sulfonamides and tetracycline or no ARG at all (6 STs; 6 serotypes) (Supplementary Table S1 and Figure 2). Notably, most of these ARGs in ST10 O182:H19 are associated with class I integrons, which are commonly regarded as “low-cost structures,” known to promote selection while confronted with sub-inhibitory antibiotic concentrations (Lacotte et al., 2017). Thus, picturing a co-selective pressure above the minimal selective pressure induced by zinc excess together with any of the antibiotics mentioned, a clear selective advantage, even if associated with cost(s), seems reasonable for this serotype, as it was discussed for appearance and elimination of resistance genes before (Yu et al., 2017). Moreover, a former study from Australia revealed commensal *E. coli* from pigs as a reservoir for class I integrons, frequently associated with three or more ARGs as well as genes conferring heavy metal tolerance (Reid et al., 2017). As proposed, biocides may promote dissemination of mobile genetic elements and hence resistance genes (Gillings et al., 2008). Moreover, biocides may have driven the fixation and spread of class I integrons, responsible for a major part of antibiotic resistance (Gillings et al., 2008).

Almost all 179 *E. coli* described here harbored the chromosomally encoded AcrAB-TolC-system which is known

to decrease susceptibility toward a wide variety of antibiotics and biocides including acriflavine (Buffet-Bataillon et al., 2012). While detoxification by overexpression of AcrAB-TolC and other efflux pumps (e.g., MdtEF-TolC) has been reported before (Novoa and Conroy-Ben, 2019), this study aimed to evaluate the genes whose presence were described as responsible or involved in increasing bacterial zinc tolerance (Table 5), an assumption we have clearly rejected. Nonetheless, regulatory proteins such as SoxS for AcrAB are sensitive for oxidative stress (Harrison et al., 2009) induced by different metal ions, subsequently leading to an increased expression of the corresponding efflux system while mediating tolerance toward a broad range of antibiotics (Seiler and Berendonk, 2012). Consequently, further research on differences in transcription patterns during zinc-induced stress might reveal the factors essential for increased zinc tolerance in particular *E. coli* lineages.

CONCLUSION

Using comprehensive phenotypical and *in silico* analyses, this study sheds light on the effects of high-zinc oxide diets on intestinal *E. coli* populations in weaned piglets: An association of the isolates' ZnCl₂ MIC with the feeding group was obvious, while neither the presence nor the rare absence of a specific gene or gene combination involved in cellular zinc homeostasis could be identified to be associated with a particular degree of zinc tolerance. Thus, a simple model of co-selection does not account for the different levels of zinc tolerance reported here.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study can be found in the NCBI database. A full list for all 179 entries is provided in Supplementary Table S4.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LW, AL-B, and AB designed the project. VJ and BW conceived and designed the experiments. IE sequenced the isolates. VJ performed the laboratory analysis. VJ, BW, LE, TS, FG, RM, and YP analyzed the data. VJ, BW, and LW wrote the manuscript. All authors have read and approved the final draft of the manuscript.

FUNDING

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG no. WI 1436/12-1). AL-B, AB, and BW were supported by the project #1Health-PREVENT (Grants 01KI1727F and 01KI1727D) from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF). LE was supported by the project PAC-CAMPY

(Grant 01KI1725F) within the German Research Network of Zoonotic Diseases. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Julia Assmann, Charlotte Huber, Anne Kauter, and the colleagues from the Advanced Light and Electron Microscopy (ZBS-4) department of the Robert Koch Institute for their individual contribution and support of this project. We also

thank Petra Krienke for her excellent technical assistance in the sequence lab. We also thank Esther-Maria Antao for language assistance with the manuscript and Carina Jahnke for figure converting.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02734/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Aarestrup, F. M., Cavaco, L., and Hasman, H. (2010). Decreased susceptibility to zinc chloride is associated with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in Danish swine. *Vet. Microbiol.* 142, 455–457. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.10.021
- Agga, G. E., Scott, H. M., Amachawadi, R. G., Nagaraja, T. G., Vinasco, J., Bai, J., et al. (2014). Effects of chlortetracycline and copper supplementation on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from weaned pigs. *Prev. Vet. Med.* 114, 231–246. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.02.010
- Ahmed, S., Olsen, J. E., and Herrero-Fresno, A. (2017). The genetic diversity of commensal *Escherichia coli* strains isolated from non-antimicrobial treated pigs varies according to age group. *PLoS One* 12:e0178623. doi: 10.1371/journal.pone.0178623
- Alcalá, L., Alonso, C. A., Simón, C., González-Esteban, C., Orós, J., Rezusta, A., et al. (2016). Wild birds, frequent carriers of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 Types. *Microb. Ecol.* 72, 861–869. doi: 10.1007/s00248-015-0718-0
- Aldema, M. L., Mcmurry, L. M., Walmsley, A. R., and Levy, S. B. (1996). Purification of the Tn 10-specified tetracycline efflux antiporter TetA in a native state as a polyhistidine fusion protein. *Mol. Microbiol.* 19, 187–195. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.359886.x
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., and Peixe, L. (2005). Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 836–839.
- Argudin, M. A., Hofer, A., and Butaye, P. (2019). Heavy metal resistance in bacteria from animals. *Res. Vet. Sci.* 122, 132–147. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.11.007
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., and McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 14, 176–182. doi: 10.1016/j.tim.2006.02.006
- Beard, S. J., Hashim, R., Wu, G., Binet, M. R. B., Hughes, M. N., and Poole, R. K. (2000). Evidence for the transport of zinc(II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 184, 231–235. doi: 10.1016/s0378-1097(00)00055-0
- Becerra-Castro, C., Machado, R. A., Vaz-Moreira, I., and Manaia, C. M. (2015). Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Sci. Total Environ.* 53, 367–372. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.102
- Bednorz, C., Oelgeschläger, K., Kinnemann, B., Hartmann, S., Neumann, K., Pieper, R., et al. (2013). The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 396–403. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.06.004
- Blaby-Haas, C. E., Flood, J. A., Crecy-Lagard, V. D., and Zamble, D. B. (2012). YeiR: a metal-binding GTPase from *Escherichia coli* involved in metal homeostasis. *Metallomics* 4, 488–497. doi: 10.1039/c2mt20012k
- Blázquez, E., Rodríguez, C., Ródenas, J., Pérez De Rozas, A., Campbell, J. M., Segalés, J., et al. (2018). Evaluation of ultraviolet-C and spray-drying processes as two independent inactivation steps on enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 and K99 strains inoculated in fresh unconcentrated porcine plasma. *Letts. Appl. Microbiol.* 67, 442–448. doi: 10.1111/lam.13068
- Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Parkinson, J. A., Bowness, P. W., Sadler, P. J., et al. (2002). Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.* 45, 1421–1432. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03109.x
- Buffet-Bataillon, S., Le Jeune, A., Le Gall-De David, S., Bonnaure-Mallet, M., and Jolivet-Gougeon, A. (2012). Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2837–2842. doi: 10.1093/jac/dks321
- Bunnell, B. E., Escobar, J. F., Bair, K. L., Sutton, M. D., and Crane, J. K. (2017). Zinc blocks SOS-induced antibiotic resistance via inhibition of RecA in *Escherichia coli*. *PLoS One* 12:e0178303. doi: 10.1371/journal.pone.0178303
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 298–304. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., et al. (2014). In silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3895–3903. doi: 10.1128/AAC.02412-14
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., and Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 159–161. doi: 10.1093/jac/dkg313
- Cavaco, L. M., Hasman, H., and Aarestrup, F. M. (2011). Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Vet. Microbiol.* 150, 344–348. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.014
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Stegger, M., Andersen, P. S., Skov, R., Fluit, A. C., et al. (2010). Cloning and occurrence of *czrC*, a gene conferring cadmium and zinc resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3605–3608. doi: 10.1128/AAC.00058-10
- Choi, S.-H., Lee, K.-L., Shin, J.-H., Cho, Y.-B., Cha, S.-S., and Roe, J.-H. (2017). Zinc-dependent regulation of zinc import and export genes by Zur. *Nat. Commun.* 8:15812. doi: 10.1038/ncomms15812
- Ciesinski, L., Guenther, S., Pieper, R., Kalisch, M., Bednorz, C., and Wieler, L. H. (2018). High dietary zinc feeding promotes persistence of multi-resistant *E. coli* in the swine gut. *PLoS One* 13:e0191660. doi: 10.1371/journal.pone.0191660
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement M100-S21*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). *Vet01-S2 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility for Bacteria Isolated from Animals. Second International Supplement*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Colaço, H. G., Santo, P. E., Matias, P. M., Bandeiras, T. M., and Vicente, J. B. (2016). Roles of *Escherichia coli* ZinT in cobalt, mercury and cadmium resistance and structural insights into the metal binding mechanism. *Metallomics* 8, 327–336. doi: 10.1039/c5mt00291e
- Cordoni, G., Woodward, M. J., Wu, H., Alanazi, M., Wallis, T., and La Ragione, R. M. (2016). Comparative genomics of European avian pathogenic *E. coli* (APEC). *BMC Genomics* 17:960–960.

- Cortés, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, M., et al. (2010). Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2799–2805. doi: 10.1128/AEM.02421-09
- Deus, D., Krischek, C., Pfeifer, Y., Sharifi, A. R., Fiegen, U., Reich, F., et al. (2017). Comparative analysis of the susceptibility to biocides and heavy metals of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates of human and avian origin, Germany. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 88, 88–92. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.023
- Ding, Y., Tang, X., Lu, P., Wu, B., Xu, Z., Liu, W., et al. (2012). Clonal analysis and virulent traits of pathogenic extraintestinal *Escherichia coli* isolates from swine in China. *BMC Vet. Res.* 8:140. doi: 10.1186/1746-6148-8-140
- Fairbrother, J. M., Nadeau, É., and Gyles, C. L. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 17–39. doi: 10.1079/ahr2005105
- Fang, L., Li, X., Li, L., Li, S., Liao, X., Sun, J., et al. (2016). Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. *Sci. Rep.* 6:25312. doi: 10.1038/srep25312
- Fard, R. M. N., Heuzenroeder, M. W., and Barton, M. D. (2011). Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. *Vet. Microbiol.* 148, 276–282. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.09.002
- Fernandez-Lopez, R., De Toro, M., Moncalian, G., Garcillan-Barcia, M. P., and De La Cruz, F. (2016). Comparative genomics of the conjugation region of f-like plasmids: five shades of F. *Front. Mol. Biosci.* 3:71. doi: 10.3389/fmolb.2016.00071
- Frost, L. S., Ippen-Ihler, K., and Skurray, R. A. (1994). Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol. Rev.* 58, 162–210.
- Gielda, L. M., and DiRita, V. J. (2012). Zinc competition among the intestinal microbiota. *mBio* 3:e171-12. doi: 10.1128/mBio.00171-12
- Gillings, M. R., Xuejun, D., Hardwick, S. A., Holley, M. P., and Stokes, H. W. (2008). Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *ISME J.* 3:209. doi: 10.1038/ismej.2008.98
- Graham, A. I., Hunt, S., Stokes, S. L., Bramall, N., Bunch, J., Cox, A. G., et al. (2009). Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins. *J. Biol. Chem.* 284, 18377–18389. doi: 10.1074/jbc.M109.001503
- Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D. H., Kucharski, L. M., Maguire, M. E., et al. (2005). The metal permease zupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J. Bacteriol.* 187, 1604–1611. doi: 10.1128/jb.187.5.1604-1611.2005
- Guenther, S., Falgenhauer, L., Semmler, T., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Roesler, U., et al. (2017). Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 1289–1292. doi: 10.1093/jac/dkw585
- Hantke, K. (2005). Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 196–202. doi: 10.1016/j.mib.2005.02.001
- Harrison, J. J., Tremaroli, V., Stan, M. A., Chan, C. S., Vacchi-Suzzi, C., Heyne, B. J., et al. (2009). Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance. *Environ. Microbiol.* 11, 2491–2509. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01973.x
- Hensley, M. P., Gunasekera, T. S., Easton, J. A., Sigdel, T. K., Sugarbaker, S. A., Klingbeil, L., et al. (2012). Characterization of Zn(II)-responsive ribosomal proteins YkgM and L31 in *E. coli*. *J. Inorg. Biochem.* 111, 164–172. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.11.022
- Herrero-Fresno, A., Larsen, I., and Olsen, J. E. (2015). Genetic relatedness of commensal *Escherichia coli* from nursery pigs in intensive pig production in Denmark and molecular characterization of genetically different strains. *J. Appl. Microbiol.* 119, 342–353. doi: 10.1111/jam.12840
- Hoegler, K. J., and Hecht, M. H. (2018). Artificial gene amplification in *Escherichia coli* reveals numerous determinants for resistance to metal toxicity. *J. Mol. Evol.* 86, 103–110. doi: 10.1007/s00239-018-9830-3
- Hollingshead, S., and Vapnek, D. (1985). Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase. *Plasmid* 13, 17–30. doi: 10.1016/0147-619x(85)90052-6
- Holzel, C. S., Muller, C., Harms, K. S., Mikolajewski, S., Schafer, S., Schwaiger, K., et al. (2012). Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environ. Res.* 113, 21–27. doi: 10.1016/j.envres.2012.01.002
- Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., et al. (2017). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 45, D566–D573. doi: 10.1093/nar/gkw1004
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., and Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2410–2426. doi: 10.1128/JCM.00008-15
- Kholodii, G., Mindlin, S., Petrova, M., and Minakhina, S. (2003). Tn5060 from the Siberian permafrost is most closely related to the ancestor of Tn21 prior to integrin acquisition. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 251–255. doi: 10.1016/s0378-1097(03)00559-7
- Kloubert, V., Blaabjerg, K., Dalgaard, T. S., Poulsen, H. D., Rink, L., and Wessels, I. (2018). Influence of zinc supplementation on immune parameters in weaned pigs. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 49, 231–240. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.01.006
- Lacotte, Y., Ploy, M.-C., and Raherison, S. (2017). Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. *ISME J.* 11, 1535–1544. doi: 10.1038/ismej.2017.38
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., et al. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1355–1361. doi: 10.1128/JCM.06094-11
- Lee, L. J., Barrett, J. A., and Poole, R. K. (2005). Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. *J. Bacteriol.* 187, 1124–1134. doi: 10.1128/jb.187.3.1124-1134.2005
- Li, H. H., Li, Y. P., Zhu, Q., Qiao, J. Y., and Wang, W. J. (2018). Dietary supplementation with *Clostridium butyricum* helps to improve the intestinal barrier function of weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J. Appl. Microbiol.* 125, 964–975. doi: 10.1111/jam.13936
- Liebert, C. A., Hall, R. M., and Summers, A. O. (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 507–522.
- Lu, M., Chai, J., and Fu, D. (2009). Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YjiP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1063–1067. doi: 10.1038/nsmb.1662
- Mata, M. T., Baquero, F., and Pérez-Díaz, J. C. (2000). A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 187, 185–188. doi: 10.1016/s0378-1097(00)00199-3
- Medardus, J. J., Molla, B. Z., Nicol, M., Morrow, W. M., Rajala-Schultz, P. J., Kazwala, R., et al. (2014). In-feed use of heavy metal micronutrients in U.S. swine production systems and its role in persistence of multidrug-resistant salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2317–2325. doi: 10.1128/AEM.04283-13
- Melnik, A. H., Wong, A., and Kassen, R. (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol. Appl.* 8, 273–283. doi: 10.1111/eva.12196
- Moon, H. W., and Bunn, T. O. (1993). Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine* 11, 213–220. doi: 10.1016/0264-410x(93)90020-x
- Nies, D. H., and Grass, G. (2009). Transition metal homeostasis. *EcoSal Plus* 3, Novoa, D., and Conroy-Ben, O. (2019). The anaerobic efflux pump MdtEF-TolC confers resistance to cationic biocides. *bioRxiv* [Preprint]. doi: 10.1101/570408
- Ojer-Usoz, E., González, D., and Vitas, A. I. (2017). Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from environmental, human and food samples. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14:676. doi: 10.3390/ijerph14070676
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., and Larsson, D. G. J. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics* 16:964. doi: 10.1186/s12864-015-2153-5
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Rensing, C., Kristiansson, E., and Larsson, D. G. J. (2013). BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* 42, D737–D743. doi: 10.1093/nar/gkt1252
- Paulsen, I. T., Brown, M. H., and Skurray, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60, 575–608.
- Pawlowski, A. C., Stogios, P. J., Koteva, K., Skarina, T., Evdokimova, E., Savchenko, A., et al. (2018). The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nat. Commun.* 9:112. doi: 10.1038/s41467-017-02680-0
- Petit-Hartlein, I., Rome, K., De Rosny, E., Molton, F., Duboc, C., Gueguen, E., et al. (2015). Biophysical and physiological characterization of ZraP from *Escherichia*

- coli*, the periplasmic accessory protein of the atypical ZraSR two-component system. *Biochem. J.* 472, 205–216. doi: 10.1042/BJ20150827
- Petrova, M., Gorlenko, Z., and Mindlin, S. (2011). Tn5045, a novel integron-containing antibiotic and chromate resistance transposon isolated from a permafrost bacterium. *Res. Microbiol.* 162, 337–345. doi: 10.1016/j.resmic.2011.01.003
- Pieper, R., Martin, L., Schunter, N., Villodre Tudela, C., Weise, C., Klopffleisch, R., et al. (2015). Impact of high dietary zinc on zinc accumulation, enzyme activity and proteomic profiles in the pancreas of piglets. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 30, 30–36. doi: 10.1016/j.jtemb.2015.01.008
- Poole, K. (2017). At the nexus of antibiotics and metals: the impact of Cu and Zn on antibiotic activity and resistance. *Trends Microbiol.* 25, 820–832. doi: 10.1016/j.tim.2017.04.010
- Porcheron, G., Garenaux, A., Proulx, J., Sabri, M., and Dozois, C. M. (2013). Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 3:90. doi: 10.3389/fcimb.2013.00090
- Reid, C. J., Wyrsh, E. R., Roy Chowdhury, P., Zingali, T., Liu, M., Darling, A. E., et al. (2017). Porcine commensal *Escherichia coli*: a reservoir for class 1 integrons associated with IS26. *Microb. Genom.* 3, doi: 10.1099/mgen.0.000143
- Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F., and Letellier, A. (2017a). Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet. Scand.* 59, 31–31. doi: 10.1186/s13028-017-0299-7
- Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Thériault, W., Beaudry, F., Bergeron, N., Laurent-Lewandowski, S., et al. (2017b). The fecal presence of enterotoxin and F4 genes as an indicator of efficacy of treatment with colistin sulfate in pigs. *BMC Microbiol.* 17:6–6. doi: 10.1186/s12866-016-0915-0
- Rice, L. B., and Carias, L. L. (1998). Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 180, 714–721.
- Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 195–203. doi: 10.1016/j.femsle.2005.02.034
- Rubens, C. E., McNeill, W. F., and Farrar, W. E. (1979). Transposable plasmid deoxyribonucleic acid sequence in *Pseudomonas aeruginosa* which mediates resistance to gentamicin and four other antimicrobial agents. *J. Bacteriol.* 139:877.
- Salverda, M. L., De Visser, J. A., and Barlow, M. (2010). Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1015–1036. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x
- Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Liebold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M., and Scherzinger, E. (1989). Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 75, 271–288. doi: 10.1016/0378-1119(89)90273-4
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
- Seiler, C., and Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 3:399–399. doi: 10.3389/fmicb.2012.00399
- Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet. Res.* 32, 261–273. doi: 10.1051/vetres:2001123
- Song, J., Rensing, C., Holm, P. E., Virta, M., and Brandt, K. K. (2017). Comparison of metals and tetracycline as selective agents for development of tetracycline resistant bacterial communities in agricultural soil. *Environ. Sci. Technol.* 51, 3040–3047. doi: 10.1021/acs.est.6b05342
- Starke, I. C., Pieper, R., Neumann, K., Zentek, J., and Vahjen, W. (2014). The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 416–427. doi: 10.1111/1574-6941.12233
- Stocks, C. J., Phan, M.-D., Achard, M. E. S., Nhu, N. T. K., Condon, N. D., Gawthorne, J. A., et al. (2019). Uropathogenic *Escherichia coli* employs both evasion and resistance to subvert innate immune-mediated zinc toxicity for dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 6341–6350. doi: 10.1073/pnas.1820870116
- Subashchandrabose, S., Smith, S. N., Spurbeck, R. R., Kole, M. M., and Moble, H. L. (2013). Genome-wide detection of fitness genes in uropathogenic *Escherichia coli* during systemic infection. *PLoS Pathog.* 9:e1003788. doi: 10.1371/journal.ppat.1003788
- Taudte, N., and Grass, G. (2010). Point mutations change specificity and kinetics of metal uptake by ZupT from *Escherichia coli*. *Biomaterials* 23, 643–656. doi: 10.1007/s10534-010-9319-z
- Turnidge, J., Kahlmeter, G., and Kronvall, G. (2006). Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 418–425. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01377.x
- Vahjen, W., Pieper, R., and Zentek, J. (2011). Increased dietary zinc oxide changes the bacterial core and enterobacterial composition in the ileum of piglets. *J. Anim. Sci.* 89, 2430–2439. doi: 10.2527/jas.2010-3270
- Vallee, B. L., and Auld, D. S. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29, 5647–5659. doi: 10.1021/bi00476a001
- van Alen, S., Kaspar, U., Idelevich, E. A., Köck, R., and Becker, K. (2018). Increase of zinc resistance in German human derived livestock-associated MRSA between 2000 and 2014. *Vet. Microbiol.* 214, 7–12. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.032
- Vidhyaparkavi, A., Osborne, J., and Babu, S. (2017). Analysis of *zntA* gene in environmental *Escherichia coli* and additional implications on its role in zinc translocation. *Biotech* 7:9. doi: 10.1007/s13205-017-0613-0
- Wang, D., and Fierke, C. A. (2013). The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. *Metallomics* 5, 372–383. doi: 10.1039/c3mt20217h
- Wang, D., Hosteen, O., and Fierke, C. A. (2012). ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. *J. Inorg. Biochem.* 111, 173–181. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.02.008
- Wang, J., Gibbons, J. F., Mcgrath, K., Bai, L., Li, F., Leonard, F. C., et al. (2016). Molecular characterization of blaESBL-producing *Escherichia coli* cultured from pig farms in Ireland. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 3062–3065.
- Warner, D. M., and Levy, S. B. (2012). SoxS increases the expression of the zinc uptake system ZnuACB in an *Escherichia coli* murine pyelonephritis model. *J. Bacteriol.* 194, 1177–1185. doi: 10.1128/JB.05451-11
- Watly, J., Potocki, S., and Rowinska-Zyrek, M. (2016). Zinc homeostasis at the bacteria/host interface—from coordination chemistry to nutritional immunity. *Chemistry* 22, 15992–16010. doi: 10.1002/chem.201602376
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., and Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 13:e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595
- Yan, T., Zhang, F., He, Y., Wang, X., Jin, X., Zhang, P., et al. (2018). *Enterococcus faecium* HDRsEfi elevates the intestinal barrier defense against enterotoxigenic *Escherichia coli* and regulates occludin expression via activation of TLR-2 and PI3K signalling pathways. *Lett. Appl. Microbiol.* 67, 520–527. doi: 10.1111/lam.13067
- Yatsunyk, L. A., Easton, J. A., Kim, L. R., Sugarbaker, S. A., Bennett, B., Breece, R. M., et al. (2008). Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from *Escherichia coli*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 271–288. doi: 10.1007/s00775-007-0320-0
- Yazdankhah, S., Rudi, K., and Bernhoft, A. (2014). Zinc and copper in animal feed - development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microb. Ecol. Health Dis.* 25:25862. doi: 10.3402/mehd.v25.25862
- Yu, Z., Gunn, L., Wall, P., and Fanning, S. (2017). Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food Microbiol.* 64, 23–32. doi: 10.1016/j.fm.2016.12.009
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644. doi: 10.1093/jac/dks261

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Johanns, Ghazisaeedi, Epping, Semmler, Lübke-Becker, Pfeifer, Bethe, Eichhorn, Merle, Walther and Wieler. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3.2. Veröffentlichung II

V.C. Johanns, L. Epping, T. Semmler, F. Ghazisaeedi, A. Lübke-Becker, Y. Pfeifer, I. Eichhorn, R. Merle, A. Bethe, B. Walther, L.H. Wieler.

High-zinc supplementation of weaned piglets affects frequencies of virulence and bacteriocin associated genes among intestinal *Escherichia coli* populations

Frontiers in Veterinary Science – Veterinary Infectious Diseases, 2020. Dec16; 7(614513)

<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.614513>

The manuscript received: 10th October 2020

Accepted: 20th November 2020

Published: 16th December 2020



High-Zinc Supplementation of Weaned Piglets Affects Frequencies of Virulence and Bacteriocin Associated Genes Among Intestinal *Escherichia coli* Populations

Vanessa C. Johanns¹, Lennard Epping², Torsten Semmler², Fereshteh Ghazisaeei³, Antina Lübke-Becker³, Yvonne Pfeifer⁴, Inga Eichhorn³, Roswitha Merle⁵, Astrid Bethe³, Birgit Walther^{1*†} and Lothar H. Wieler^{6†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Min Yue,
Zhejiang University, China

Reviewed by:

Qiangde Duan,
Yangzhou University, China
Wei Wang,
China National Center for Food Safety
Risk Assessment, China

*Correspondence:

Birgit Walther
waltherb@rki.de

†These authors share last authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Veterinary Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 10 October 2020

Accepted: 20 November 2020

Published: 16 December 2020

Citation:

Johanns VC, Epping L, Semmler T,
Ghazisaeei F, Lübke-Becker A,
Pfeifer Y, Eichhorn I, Merle R, Bethe A,
Walther B and Wieler LH (2020)
High-Zinc Supplementation of
Weaned Piglets Affects Frequencies of
Virulence and Bacteriocin Associated
Genes Among Intestinal *Escherichia
coli* Populations.
Front. Vet. Sci. 7:614513.
doi: 10.3389/fvets.2020.614513

¹ Advanced Light and Electron Microscopy (ZBS-4), Robert Koch Institute, Berlin, Germany, ² Microbial Genomics (NG1), Robert Koch Institute, Berlin, Germany, ³ Center for Infection Medicine, Institute of Microbiology and Epizootics, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, ⁴ Nosocomial Pathogens and Antibiotic Resistance (FG13), Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany, ⁵ Institute for Veterinary Epidemiology and Biostatistics, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, ⁶ Robert Koch Institute, Berlin, Germany

To prevent economic losses due to post-weaning diarrhea (PWD) in industrial pig production, zinc (Zn) feed additives have been widely used, especially since awareness has risen that the regular application of antibiotics promotes buildup of antimicrobial resistance in both commensal and pathogenic bacteria. In a previous study on 179 *Escherichia coli* collected from piglets sacrificed at the end of a Zn feeding trial, including isolates obtained from animals of a high-zinc fed group (HZG) and a corresponding control group (CG), we found that the isolate collection exhibited three different levels of tolerance toward zinc, i.e., the minimal inhibitory concentration (MIC) detected was 128, followed by 256 and 512 $\mu\text{g/ml}$ ZnCl_2 . We further provided evidence that enhanced zinc tolerance in porcine intestinal *E. coli* populations is clearly linked to excessive zinc feeding. Here we provide insights about the genomic make-up and phylogenetic background of these 179 *E. coli* genomes. Bayesian analysis of the population structure (BAPS) revealed a lack of association between the actual zinc tolerance level and a particular phylogenetic *E. coli* cluster or even branch for both, isolates belonging to the HZG and CG. In addition, detection rates for genes and operons associated with virulence (VAG) and bacteriocins (BAG) were lower in isolates originating from the HZG (41 vs. 65% and 22 vs. 35%, $p < 0.001$ and $p = 0.002$, resp.). Strikingly, *E. coli* harboring genes defining distinct pathotypes associated with intestinal disease, i.e., enterotoxigenic, enteropathogenic, and Shiga toxin-producing *E. coli* (ETEC, EPEC, and STEC) constituted 1% of the isolates belonging to the HZG but 14% of those from the CG. Notably, these pathotypes were positively associated with enhanced zinc tolerance (512 $\mu\text{g/ml}$ ZnCl_2 MIC, $p < 0.001$). Taken together, zinc excess seems to influence carriage rates of VAGs and BAGs in

porcine intestinal *E. coli* populations, and high-zinc feeding is negatively correlated with enteral pathotype occurrences, which might explain earlier observations concerning the relative increase of *Enterobacterales* considering the overall intestinal microbiota of piglets during zinc feeding trials while PWD rates have decreased.

Keywords: *E. coli*, zinc, pig, virulence associated genes, bacteriocins, gut

INTRODUCTION

The gastrointestinal microbiota of pigs is a large, multifaceted and complex microbial community which has been estimated to comprise of 10^{10} - 10^{11} bacteria per gram of gut content (1). Different stress factors are capable of altering the healthy gut microbiome of a piglet, e.g., weaning from the sow, which is among the most stressful events in a piglet's life (2): The prompt change in diet, social and environmental life conditions affects the gut microbiota in composition and structure and prevalently enhances vulnerability for onset of enteral post-weaning infections (3). Considering feed additives, different products are marketed to assist in boosting the pigs' immune system, regulate gut microbiota, and reduce negative impacts of weaning and other environmental challenges, including pharmacological levels of zinc and copper (4). However, a recent review concluded that it is not possible to recommend a specific additive that will have positive effects in all diets, since the effects strongly depend on the health status of the animals (4). Therefore, maintaining a physiological/healthy gut microbiota composition and equilibrium during and after weaning is important to prevent attachment, proliferation and spread of pathogenic microorganisms, especially enterotoxigenic *Escherichia coli*, which is a frequent cause of post-weaning diarrhea (PWD) in piglets (5).

E. coli causing intestinal diseases usually express virulence factors which induce and/or support an inflammation of the gut often leading to diarrhea, while the number of intestinal commensals decreases (6). Complex mechanisms of interaction between commensal and pathogenic bacteria have evolved within the gut, including competition for nutrients, shielding from the activated enteral immune response and induction of competitor-eliminating bacteriocin production (7). These bacteriocins are polypeptide toxins comprising colicins and microcins which exhibit a broad range of different cytotoxic mechanisms (8–10). Both colicins and microcins are capable of killing a narrow spectrum of competing *Enterobacterales*, including other *E. coli* lineages (9). Porcine pathogenic *E. coli* have been shown to produce predominantly colicins, especially colicin BM and Ib (11).

To prevent or mend PWD which is most commonly caused by enterotoxigenic *E. coli* (12), high-level dietary zinc oxide supplementation is used in the pig production sector in different parts of the world (5, 13, 14). Although the particular effects of zinc on the enteral microbiota are not fully understood yet, piglets fed with high-zinc supplemented diets clearly showed changes with respect to the overall composition and abundance of distinct gut-associated bacteria (15–17), which are probably

associated with bacteriocin-producing bacteria as well. We therefore hypothesized that the occurrence of genes encoding bacteriocins might have an impact on the composition of the *E. coli* population in zinc-fed piglets.

The manifestation of clinical symptoms and pathology of *E. coli*-induced enteral diseases is closely associated with the occurrence of certain virulence associated genes (VAGs) (18, 19). Mainly based on the presence of distinct VAGs but also additional, especially phenotypical characteristics, diarrheagenic *E. coli* of importance for the pig production sector are often classified as enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). Furthermore, enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) have been reported as a probable cause of diarrhea in pigs as well (5, 19–21).

While we have recently shown that high-zinc supplemented diets foster accumulation of *E. coli* associated with increased zinc-tolerance in weaned piglets (22), the effects of that particular feed additive on the occurrence of VAGs and bacteriocin associated genes (BAGs) among the intestinal *E. coli* population of these piglets were not investigated so far. In the current study, we analyzed the phylogenetic relationship and make up of a broad collection of *E. coli* obtained from a former piglet zinc-feeding trial together with strains isolated from pigs suffering from clinical disease in order to investigate the presence of a putative correlation between feeding group and the zinc tolerance level of the isolates with the occurrence of VAGs and/or BAGs.

MATERIALS AND METHODS

Animal Trial and Bacterial Isolates

The representative set of *E. coli* isolates characterized here was selected based on a previous feeding trial (23) carried out in accordance with the principles of the Basel Declaration following the institutional and national guidelines for the care and use of animals. The protocol was approved by the local state office of occupational health and technical safety "Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin" (LaGeSo Reg. Nr. 0296/13) as described before (23).

Briefly, 32 landrace piglets of regular commercial origin weaned at day 25 ± 1 were separated into two groups for 4 weeks: the first group of piglets, designated here as the high-zinc group (HZG) was fed with a diet supplemented with a comparatively high amount of zinc oxide (2,103 mg zinc/kg diet), while the second group served as the control group. This control group (CG) received a common piglet diet containing a concentration of zinc oxide (72 mg zinc/kg diet) sufficient to meet the nutritional requirements to avoid trace metal malnutrition

(23). The trial started with 32 piglets, which were sacrificed mid-trial (38 ± 2 days of age, $n = 16$, 8 per group) and at the trial's end (52 ± 2 days of age, $n = 16$, 8 per group). No symptoms of disease were observed within the two feeding groups during the entire trial. Here we focus on *E. coli* obtained from three different sampling sites (feces, digesta and mucosa obtained from the colon ascendens) of those piglets sacrificed at the end (52 ± 2 days of age; $n = 16$) of the feeding trial. In total, 179 *E. coli* were collected as a stratified random sample (HZG = 99, CG = 80), with an average number of 11 *E. coli* isolates investigated per piglet (all three sampling sites). These isolates were previously studied with regard to their respective zinc tolerance levels and susceptibility patterns for antibiotics and biocides (22).

To compare, we chose six additional porcine strains isolated from clinically ill piglets [diarrhea ($n = 4$), edema disease ($n = 2$)] available in the strain collection of the Institute of Microbiology and Epizootics (IMT) as representatives for non-commensal isolates and a high-zinc tolerant isolate from a clinical human case (RKI6122) (24).

Whole Genome Sequencing, Phylogenetic Analysis, and Screening for Virulence Associated- (VAGs) and Bacteriocin Associated Genes (BAGs)

E. coli were sequenced using Illumina MiSeq® 300 bp paired-end whole genome sequencing (WGS) with an obtained coverage of >90x. The Illumina short reads were hybrid assembled using unicycler v4.4 (25). Adapter-trimmed reads were used for *de novo* assembly into contiguous sequences (contigs) and subsequently into scaffolds using SPAdes v3.11. All draft genomes were annotated using Prokka v1.14.5 (26). Illumina raw read data sequenced for this study is available at NCBI under Bioproject ID PRJNA552271. The determination of the maximum common genome (MCG) (27) alignment was done comprising those genes present in all 179 genomes. To obtain this, we clustered the coding sequences based on the parameters sequence similarity (min. 90%) and coverage (min. 90%) and defined the genes that were present in each genome, fulfilling the threshold parameters as MCG. This resulted in 2,804 orthologous genes that we used for the comparisons. We extracted the allelic variants of these genes from all genomes by a BLAST-based approach, aligned them individually for each gene and concatenated them, which result in an alignment of 2.762 Mbp for these 179 strains. This alignment was used to generate a phylogenetic tree with RAxML v 8.2.10 (28) using a General Time Reversible model and gamma correction for among site rate variation. Bayesian analysis of population structure (BAPS) (29) was applied to identify genetically distinct lineages based on the constructed phylogeny.

An in-house BLAST-pipeline with the general gene identity threshold of 95 and 90% minimum coverage was used to identify 25 VAGs selected because of their (putative) importance in intestinal pathogenicity (Table 1). Further genotype characterization included the determination of multilocus sequence type (ST) and sequence type complex (STC) using

MLST 2.0 (35), and serotype prediction using SerotypeFinder 2.0 (36).

The screening procedure for bacteriocin associated genes included colicin types depending on either a Tol-dependent translocation system (group A) such as colicin A, E1–E4, E6–E9, K, N, S4, U, Y or a Ton system (group B) including colicin B, Ia, Ib, E5, E7, 5, 10, G, H, Js, D, and M (37–41). An in-house BLAST-pipeline was set-up for each of the corresponding genes with the general identity threshold of 95 and 90% minimum gene coverage (Supplementary Figure 1) (9, 41).

Each gene encoding a bacteriocin (colicin, microcin) was further investigated with respect to its predicted amino acid (aa) sequence coverage and identity using corresponding reference/prototype aa sequences of the particular *E. coli* protein from NCBI (Supplementary Figure 1). An *in silico* comparative analysis was performed on these aa sequences using Geneious Prime (version 2019.0.04).

A detailed overview of the characteristics of all animal trial isolates and the strains included for comparative purposes are provided in Supplementary Tables 1, 2.

Statistical Analysis

Data were analyzed using SPSS software version 25.0 (IBM, New York, NY, USA). *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

A mixed-model regression approach was used to test whether the feeding group and *E. coli* ZnCl₂ MICs had an effect on the total number of different VAGs, with the individual pig as random factor. Since the dependent variable showed a Poisson distribution, Poisson regression and logarithmic link function were applied, with feeding group and ZnCl₂ MICs (< vs. > = 512) included as factors into the model. Interactions were tested and removed when the *p*-value was >0.05. Variance components analysis was used to determine the proportion of variance that accounted for differences between individual animals. In a second mixed logistic regression model, the individual effects of the above mentioned influence factors on the presence of major diagnostic markers was tested. Interactions were also tested as described above.

RESULTS

Population Structure Analysis of Porcine *E. coli* of Different Feeding Groups and Zinc Tolerance Levels

Considering the overall phylogenetic diversity, we identified 2,804 orthologous genes representing the “maximum common genome” (MCG) of 186 genomic sequences representing isolates from both feeding groups (HZG = 99, CG = 80), six isolates previously collected from diagnostic samples of severely ill piglets (diarrhea, edema disease) and one further isolate of human origin [RKI6122 (24)] which exhibited a MIC value of 1,024 µg/ml ZnCl₂.

The phylogeny was constructed from the MCG alignments of 186 genomes (Figure 1) and further investigated using Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS). Seven distinct

TABLE 1 | Occurrence and distribution of VAGs associated with different types of intestinal pathogenic *E. coli* of relevance for pigs.

Gene	Protein	Associated pathotype	ZnCl ₂ MIC (μg/ml)						Feeding group			
			128		256		512		HZG		CG	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
			7	100	136	100	36	100	99	100	80	100
<i>aidA</i>	adhesin involved in diffuse adherence	DAEC/ETEC	3	43	15	11	3	8	4	4	17	21
<i>aah</i>	AT adhesin heptosyltransferase	DAEC/ETEC	3	43	15	11	3	8	4	4	17	21
<i>bfpA</i>	type IV bundle-forming pili	EPEC										
<i>eae</i>	Intimin	STEC/EPEC			12	9			1	1	11	14
<i>faeG</i>	F4 fimbrial adhesin	ETEC										
<i>fasA</i>	F6 fimbrial adhesin	ETEC										
<i>fanC</i>	F5 fimbrial adhesin	ETEC										
<i>fedA</i>	F18 fimbrial adhesin	ETEC										
<i>f41</i>	F41 fimbrial adhesin	ETEC										
<i>iha</i>	novel non-hemagglutinin adhesin	STEC			12	9	19	53	20	20	11	14
<i>pic</i>	serine protease autotransporter	EAEC			18	13	4	11	9	9	13	16
<i>paa</i>	porcine AE associated protein	STEC/EPEC			10	7			1	1	9	11
<i>saa</i>	STEC autoagglutinating adhesin	STEC										
<i>cdt</i>	cytolethal distending toxin	EPEC					2	6	2	2		
<i>astA/ east1</i>	enterohemolysin	EAEC			31	23	4	11	9	9	26	33
<i>ehxA</i>	enterohemolysin	EPEC			10	7			1	1	9	11
<i>efa1/ lifA</i>	lymphostatin	EPEC			10	7			1	1	9	11
<i>eltAB</i>	heat-labile (LT) enterotoxin subunit A and B	ETEC	2	29			8	22	6	6	4	5
<i>estA</i>	heat-stable enterotoxin STa	ETEC			4	3	7	19	7	7	4	5
<i>estB</i>	heat-stable enterotoxin STb	ETEC			12	9	2	6	3	3	11	14
<i>set1AB</i>	Shigella enterotoxin 1, ShET1	EAEC			2	2	1	3	2	2	1	1
<i>stx₁</i>	Shiga toxin 1 (subunit A and B)	STEC			2	2					2	3
<i>stx₂</i>	Shiga toxin 2 (subunit A and B)	STEC			14	10					14	18

All 179 porcine *E. coli* from both feeding group (HZG and CG) were screened with respect to the presence or absence of 13 different adhesion and 11 different toxin encoding genes associated with intestinal *E. coli* pathotypes. References for the major diagnostic markers are provided by Ref. (18–20, 30–34).

n, number of isolates; HZG, high zinc fed group; CG, control group; VAG, virulence associated genes; DAEC, diffuse adherent *E. coli*, ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; STEC, Shiga toxin-producing *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*, EAEC, enteroaggregative *E. coli*.

phylogenetic groups were identified, namely the BAPS cluster I-VII (Figure 1). BAPS cluster I comprised 54 isolates of both feeding groups (HZG: *n* = 35; CG: *n* = 19) distributed among eight STs, half of which containing strains with a ZnCl₂ MIC of 256 μg/ml [ST21 (*n* = 10), ST56 (*n* = 4), ST58 (*n* = 8), and ST1308 (*n* = 2)]. ST101 (*n* = 4) and ST4577 (*n* = 6) isolates showed a ZnCl₂ MIC of 512 μg/ml, including the only two CG-isolates with this MIC. ST154 (*n* = 14) isolates were associated with ZnCl₂ MICs of either 256 (*n* = 12) or 512 μg/ml (*n* = 2), and ST40 (*n* = 6) isolates showed ZnCl₂ MICs of 128 μg/ml (*n* = 1) and 256 μg/ml (*n* = 5).

Cluster II (*n* = 6; HZG: *n* = 2; CG: *n* = 4) contained five isolates associated with the 256 μg/ml ZnCl₂ MIC including ST567 (*n* = 1), ST681 (*n* = 2), and ST1040 (*n* = 2). A third ST681 isolate of cluster II showed a 512 μg/ml ZnCl₂ MIC.

With 84 isolates, BAPS cluster III formed the largest phylogenetic group and consisted exclusively of isolates belonging to STC10 (HZG: *n* = 51; CG: *n* = 32; pathogenic isolate: *n* = 1). In more detail, ST10 (*n* = 45) isolates with distinct ZnCl₂ MICs [128 μg/ml (*n* = 3), 256 μg/ml (*n* = 23), and 512 μg/ml (*n* = 19) ZnCl₂], and ST34 (*n* = 38) isolates with either 128 μg/ml (*n* = 3)

or 256 μg/ml (*n* = 35) ZnCl₂ MICs, respectively, belonged to cluster III. In addition, one STEC isolate (IMT4632) isolated from a pig suffering from diarrhea (ST10; 256 μg/ml ZnCl₂ MIC) clustered here, too.

Because of “long-branch attraction” artifacts (42), 12 CG isolates belonging to two different phylogenetic lineages (ST218, *n* = 8 and ST993, *n* = 4) with a ZnCl₂ MIC value of 256 μg/ml were assigned to BAPS cluster IV. Also, two of the strains included for comparative reasons, i.e., one porcine ETEC-isolate (IMT203; ST100; 256 μg/ml ZnCl₂ MIC) and the high-zinc tolerant human isolate (RKI6122; ST617; 1,024 μg/ml ZnCl₂ MIC), clustered in BAPS IV, too.

Cluster V included 13 STC23-isolates (ST23, *n* = 8 [HZG: *n* = 3; CG: *n* = 5] and ST88, *n* = 5 [all CG]) associated with the 256 μg/ml ZnCl₂ MIC. Six isolates of ST3057 (HZG: *n* = 3, CG: *n* = 3) were assigned to BAPS cluster VI (256 μg/ml ZnCl₂ MIC, *n* = 4; 512 ZnCl₂ MIC, *n* = 2).

Last, BAPS cluster VII consisted of ST1607 (*n* = 3) isolates associated with 256 μg/ml ZnCl₂ MIC and ST2946 (*n* = 2) isolates associated with 512 μg/ml ZnCl₂ MIC, all originating from animals of the HZG. Four of the pathogenic *E. coli* isolates

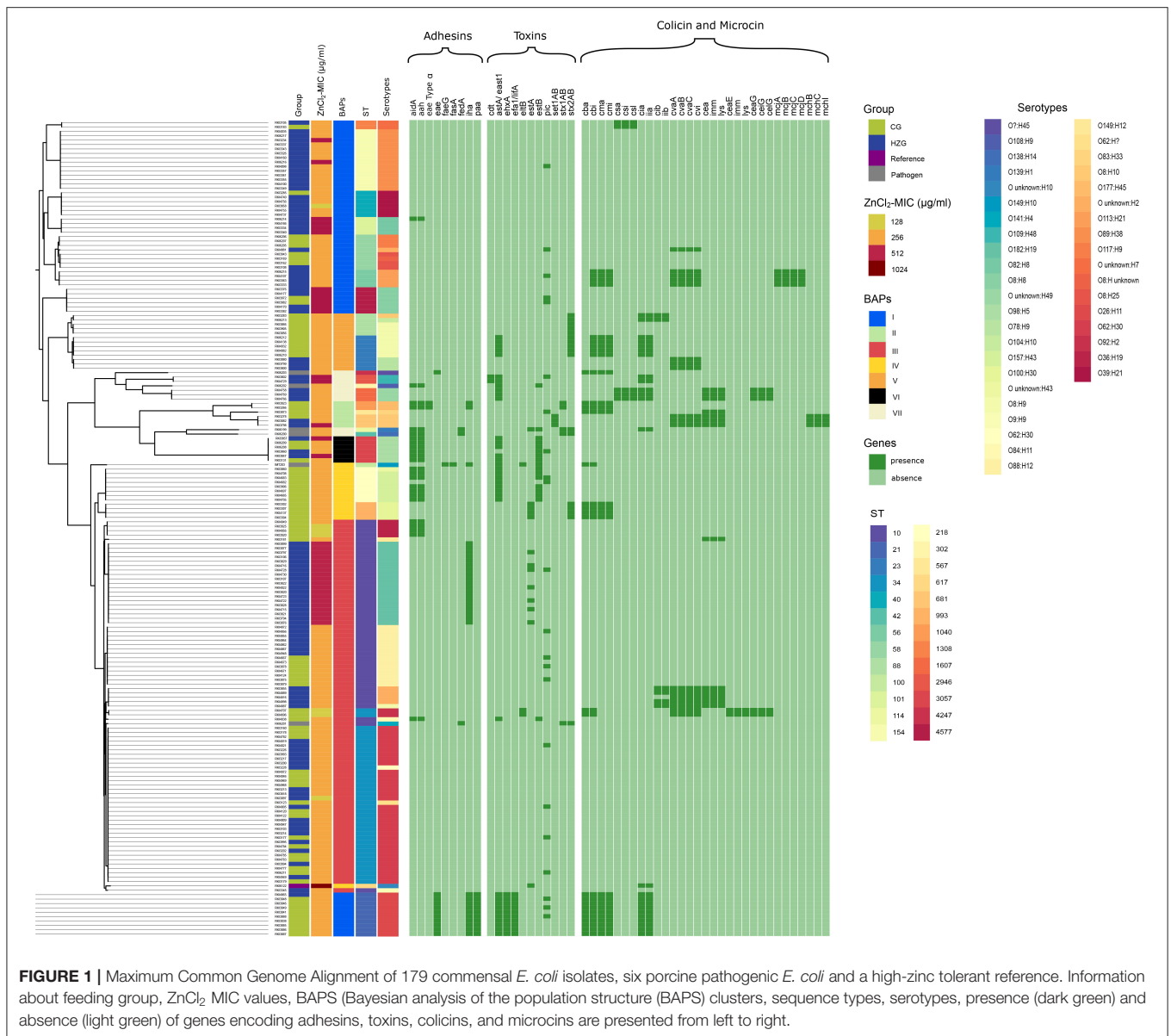


FIGURE 1 | Maximum Common Genome Alignment of 179 commensal *E. coli* isolates, six porcine pathogenic *E. coli* and a high-zinc tolerant reference. Information about feeding group, ZnCl₂ MIC values, BAPS (Bayesian analysis of the population structure (BAPS) clusters, sequence types, serotypes, presence (dark green) and absence (light green) of genes encoding adhesins, toxins, colicins, and microcins are presented from left to right.

included in our analysis (IMT19–ST42, STEC; IMT20–ST114, STEC; IMT6655–ST4247, ETEC; and IMT8071–ST302, EPEC; all associated with 256 µg/ml ZnCl₂ MIC) clustered here, too (Supplementary Table 3).

In other words, the BAPS cluster analysis mirrored the predicted serotypes and STs, irrespective of the individual isolate’s zinc tolerance level, clearly rejecting the idea of a directional association between a certain *E. coli* phylogenetic lineage and a particular zinc tolerance level or feeding group.

Distribution of VAGs in *E. coli* Genomes of the HZG and the CG

To assess the virulence potential of the isolate collection, we screened all genomes for the presence of genes that have frequently been reported as being associated with porcine enteral

diseases (Supplementary Table 1). As a result, 18 out of 24 targeted genes were identified in at least one of the screened genomes (Table 1), with the number of VAGs per isolate ranging from 0 VAGs ($n = 86$ isolates) to a maximum of 7 VAGs ($n = 3$). Interestingly, 93% of the isolates originating from the HZG but 72% of the CG isolates harbored none, one, or two VAG(s) only. Isolates harboring more than two VAGs constituted 7% of the HZG and 28% of the CG isolates, indicating an influence of high-zinc diets on the intestinal microbiota with respect to VAG-carrying *E. coli*. Regression analysis revealed that the feeding group ($p < 0.001$) as well as the respective ZnCl₂ MIC ($p < 0.001$) were associated with the number of VAGs present in an isolate. For instance, isolates belonging to the CG had 4.4 times higher odds for harboring higher numbers of VAGs (95% confidence interval: 2.0–9.8) compared to *E. coli* from the HZG.

However, the odds ratio to carry higher numbers of VAGs was 4.2 (95% confidence interval 2.4–7.4) for *E. coli* associated with the 512 $\mu\text{g/ml}$ ZnCl_2 MIC when compared to the lower MICs.

Since most of the VAGs frequently associated with enteral diseases in piglets are carried by highly mobile genetic elements (43–46), divergent distribution of VAGs even beyond ST/serotype boundaries might occur. While there was an obvious association between ST/serotypes and VAG pattern, we also noted variation, even between isolates of the same serotype obtained from one piglet (e.g., pig 1, ST21 O26:H11 or pig 4, ST10 O182:H19) (**Supplementary Table 1, Figure 1**).

Since all isolates were originally obtained from healthy piglets kept under the defined conditions of an animal experiment, the overall low detection rates for enterotoxin and adhesion encoding genes, especially for ETEC-associated fimbriae (0%), was not surprising. However, all genes encoding the 11 toxins of interest here were identified among the 179 *E. coli* (**Table 1**). Again, isolates belonging to the CG harbored more toxin encoding genes than those obtained from the HZG (56 vs. 18%).

Eight of the 179 isolates were positive for the genes encoding the heat-labile enterotoxin *eltAB* (HZG, $n = 6$; CG, $n = 2$). Twenty-five isolates carried either the heat-stable enterotoxin gene *estA* (HZG, $n = 7$; CG, $n = 4$) or *estB* (HZG, $n = 3$; CG, $n = 11$) (**Table 1**).

Shiga toxin encoding genes were completely absent in *E. coli* representing the HZG, while 16 isolates of the CG were positive (20%, $n = 16$: *stx*₁ $n = 2$ and *stx*_{2e} $n = 14$). Genes encoding other toxins including *astA* encoding the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin EAST-1 (HZG, $n = 9$; CG, $n = 26$), enterohemolysin-encoding *ehxA* (HZG, $n = 1$; CG $n = 9$) or *efa-1/lifA* (HZG, $n = 1$; CG, $n = 9$) were detected in genomes from isolates of both feeding groups (**Table 1, Supplementary Table 1**).

Considering additional factors involved in the onset of PWD in piglets (47), 21 isolates (HZG, $n = 4$; CG, $n = 17$) harbored genes encoding an adhesion-involved-in-diffuse-adherence (AIDA-I) autotransporter and the AIDA-associated heptosyltransferase (*aah*) required to fully activate AIDA-I (**Table 1**). While 14% ($n = 11$) of the CG-isolates were found positive for the *eae*- encoded intimin associated with attaching and effacing, only one (1%) HZG isolate (RK14865, ST21) was *eae*-positive, too.

According to the VAG profile, the six clinical porcine isolates included comprised two enterotoxigenic *E. coli* (ETEC—*eltAB*-and/or *estB*-positive), two Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC—*stx*₁- and *stx*₂-positive), one ETEC/STEC-hybrid (*estA*, *estB*, *stx*₁, *stx*₂), and one enteropathogenic *E. coli* (aEPEC—*eae*-positive), respectively (**Supplementary Table 2**).

Occurrence of Pathotypes Among *E. coli* Isolates With Different Zinc Tolerance Levels

The *E. coli* isolates obtained from piglets fed with a high-zinc supplemented diet showed generally a lower VAG frequency. Based on this finding, we further investigated whether a specific pathotype is associated with a particular zinc tolerance level

considering the previously determined ZnCl_2 MIC values of 128, 256, or 512 $\mu\text{g/ml}$ (22, 24) or not.

Our results showed that major diagnostic markers defining an isolate as ETEC were associated with all three different zinc tolerance levels and both feeding groups (**Table 2**). Moreover, ETEC showed a broad heterogeneity with respect to their phylogenetic backgrounds. However, genes encoding for ETEC-associated fimbriae F4, F5, F6, F18, and F41 were not identified. VAG combinations (*eae*, *paa*) that define porcine atypical EPEC (aEPEC) expressed the 256 $\mu\text{g/ml}$ ZnCl_2 MIC only, and were predominately detected among CG isolates (one exception) (**Table 2**). Isolates showing STEC characteristics were associated with the 256 $\mu\text{g/ml}$ ZnCl_2 MIC and the CG only.

The mixed logistic regression model showed that both, the ZnCl_2 MIC and the feeding group were associated with the occurrence of major diagnostic markers defining an enteral pathotype in the present *E. coli* collection. The probability for harboring major diagnostic markers defining an enteral pathotype was lower in the HZG than in the CG [$p = 0.002$, odds ratio 47.6 (95%-confidence interval: 4.3–500)]. However, the ZnCl_2 MIC 512 resulted in 58.6-fold higher odds for the presence of a major diagnostic marker ($p < 0.001$; 95% confidence interval 7.4–467.7). Nevertheless, 77% of the total variation was associated with variation between individual animals, indicating a greater similarity of *E. coli* obtained from one animal than between those of different pigs.

Distribution of BAGs in *E. coli* Genomes of the HZG and the CG

Amongst others, to kill or at least suppress the growth of non-host specific bacteria is one of the most important functions of the host-microbiota, a challenge which is fostered, beyond others, by production of plasmid-borne colicins and/or microcins (37, 51). To answer the question about whether genes required for colicin or microcin production were diversely distributed in *E. coli* obtained from different feeding groups, we screened the genomes under investigation accordingly. A detailed overview of information on aa sequence with the respective reference sequences used here for BAG identification is provided in **Supplementary Figure 1**.

Overall, 28 of 80 (35%) *E. coli* obtained from piglets belonging to the CG and 22 of 99 (22%) from the HZG harbored at least one BAG (**Table 3**). The most frequently detected BAGs were operons encoding for colicin B (*cba+cbi*: HZG $n = 1$; CG $n = 18$; *cbi* only, HZG $n = 4$; CG $n = 5$) and colicin M (HZG $n = 5$, CG $n = 21$) which are commonly co-located on a Col plasmid [(52), 35]. In addition, the plasmid carrying the colicin Ia encoding operon had a lower occurrence among the HZG isolates (HZG $n = 6$ vs. CG $n = 16$). Contrarily, the plasmid carrying the operon encoding for microcin V, one of the few actively secreted microcins (53), was more frequently associated with HZG isolates (HZG $n = 15$ vs. CG $n = 3$).

Other types were only rarely detected, including colicin S4 (HZG $n = 4$; CG $n = 1$), colicin Ib (HZG, $n = 4$; CG, $n = 2$), colicin E5 (HZG, $n = 0$; CG, $n = 2$), colicin E7 (HZG, $n = 3$; CG,

TABLE 2 | Distribution of VAG profiles including major diagnostic markers and additional determinants associated with intestinal *E. coli* pathotypes.

Serotype	ST	ZnCl ₂ MIC	Feeding group		Pathotype	Major diagnostic marker	Additional virulence determinants identified	REF
		μg/ml	HZG	CG				
O92:H2	ST34	128	0	2	ETEC	<i>eltAB</i>		(19, 34, 48)
O26:H11	ST21	256	0	7	aEPEC	<i>eae</i>	<i>iha, paa, ehxA, efa1/lifA</i>	(49)
O26:H11	ST21	256	1	2	aEPEC	<i>eae</i>	<i>iha, paa, pic, ehxA, efa1/lifA</i>	(49)
O177:H45	ST1040	256	0	2	STEC	<i>eae, stx1</i>	<i>iha, aidA, aah</i>	(50)
O84:H11	ST10	256	0	1	ETEC	<i>estB</i>		(19, 34, 48)
O157:H43	ST218	256	0	5	ETEC	<i>estB</i>	<i>aidA, aah</i>	(19, 34, 48)
O157:H43	ST218	256	0	1	ETEC	<i>estB</i>	<i>aidA, aah, pic</i>	(19, 34, 48)
Ounknown:H43	ST218	256	0	1	ETEC	<i>estB</i>	<i>aidA, aah</i>	(19, 34, 48)
O100:H30	ST993	256	0	4	ETEC/STEC	<i>estA, stx2e</i>		(19, 34, 48)
O98:H5	ST3057	256	0	3	ETEC	<i>estB</i>	<i>aidA, aah</i>	(19, 34, 48)
O98:H5	ST3057	256	1	0	ETEC	<i>estB</i>	<i>aidA, aah, pic</i>	(19, 34, 48)
O8:H8	ST4577	512	4	2	ETEC	<i>eltAB</i>		(19, 34, 48)
O8:H9	ST23	256	0	5	STEC	<i>stx2e</i>		(50)
O8:H9	ST88	256	0	3	STEC	<i>stx2e</i>		(50)
O8:H10	ST88	256	0	1	STEC	<i>stx2e</i>		(50)
O104:H10	ST88	256	0	1	STEC	<i>stx2e</i>		(50)
O182:H19	ST10	512	7	0	ETEC	<i>estA</i>	<i>iha</i>	(19, 34, 48)
O98:H5	ST3057	512	2	0	ETEC	<i>estB</i>	<i>aidA, aah</i>	(19, 34, 48)
O109:H48	ST2946	512	1	0	ETEC	<i>eltAB</i>	<i>cdt, pic</i>	(19, 34, 48)
O109:H48	ST2946	512	1	0	ETEC	<i>eltAB</i>	<i>cdt</i>	(19, 34, 48)

Screening results for 179 porcine *E. coli* with respect to the presence of major diagnostic markers defining an intestinal pathotype of importance for pigs. Sequence- and serotypes of isolates representing two different feeding groups (HZG, CG) and their respective ZnCl₂ MICs are shown. References (REF) for the major diagnostic markers and additional virulence genes (19, 34, 48–50).

ST, sequence type; HZG, high-zinc fed group; CG, control group; VAG, virulence associated genes; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; aEPEC atypical enteropathogenic *E. coli*; STEC, Shiga toxin-producing *E. coli*.

$n = 2$), microcin H47 (HZG, $n = 2$; CG, $n = 1$), and microcin J25 (HZG, $n = 4$; CG, $n = 0$).

Considering the pathogenic isolates investigated in this study, IMT203 (ETEC) and IMT8071 (EPEC) harbor genes encoding colicin B and M (Supplementary Table 2), while IMT19 (STEC) and the high-zinc tolerant reference strain RKI6122 possessed genes for colicin Ia.

Occurrence of BAGs Among *E. coli* Isolates With Different Zinc Tolerance Levels

As mentioned before, the focus of our analysis was on the three different ZnCl₂ MIC values determined for the *E. coli* collection in a previous study (22).

Of the seven 128 μg/ml ZnCl₂ MIC isolates, two harbored BAGs. Both belonged to ST34, serotype O92:H2 and were positive for genes encoding colicin B, V, E5, and E7, while the remaining *E. coli* with 128 μg/ml ZnCl₂ MIC did not carry any of the BAGs investigated.

One third of the isolates with MICs of 256 μg/ml ZnCl₂ ($n = 136$, 17 STs) carried at least one bacteriocin gene ($n = 46$, 34%). In addition, colicin M, colicin S4, colicin Ib and the microcin J25 were found to be exclusively associated with isolates showing the MIC value of 256 μg/ml for ZnCl₂ in a wide range of genomic backgrounds (Figure 1, Table 3). Isolates with a higher level of zinc tolerance (512 μg/ml MIC; $n = 36$, 7 STs) showed, by

comparison, only rarely colicin encoding genes ($n = 3$, 8.33%) (Figure 1, Table 3).

DISCUSSION

Here we showed an analysis of *E. coli* genomes representing intestinal isolates collected from piglets fed with either a zinc-rich or common piglet diet (23) which exhibited three distinct zinc tolerance levels (22). A combination of different *in silico* analyses of the WGS data provided insights into the phylogenetic structure of these 179 porcine *E. coli* and their virulence and bacteriocin associated gene profiles. At present, there is only limited information available on the genetic diversity and relatedness of intestinal *E. coli* from pigs receiving high-zinc supplemented feed (13, 16, 23, 54).

Our results confirm that a certain phylogenetic background does not contribute to a particular zinc tolerance level in *E. coli*, since the tolerance levels obviously differed even within the STs of a single BAPS cluster (Figure 1). Despite their clearly phylogenetic heterogeneity (Figure 1), all six pathogenic porcine *E. coli* included for comparative purposes were assigned to the same “middle class” zinc tolerance level (256 μg/ml ZnCl₂ MIC).

Serogroups frequently reported as being associated with diarrhea in pigs are O8, O138, O139, O141, O147, O149, and O157 (5, 20, 44, 55, 56). Our *E. coli* collection included

TABLE 3 | Occurrence and distribution of 31 BAGs among 179 porcine *E. coli*.

Gene	Protein	ZnCl ₂ MIC (μg/ml)						Feeding group			
		128		256		512		HZG		CG	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
		7	100	136	100	36	100	99	100	80	100
<i>cba</i>	Colicin B	2	29	17	13			1	1	18	23
<i>cbi</i>		2	29	26	19			5	5	23	29
<i>cma</i>	Colicin M			26	19			5	5	21	26
<i>cmi</i>				26	19			5	5	21	26
<i>csa</i>	Colicin S4			5	4			4	4	1	1
<i>csi</i>				5	4			4	4	1	1
<i>csl</i>				5	4			4	4	1	1
<i>cia</i>	Colicin Ia			20	15	2	6	6	6	16	20
<i>iia</i>				20	15	2	6	6	6	16	20
<i>cib</i>	Colicin Ib			6	4			4	4	2	3
<i>iib</i>				6	4			4	4	2	3
<i>cea</i>	Colicin E1			12	9	1	3	10	10	3	4
<i>imm</i>				12	9	1	3	10	10	3	4
<i>lys</i>				12	9	1	3	10	10	3	4
<i>ceaE</i>	Colicin E5	2	29							2	3
<i>imm</i>		2	29							2	3
<i>lys2</i>		2	29							2	3
<i>ceaG</i>	Colicin E7	2	29	3	2			3	3	2	3
<i>ceiG</i>		2	29	3	2			3	3	2	3
<i>celG</i>		2	29	3	2			3	3	2	3
<i>cvaA</i>	Microcin V	2	29	15	11	1	3	15	15	3	4
<i>cvaB</i>		2	29	15	11	1	3	15	15	3	4
<i>cvaC</i>		2	29	15	11	1	3	15	15	3	4
<i>cvi</i>		2	29	15	11	1	3	15	15	3	4
<i>mcjA</i>	Microcin J25			4	3			4	4		
<i>mcjB</i>				4	3			4	4		
<i>mcjC</i>				4	3			4	4		
<i>mcjD</i>				4	3			4	4		
<i>mchB</i>	Microcin H47			2	1	1	3	2	2	1	1
<i>mchC</i>				2	1	1	3	2	2	1	1
<i>mchl</i>				2	1	1	3	2	2	1	1

BAG screening results for 179 porcine *E. coli* representing two feeding groups associated with different ZnCl₂ MICs are displayed.

ST, sequence type; HZG, high-zinc fed group; CG, control group; BAC, bacteriocin associated genes.

a total of $n = 23$ isolates belonging to O8 (different H-types), one O149:H12 and seven O157:H43 isolates (**Supplementary Table 1**). Besides its association with porcine diarrhea, O157 isolates are of clinical importance for human patients, since Shiga toxin-producing *E. coli* of this particular serotype have been reported as a cause of severe foodborne illnesses (57, 58). Considering the collection investigated here, strains of this serotype were exclusively found in the CG, associated with the 256 μg/ml ZnCl₂ MIC, harboring two to five VAGs, but all were negative for genes encoding Shiga toxins.

Isolates belonging to the O8 serogroup were detected in samples from both feeding groups, but more frequently in those representing the CG (HZG, $n = 8$; CG, $n = 15$). Interestingly,

these CG isolates harbored none to two VAGs, including $n=9$ that are *stx2e*-positive, while Shiga toxin-encoding genes were completely absent from isolates of HZG samples.

Despite the high standards of the animal trial performed and the good health status of the animals during the whole trial period (23), our strain collection apparently included *E. coli* belonging to serotypes frequently associated with disease. In addition, isolates harboring key pathogenic markers defining pathotypes (**Table 2**) were identified as well, but they were less frequent among isolates representing the HZG, indicating a possible prophylactic effect of the feed additive. It also underlines the importance of the husbandry conditions to ensure a healthy gut microbiome (59), and, in line with this -to minimize the necessity of antibiotic

consumption affecting the natural composition of the intestinal microbiota (60).

Furthermore, we identified serotype O26 : H11 belonging to ST21 (**Supplementary Table 1**), a strain background mainly reported for isolates of human and bovine origin and presumptively associated with EPEC and STEC/EHEC pathotypes (61–65). Previously, aEPEC strains of ST21-O26:H11 showed a close phylogenetic relationship to STEC/EHEC and the results of lysogenic conversion experiments using *stx*-depleted bacteriophage identified aEPEC (ST21-O26:H11) as progenitors of typical EHEC (66). Atypical EPEC (ST21-O26:H11) were also identified in our isolate collection, harboring a combination of VAGs (*eae*-positive, *stx*-negative, *bfp*-negative) meeting criteria for possible progenitor of human-pathogenic STEC/EHEC (67, 68).

While there is generally a strong association between genetic background and accessory gene content including VAGs and BAGs in our isolate collection, their occurrence and distribution were not solely lineage-specific: Some of the VAGs investigated here, for instance *iha*, *estA* and *estB* were present in different (**Figure 1, Table 1**). The EAEC associated enterotoxin EAST-1 (*astA*) was detected in *E. coli* from both feeding groups. While it has been assumed that there is an association between this toxin and diarrhea in humans and pigs (30, 31, 69), a further study found higher *astA* rates in *E. coli* from healthy pigs compared to isolates obtained from clinically ill pigs, questioning the particular role of *astA* as a virulence factor in porcine *E. coli* (32). In addition, the occurrence of one or a few VAGs alone does not necessarily reflect the pathogenic potential of *E. coli*, unless the strain acquires a compatible combination of VAGs able to cause disease in a specific host species (70).

The logistic regression applied in the present study revealed a positive association between the presence of *E. coli* major diagnostic markers and the 512 µg/ml ZnCl₂ MIC. However, whether these *E. coli* are able to cause enteral disorders in piglets needs to be further studied. The heat stable enterotoxin I encoded by *estA*, which is the most common pathogenic marker associated with the 512 µg/ml ZnCl₂ MIC, has been reported as a cause of neonatal diarrhea in different animals. This enterotoxin seems to be associated with ETEC causing PWD as well, but rarely as the sole enterotoxin (5). However, none of the six porcine pathogenic *E. coli* variants (aEPEC, ETEC, STEC; ETEC/STEC) included in our study for comparative purposes exhibited the 512 µg/ml ZnCl₂ MIC (**Table 2**), possibly suggesting that pathogenic field strains commonly lack enhanced zinc tolerance.

Following this line of thought, it seems likely that zinc does not only affect the overall composition of the porcine *E. coli* intestinal population favoring phenotypes with enhanced zinc tolerance (22, 71), but also reduces the abundance of potentially harmful (field) strains. These effects possibly provide an explanation for former observations indicating an increase in relative abundance of intestinal *Enterobacteriales* among piglets fed with high amounts of zinc (72, 73), while the occurrence of PWD and detection of pathogenic bacteria seemed to decrease coincidentally (74).

Our findings might also indicate the presence of a zinc-tolerant subpopulation of *E. coli* carrying genetic marker for

the intestinal pathotypes. In the environment of an animal trial with high-standard hygienic conditions, this subpopulation might not be able to proliferate well enough to cause disease, but the presence of this subpopulation indicates the importance of housing conditions, feed and water hygiene and prophylactic measures like vaccinations to maintain a healthy animal population and produce a safe food product.

Since fimbriae are key features of pathogenic *E. coli* in pigs (20, 30, 75–77), we were not surprised that our collection of isolates obtained from healthy piglets lacked these particular genes (**Table 1**). Notably, a former study investigating 844 *E. coli* isolates from PWD-affected pig farms in Europe showed that the prevalence of genes encoding fimbriae was low even among PWD-associated ETEC (9% F4 fimbriae; 9% F18 fimbriae) from Germany (19), possibly indicating that further factors might play a role in the pathogenesis of *E. coli* in PWD.

Moreover, previous research has also shown that the bacteriophage-encoded genes *stx*₁ and *stx*₂ are upregulated by DNA-damage induced activation of the SOS-response (78, 79), while zinc excess has been shown to mute the SOS-response via inhibition of *recA* (80). In addition, zinc is also known to inhibit expression of further VAGs (81), including those promoting adherence to the gut epithelium (i.e., *esp* genes) (82). In consequence, pathogenic strains might lose their ability to harm the host, which has exemplarily been demonstrated for STEC as well as EPEC before (82).

Since bacteriocins promote the producing bacterial cells while competing for resources in a distinct ecological niche with other *E. coli* strains and closely related bacteria, they probably play an important role in structuring microbial communities residing in the gut (83). In addition, activity of particular bacteriocin-producing *E. coli* toward competing bacteria, e.g., STEC O157:H7, has been reported (84, 85). This led us to investigate if HZG-*E. coli* and/or those isolates associated with the 512 µg/ml ZnCl₂ MIC harbor either more BAGs or a certain BAG pattern (**Figure 1, Table 3**). Yet, similar to the results for VAGs, BAGs seem to be less common among isolates representing the HZG and especially less common among the group of *E. coli* expressing the 512 µg/ml ZnCl₂ MIC.

The general structural organization of the colicin encoding operons includes at least two, usually three genes (i.e., activity gene, gene encoding the immunity protein and gene encoding the lysis protein), which are commonly co-located on a large conjugative plasmid in *E. coli* (52, 86, 87). Colicins B and M are among the most common colicins in porcine *E. coli* (12, 19, 23, 88). While most of the colicins are released by cell death of the producing cell only, these colicins are among the few actively secreted bacteriocins (53) and their production might therefore be less “costly” (89). In our dataset, colicin B and M were frequently associated with isolates belonging to the CG, while rarely detected among isolates of the HZG (**Table 3**). For most colicins, induction is assumed to be associated with the DNA-damage induced SOS response (90). However, recent research indicated the production of biologically significant amounts of several colicins in the absence of such stress (91). Furthermore, colicin M was found to be secreted despite the absence of the SOS box believed to regulate its production

(88). Consequently, higher detection rates of genes encoding colicin M might be a result from its less severe “production consequences” for the individual cell, since cell death is not a prerequisite for its release. Interestingly, genes encoding colicin BM were found in BAPS cluster I, II, IV and V (Figure 1), but all these isolates lack zinc tolerance above the mid-range 256 $\mu\text{g/ml}$ ZnCl_2 MIC (Supplementary Table 1). The complete absence of colicin BM genes in isolates associated with enhanced zinc tolerance (isolates distributed within BAPS cluster I, II, III, VI and VII) suggests that co-occurrence of enhanced zinc tolerance with colicin BM production lacks a beneficial outcome for intestinal *E. coli* in piglets fed with high amounts of zinc. However, more investigation on this subject is clearly needed.

Contrarily, the operon encoding microcin V was more associated with isolates from the HZG than the CG, however it was also rarely associated with isolates with a 512 $\mu\text{g/ml}$ ZnCl_2 MIC. The expression of the immunity protein (Cvi) of this operon depends on the presence of iron [reviewed in (53)], since the *cvi* promoter region is associated with a previously identified binding site for the ferric uptake regulation protein (Fur) (53, 92). Interestingly, zinc excess was reported to increase the bacterial demand for iron (93), and microcin V activation might increase the chances of bacteria to benefit from iron released by dead competing populations. However, more research on functional interactions of bacteria under zinc-induced stress is needed, which left speculation only considering the interlinkages of microcin V expression and zinc excess.

CONCLUSION

Our analysis comprising 179 *E. coli* obtained from piglets of two different feeding groups using Bayesian analysis of the genomes showed a population structure (BAPS) which lacked an association between a particular zinc tolerance level and a phylogenetic cluster or even branch for both, isolates belonging to the HZG and CG, suggesting that zinc tolerance is not a characteristic of a particular phylogenetic background. In addition, detection rates for genes and operons associated with virulence (VAG) and bacteriocins (BAG) were lower in isolates originating from the HZG (41 vs. 65% and 22 vs. 35%, $p < 0.001$ and $p = 0.002$, resp.), indicating an effect of high-zinc supplementation of the piglets' diet on the occurrences of these genes among intestinal *E. coli* populations.

This effect seems to be more even more important considering *E. coli* harboring genes defining distinct pathotypes associated with intestinal disease, i.e., enterotoxigenic, enteropathogenic and Shiga toxin-producing *E. coli* (EPEC, EPEC and STEC), which constituted only 1% of the isolates belonging to the HZG but 14% of those from the CG, supporting previous observations that high zinc supplemented diets for piglets were associated with a decrease of PWD.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary Material. Illumina raw read data for 186 *E. coli* are available at NCBI Bioproject ID PRJNA552271.

ETHICS STATEMENT

The representative set of *E. coli* isolates investigated here was selected based on a previous feeding trial (23) carried out in accordance with the principles of the Basel Declaration following the institutional and national guidelines for the care and use of animals. The animal study was reviewed and approved by the local state office of occupational health and technical safety Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin (LaGeSo Reg. Nr. 0296/13) as described before (23).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LW, AL-B, and AB designed the project. VJ and BW conceived and designed the experiments. IE sequenced the isolates. VJ performed laboratory analysis. VJ, BW, LE, AB, TS, FG, and RM analyzed the data. VJ, AB, BW, and LW wrote the article. All authors have read and approved the final draft of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG no. WI 1436/12-1). AL-B, AB, and BW were supported by the project #1Health-PREVENT (Grant Nos. 01KI1727F and 01KI1727D) from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF). LE was supported by the project PAC-CAMPY (Grant No. 01KI1725F) within the German Research Network of Zoonotic Diseases. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thanked Julia Assmann, Charlotte Huber, Anne Kauter, and the colleagues from the Advanced Light and Electron Microscopy (ZBS-4) department of the Robert Koch Institute for their individual contribution and support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.614513/full#supplementary-material>

REFERENCES

1. Guevarra RB, Lee JH, Lee SH, Seok M-J, Kim DW, Kang BN, et al. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *J Anim Sci Biotechnol.* (2019) 10:1. doi: 10.1186/s40104-018-0308-3
2. Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol.* (2013) 4:19–19. doi: 10.1186/2049-1891-4-19
3. Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van De Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends Microbiol.* (2017) 25:851–73. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.004
4. Liu Y, Espinosa CD, Abelilla JJ, Casas GA, Lagos LV, Lee SA, et al. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: a review. *Anim Nutr.* (2018) 4:113–25. doi: 10.1016/j.aninu.2018.01.007
5. Fairbrother JM, Nadeau É, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev.* (2005) 6:17–39. doi: 10.1079/AHR2005105
6. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe.* (2007) 2:119–29. doi: 10.1016/j.chom.2007.06.010
7. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev.* (2017) 279:70–89. doi: 10.1111/imr.12567
8. Destoumieux-Garçon D, Peduzzi J, Rebuffat S. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie.* (2002) 84:511–9. doi: 10.1016/S0300-9084(02)01411-6
9. Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Llobès R, Postle K, et al. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2007) 71:158–229. doi: 10.1128/MMBR.00036-06
10. Flaherty RA, Freed SD, Lee SW. The wide world of ribosomally encoded bacterial peptides. *PLoS Pathog.* (2014) 10:e1004221. doi: 10.1371/journal.ppat.1004221
11. Bosák J, Hrala M, Pirková V, Mícenková L, Cížek A, Smola J, et al. Porcine pathogenic *Escherichia coli* strains differ from human fecal strains in occurrence of bacteriocin types. *Vet Microbiol.* (2019) 232:121–7. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.04.003
12. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand.* (2017) 59:31–31. doi: 10.1186/s13028-017-0299-7
13. Bednorz C, Oelgeschläger K, Kinneemann B, Hartmann S, Neumann K, Pieper R, et al. The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *Int J Med Microbiol.* (2013) 303:396–403. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.06.004
14. Kloubert V, Blaabjerg K, Dalgaard TS, Poulsen HD, Rink L, Wessels I. Influence of zinc supplementation on immune parameters in weaned pigs. *J Trace Elem Med Biol.* (2018) 49:231–40. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.01.006
15. Broom LJ, Miller HM, Kerr KG, Knapp JS. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. *Res Vet Sci.* (2006) 80:45–54. doi: 10.1016/j.rvsc.2005.04.004
16. Starke IC, Pieper R, Neumann K, Zentek J, Vahjen W. The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. *FEMS Microbiol Ecol.* (2014) 87:416–27. doi: 10.1111/1574-6941.12233
17. Wang W, Van Noten N, Degroote J, Romeo A, Vermeir P, Michiels J. Effect of zinc oxide sources and dosages on gut microbiota and integrity of weaned piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* (2019) 103:231–41. doi: 10.1111/jpn.12999
18. Chapman TA, Wu X-Y, Barchia I, Bettelheim KA, Driesen S, Trott D, et al. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol.* (2006) 72:4782–95. doi: 10.1128/AEM.02885-05
19. Luppi A, Gibellini M, Gin T, Vangroenweghe F, Vandenbroucke V, Bauerfeind R, et al. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Manage.* (2016) 2:20. doi: 10.1186/s40813-016-0039-9
20. Frydendahl K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol.* (2002) 85:169–82. doi: 10.1016/S0378-1135(01)00504-1
21. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Micro.* (2004) 2:123–40. doi: 10.1038/nrmicro818
22. Johanns VC, Ghazisaeedi F, Epping L, Semmler T, Lübke-Becker A, Pfeifer Y, et al. Effects of a four-week high-dosage zinc oxide supplemented diet on commensal *Escherichia coli* of weaned pigs. *Front Microbiol.* (2019) 10:2734. doi: 10.3389/fmicb.2019.02734
23. Ciesinski L, Guenther S, Pieper R, Kalisch M, Bednorz C, Wieler LH. High dietary zinc feeding promotes persistence of multi-resistant *E. coli* in the swine gut. *PLoS ONE.* (2018) 13:e0191660. doi: 10.1371/journal.pone.0191660
24. Deus D, Krischek C, Pfeifer Y, Sharifi AR, Fiegen U, Reich F, et al. Comparative analysis of the susceptibility to biocides and heavy metals of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates of human and avian origin, Germany. *Diagn Microbiol Infect Dis.* (2017) 88:88–92. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.023
25. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* (2017) 13:e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595
26. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* (2014) 30:2068–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
27. Von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, et al. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet.* (2014) 46:1321. doi: 10.1038/ng.3145
28. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* (2014) 30:1312–3. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033
29. Tang J, Hanage WP, Fraser C, Corander J. Identifying currents in the gene pool for bacterial populations using an integrative approach. *PLoS Comput Biol.* (2009) 5:e1000455. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000455
30. Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, et al. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *Vet J.* (2007) 174:176–87. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.05.019
31. Liu W, Yuan C, Meng X, Du Y, Gao R, Tang J, et al. Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. *Vet J.* (2014) 199:286–9. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.11.019
32. Zajacova ZS, Konstantinova L, Alexa P. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in *astA* positive strains. *Vet Microbiol.* (2012) 154:369–75. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.07.029
33. Schierack P, Steindruck H, Kleta S, Vahjen W. Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. *Appl Environ Microbiol.* (2006) 72:6680–6. doi: 10.1128/AEM.02952-05
34. Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus.* (2016) 7:1–47. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016
35. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* (2012) 50:1355–61. doi: 10.1128/JCM.06094-11
36. Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J Clin Microbiol.* (2015) 53:2410–26. doi: 10.1128/JCM.00008-15
37. Hardy KG, Meynell GG, Dowman JE, Spratt BG. Two major groups of colicin factors: their evolutionary significance. *Mol Gen Genet.* (1973) 125:217–30. doi: 10.1007/BF00270744
38. Pils H, Smajs D, Braun V. Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the *Escherichia coli* outer membrane. *J Bacteriol.* (1999) 181:3578–81. doi: 10.1128/JB.181.11.3578-3581.1999
39. Riley MA, Cadavid L, Collett MS, Neely MN, Adams MD, Phillips CM, et al. The newly characterized colicin Y provides evidence of positive selection in pore-former colicin diversification. *Microbiology.* (2000) 146:1671–7. doi: 10.1099/00221287-146-7-1671
40. Gordon DM, Oliver E, Littlefield-Wyer J. The diversity of bacteriocins in gram-negative bacteria. In: MA Riley, MA Chavan, editors. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 5–18. doi: 10.1007/978-3-540-36604-1_2

41. Mícenková L, Bosák J, Kucera J, Hrala M, Dolejšová T, Šedo O, et al. Colicin Z, a structurally and functionally novel colicin type that selectively kills enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Sci Rep.* (2019) 9:11127. doi: 10.1038/s41598-019-47488-8
42. Bergsten J. A review of long-branch attraction. *Cladistics.* (2005) 21:163–93. doi: 10.1111/j.1096-0031.2005.00059.x
43. Mainil JG, Daube G, Jacquemin E, Pohl P, Kaeckenbeeck A. Virulence plasmids of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from piglets. *Vet Microbiol.* (1998) 62:291–301. doi: 10.1016/S0378-1135(98)00225-9
44. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) in farm animals. *Vet Res.* (1999) 30:259–84.
45. Muniesa M, Recktenwald J, Bielaszewska M, Karch H, Schmidt H. Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect Immun.* (2000) 68:4850–5. doi: 10.1128/IAI.68.9.4850-4855.2000
46. Fekete PZ, Gerardin J, Jacquemin E, Mainil JG, Nagy B. Replicon typing of F18 fimbriae encoding plasmids of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* strains from porcine postweaning diarrhoea and oedema disease. *Vet Microbiol.* (2002) 85:275–84. doi: 10.1016/S0378-1135(01)00515-6
47. Niewerth U, Frey A, Voss T, Le Bouguéne C, Baljer G, Franke S, et al. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol.* (2001) 8:143–9. doi: 10.1128/CDLI.8.1.143-149.2001
48. Moredo FA, Piñeyro PE, Márquez GC, Sanz M, Colello R, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* subclinical infection in pigs: bacteriological and genotypic characterization and antimicrobial resistance profiles. *Foodborne Pathog Dis.* (2015) 12:704–11. doi: 10.1089/fpd.2015.1959
49. García-Meniño I, García V, Mora A, Díaz-Jiménez D, Flament-Simon SC, Alonso MP, et al. Swine Enteric Colibacillosis in Spain: Pathogenic Potential of mcr-1 ST10 and ST131 *E. coli* isolates. *Front Microbiol.* (2018) 9:2659. doi: 10.3389/fmicb.2018.02659
50. Tseng M, Fratamico PM, Bagi L, Delannoy S, Fach P, Manning SD, et al. Diverse virulence gene content of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from finishing swine. *Appl Environ Microbiol.* (2014) 80:6395–402. doi: 10.1128/AEM.01761-14
51. Pultz NJ, Stiefel U, Subramanyan S, Helfand MS, Donskey CJ. Mechanisms by which anaerobic microbiota inhibit the establishment in mice of intestinal colonization by vancomycin-resistant *Enterococcus*. *J Infect Dis.* (2005) 191:949–56. doi: 10.1086/428090
52. Ölschläger T, Schramm E, Braun V. Cloning and expression of the activity and immunity genes of colicins B and M on ColBM plasmids. *Mol Gen Genet.* (1984) 196:482–7. doi: 10.1007/BF00436196
53. Baquero F, Lanza VF, Baquero M-R, Del Campo R, Bravo-Vázquez DA. Microcins in Enterobacteriaceae: peptide antimicrobials in the eco-active intestinal chemosphere. *Front Microbiol.* (2019) 10:2261. doi: 10.3389/fmicb.2019.02261
54. Ahmed S, Olsen JE, Herrero-Fresno A. The genetic diversity of commensal *Escherichia coli* strains isolated from non-antimicrobial treated pigs varies according to age group. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0178623. doi: 10.1371/journal.pone.0178623
55. Harel J, Lapointe H, Fallara A, Lortie LA, Bigras-Poulin M, Larivière S, et al. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol.* (1991) 29:745–52. doi: 10.1128/JCM.29.4.745-752.1991
56. Salajka E, Salajkova Z, Alexa P, Hornich M. Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhoea in pigs. *Vet Microbiol.* (1992) 32:163–75. doi: 10.1016/0378-1135(92)90103-Z
57. Park S, Worobo RW, Durst RA. *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. *Crit Rev Biotechnol.* (2001) 21:27–48. doi: 10.1080/20013891081674
58. Devleeschauwer B, Pires SM, Young I, Gill A, Majowicz SE, Study T. Associating sporadic, foodborne illness caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* with specific foods: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Epidemiol Infect.* (2019) 147:e235. doi: 10.1017/S0950268819001183
59. Pluske JR, Turpin DL, Kim J-C. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Anim Nutr.* (2018) 4:187–96. doi: 10.1016/j.aninu.2017.12.004
60. Fouchse JM, Zijlstra RT, Willing BP. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Anim Front.* (2016) 6:30–6. doi: 10.2527/af.2016-0031
61. Eichhorn I, Heidemanns K, Semmler T, Kinnemann B, Mellmann A, Harmsen D, et al. Highly virulent non-O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes reflect similar phylogenetic lineages, providing new insights into the evolution of EHEC. *Appl Environ Microbiol.* (2015) 81:7041–7. doi: 10.1128/AEM.01921-15
62. Januszkiewicz A, Wołkiewicz T, Chróst A, Szych J. Characterization of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 isolated from human in Poland between 1996 and 2014. *Lett Appl Microbiol.* (2015) 60:605–8. doi: 10.1111/lam.12413
63. Ferdous M, Friedrich AW, Grundmann H, De Boer RF, Croughs PD, Islam MA, et al. Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates obtained from two Dutch regions using whole genome sequencing. *Clin Microbiol Infect.* (2016) 22:642.e641-649. doi: 10.1016/j.cmi.2016.03.028
64. Gonzalez-Escalona N, Toro M, Rump LV, Cao G, Nagaraja TG, Meng J. Virulence gene profiles and clonal relationships of *Escherichia coli* O26:H11 isolates from feedlot cattle as determined by whole-genome sequencing. *Appl Environ Microbiol.* (2016) 82:3900–12. doi: 10.1128/AEM.00498-16
65. Ishijima N, Lee K-I, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Yoneda S, Iguchi A, et al. Identification of a new virulent clade in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- sequence type 29. *Sci Rep.* (2017) 7:43136. doi: 10.1038/srep43136
66. Eichhorn I, Heidemanns K, Ulrich RG, Schmidt H, Semmler T, Fruth A, et al. Lysogenic conversion of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) from human, murine, and bovine origin with bacteriophage Φ 3538 Δ stx2(2)::cat proves their enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) progeny. *Int J Med Microbiol.* (2018) 308:890–8. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.06.005
67. Bielaszewska M, Köck R, Friedrich A, Eiff C, Zimmerhackl L, Karch H, et al. Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS ONE.* (2007) 2:e1024. doi: 10.1371/journal.pone.0001024
68. Ferdous M, Zhou K, Mellmann A, Morabito S, Pd C, Boer DR, et al. Are Shiga toxin negative *Escherichia coli* O157:H7 enteropathogenic or 1 enterohaemorrhagic *Escherichia coli*? A comprehensive molecular analysis using whole genome sequencing. *J Clin Microbiol.* (2015) 53:3530–8. doi: 10.1128/JCM.01899-15
69. Beutin L, Krüger U, Krause G, Miko A, Martin A, Strauch E. Evaluation of major types of Shiga toxin 2E-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans. *Appl Environ Microbiol.* (2008) 74:4806–16. doi: 10.1128/AEM.00623-08
70. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. In: U Dobrindt, JH Hacker, C Svanborg, editors. *Between Pathogenicity and Commensalism* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg). p. 3–32. doi: 10.1007/82_2012_303
71. Ghazisaeedi F, Ciesinski L, Bednorz C, Johanns V, Pieper L, Tedin K, et al. Phenotypic zinc resistance does not correlate with antimicrobial multi-resistance in fecal *E. coli* isolates of piglets. *Gut Pathogens.* (2020) 12:4. doi: 10.1186/s13099-019-0342-5
72. Pieper R, Vahjen W, Neumann K, Van Kessel AG, Zentek J. Dose-dependent effects of dietary zinc oxide on bacterial communities and metabolic profiles in the ileum of weaned pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr.* (2012) 96:825–33. doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01231.x
73. Yu T, Zhu C, Chen S, Gao L, Lv H, Feng R, et al. Dietary high zinc oxide modulates the microbiome of ileum and colon in weaned piglets. *Front Microbiol.* (2017) 8:825. doi: 10.3389/fmicb.2017.00825
74. Sales J. Effects of pharmacological concentrations of dietary zinc oxide on growth of post-weaning pigs: a meta-analysis. *Biol Trace Elem Res.* (2013) 152:343–9. doi: 10.1007/s12011-013-9638-3
75. Wu X-Y, Chapman T, Trott DJ, Bettelheim K, Do TN, Driesen S, et al. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs. *Appl Environ Microbiol.* (2007) 73:83–91. doi: 10.1128/AEM.00990-06

76. Smith MG, Jordan D, Chapman TA, Chin JJC, Barton MD, Do TN, et al. Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. *Vet Microbiol.* (2010) 145:299–307. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.04.004
77. Luise D, Lauridsen C, Bosi P, Trevisi P. Methodology and application of *Escherichia coli* F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs. *J Anim Sci Biotechnol.* (2019) 10:53–53. doi: 10.1186/s40104-019-0352-7
78. Pacheco AR, Sperandio V. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* (2012) 2:81. doi: 10.3389/fcimb.2012.00081
79. Berger M, Aijaz I, Berger P, Dobrindt U, Koudelka G. Transcriptional and translational inhibitors block SOS response and shiga toxin expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Sci Rep.* (2019) 9:18777. doi: 10.1038/s41598-019-55332-2
80. Bunnell BE, Escobar JF, Bair KL, Sutton MD, Crane JK. Zinc blocks SOS-induced antibiotic resistance via inhibition of RecA in *Escherichia coli*. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0178303. doi: 10.1371/journal.pone.0178303
81. Xue Y, Osborn J, Panchal A, Mellies JL. The RpoE stress response pathway mediates reduction of the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli* by zinc. *Appl Environ Microbiol.* (2015) 81:3766–74. doi: 10.1128/AEM.00507-15
82. Crane JK, Broome JE, Reddinger RM, Werth BB. Zinc protects against Shiga-toxigenic *Escherichia coli* by acting on host tissues as well as on bacteria. *BMC Microbiol.* (2014) 14:145. doi: 10.1186/1471-2180-14-145
83. Zhao Z, Orfe LH, Liu J, Lu S-Y, Besser TE, Call DR. Microcin PDI regulation and proteolytic cleavage are unique among known microcins. *Sci Rep.* (2017) 7:42529. doi: 10.1038/srep42529
84. Sawant AA, Casavant NC, Call DR, Besser TE. Proximity-dependent inhibition in *Escherichia coli* isolates from cattle. *Appl Environ Microbiol.* (2011) 77:2345. doi: 10.1128/AEM.03150-09
85. Cameron A, Zaheer R, Adator EH, Barbieri R, Reuter T, Mcallister TA. Bacteriocin occurrence and activity in *Escherichia coli* isolated from bovines and wastewater. *Toxins.* (2019) 11:475. doi: 10.3390/toxins11080475
86. Šasárman A, Massie B, Zollinger M, Gagne-Tellier H, Shareck F, Garzon S, et al. Naturally occurring R.ColBM plasmids belonging to the IncFIII incompatibility group. *J. Gen. Microbiol.* (1980) 119:475–83. doi: 10.1099/00221287-119-2-475
87. Gordon DM, O'Brien CL. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology.* (2006) 152:3239–44. doi: 10.1099/mic.0.28690-0
88. Christenson JK, Gordon DM. Evolution of colicin BM plasmids: the loss of the colicin B activity gene. *Microbiology.* (2009) 155:1645–55. doi: 10.1099/mic.0.026666-0
89. Harkness RE, Olschläger T. The biology of colicin M. *FEMS Microbiol Rev.* (1991) 8:27–41. doi: 10.1016/0168-6445(91)90004-2
90. Lu FM, Chak KF. Two overlapping SOS-boxes in ColE operons are responsible for the viability of cells harboring the Col plasmid. *Mol Gen Genet.* (1996) 251:407–11. doi: 10.1007/BF02172368
91. Mavridou DaI, Gonzalez D, Kim W, West SA, Foster KR. Bacteria use collective behavior to generate diverse combat strategies. *Curr Biol.* (2018) 28:345–355. doi: 10.1016/j.cub.2017.12.030
92. Boyer AE, Tai PC. Characterization of the *cvaA* and *cvi* Promoters of the Colicin V export system: iron-dependent transcription of *cvaA* is modulated by downstream sequences. *J Bacteriol.* (1998) 180:1662. doi: 10.1128/JB.180.7.1662-1672.1998
93. Xu Z, Wang P, Wang H, Yu ZH, Au-Yeung HY, Hirayama T, et al. Zinc excess increases cellular demand for iron and decreases tolerance to copper in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* (2019) 294:16978–91. doi: 10.1074/jbc.RA119.010023

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Johannis, Epping, Semmler, Ghazisaeedi, Lübke-Becker, Pfeifer, Eichhorn, Merle, Bethe, Walther and Wieler. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4. Weiterführende Diskussion

Die Vorstellung der Methoden, Ergebnisse sowie die Diskussion der Studienergebnisse befinden sich in den zuvor genannten zwei Veröffentlichungen (**Publikation I** „Effects of a Four-Week High-Dosage Zinc Oxide Supplemented Diet on Commensal *Escherichia coli* of Weaned Pigs.“ und **Publikation II** „High-zinc supplementation of weaned piglets affects frequencies of virulence and bacteriocin associated genes among intestinal *Escherichia coli* populations“). Im Folgenden werden übergreifend verschiedene Aspekte der Studien diskutiert: (1) die Herausforderungen im Hinblick auf den Nachweis einer Zink- resp. Schwermetallresistenz gegenüber dem Nachweis einer antimikrobiellen Resistenz, (2) die Verbreitung von Schwermetall-Resistenzen in der Umwelt und (3) Colicine und deren mögliche Wirkung auf Pathogene. Abschließend werden (4) mögliche weitere Forschungsansätze bezüglich der Mechanismen diskutiert, welche zu einer Zinktoleranz führen könnten.

4.1. Die Herausforderungen im Hinblick auf den phänotypischen und genotypischen Nachweis einer Zink- resp. Schwermetallresistenz gegenüber dem Nachweis einer antimikrobiellen Resistenz

4.1.1. Der phänotypische Nachweis

Die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen kann mit verschiedenen Verfahren bestimmt werden. Die phänotypischen Empfindlichkeitsprüfungen werden unter anderem häufig mittels Agardiffusions- und Agardilutionstests, Makro- resp. Mikrodilutionsverfahren oder mit sogenannten E-tests *in vitro* durchgeführt. Für die Durchführung liegen standardisierte Methoden von verschiedenen Organisationen vor, wie das Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), das Deutsche Institut für Normung e.V. (DIN) (Schwarz et al. 2010b) oder das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Kahlmeter et al. 2003). Die Einhaltung dieser Standards erlaubt die Vergleichbarkeit der Prüfungsergebnisse zwischen einzelnen Laboren und sichert die Qualität und Aussagekraft der Prüfergebnisse. Durch molekularbiologische Untersuchungen, wie PCR-Assays oder DNA-Mikroarrays, zur Detektion von Resistenz-vermittelnden Faktoren werden Gene bzw. Genmutationen lokalisiert, die für eine spezifische Resistenz verantwortlich sind (Louie und Cockerill 2001). Zur Bestimmung von Empfindlichkeiten von pathogenen Bakterien gegenüber Schwermetallen sind standardisierte Methoden bislang selten. Meist wird auf standardisierte Vorgehensweisen zur Prüfung der Empfindlichkeit von Bakterien gegen Antibiotika zurückgegriffen. Hier werden besonders häufig Mikrodilutionsverfahren verwendet (Yang et al. 2020; Sütterlin et al. 2018; Deus et al. 2017), aber auch andere Methoden wie der Agardiffusionstest kommen zum Einsatz (Kourmouli et al. 2018; Hassen et al. 1998).

Für die Auswertung der Ergebnisse der antimikrobiellen Resistenzbestimmung bzw. die Interpretation der Ergebnisse für die Therapie einer Erkrankung in resistent, intermediär oder sensibel sind ebenfalls standardisierte Verfahren erforderlich, beispielsweise nach passenden CLSI-Dokumenten M31-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute 2018) oder nach EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2020). Der Konzentrationsbereich des gewählten Wirkstoffes wird anhand derzeit verfügbarer klinischer Grenzwerte (engl. Clinical Breakpoints) sowie anhand der verfügbaren Qualitätskontrollbereiche („QC-Bereiche“) ausgewählt (Wallmann et al. 2014). Die klinischen Grenzwerte berücksichtigen (1) pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter, (2) Dosierung des Wirkstoffes, (3) Applikationsart und -form, (4) die Wirkstoffkonzentration, die am Infektionsort erreicht wird, (5) die MHK-Werte der zu bekämpfenden Erreger sowie die Ergebnisse klinischer Wirksamkeitsprüfungen (Wallmann et al. 2014; Schwarz et al. 2010a). Diese werden beispielsweise von der CLSI für die Veterinärmedizin in den CLSI-Dokumenten VET01-A4 (Clinical and Laboratory Standards Institute 2018) sowie deren Nachfolgedokumente veröffentlicht. Seit 2015 gibt es das Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (VetCAST) im Rahmen der EUCAST mit dem Ziel, klinische Grenzwerte für den europäischen Raum bereitzustellen (VetCAST). Trotz alledem gibt es nicht für jeden Erreger und jeden Wirkstoff, jede Tierart und jede Indikation Bewertungskriterien in der Veterinärmedizin. Unter anderem arbeitet aktuell die Arbeitsgruppe 3 des European Network for Optimization of Veterinary Antimicrobial Treatment (ENOVAT) an der Identifizierung und Erweiterung von speziesspezifischen klinischen Bewertungskriterien für die Veterinärmedizin. Bislang wird häufig auf Bewertungskriterien bzw. Grenzwerte aus angrenzenden Bereichen der Veterinärmedizin (z.B. Verwendung von Daten anderer Tierarten, wie Grenzwerte für Rinder für die Pferdemedizin bei fehlender Datenlage) bzw. aus der Humanmedizin zurückgegriffen, wenn keine passenden Vorschriften zur Verfügung stehen (Schwarz et al. 2010b). Einer der großen Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse aus Resistenzbestimmung gegenüber Schwermetallen besteht im bislang (03/2021) vollständigen Fehlen von Grenzwerten (Lima de Silva et al. 2012).

Häufig werden in der Literatur die Begriffe „Resistenz“ und „Toleranz“ willkürlich verwendet. Gadd (1992) verwendete den Begriff „Resistenz“ bei Bakterien nur, wenn ein bestimmter und spezifischer Mechanismus zur Detoxifikation für ein Metall nachgewiesen wurde (Lima de Silva et al. 2012).

Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Schwermetallen sind mit Herausforderungen verbunden: Erstens können Schwermetalle mit Komponenten des jeweils eingesetzten Wachstumsmediums Komplexe bilden, sogar ausfallen. Ein weiteres Problem stellen die mit Schwermetallen assoziierten Redoxreaktionen dar, die mit der Testung interferieren können (Harrison et al. 2005). Reichhaltige Medien können zu einer schnellen Ausfällung bzw.

Komplexierung von Metallen neigen, so dass bei der Wahl der Medien auf salzarme Gehalte geachtet werden sollte (Liu et al. 2014). Hier könnte auf das salzarme Luria-Bertani (LB)-Medium (Harrison et al. 2005) oder auf spezielle Medien zur Laborarbeit mit Metallen zurückgegriffen werden, wie beispielsweise auf das Neidhardt MOPS Minimal Medium (NM3) (Neidhardt et al. 1974). Die Zink-Empfindlichkeitsprüfung in **Publikation I** wurde mit einem bereits evaluierten Mikrodilutionsverfahren unter Einsatz von Mueller-Hinton II-Bouillon (Deus et al. 2017) durchgeführt.

Unsere Studie zeigt drei verschiedene MHKs für $ZnCl_2$ (molare Masse = 136,286), von 128 $\mu\text{g/ml}$ bis 512 $\mu\text{g/ml}$ ($\sim 0,94$ bis 3,76 mM) innerhalb der porzinen intestinalen *E. coli*-Populationen (**Publikation I**). Dem gegenüber stehen Ergebnisse von Deus et al. (2017), die vereinzelt einen höheren $ZnCl_2$ -MHK von 1024 $\mu\text{g/ml}$ ($\sim 7,51$ mM) bei *E. coli*-Isolaten humaner Herkunft nachweisen konnten. Eine Studie von Aarestrup und Hasman (2004) bestätigt generell die limitierte Breite („Range“) der $ZnCl_2$ -MHKs durch ihre Ergebnisse für *E. coli*- und *Salmonella* (S.) spp. -Isolate von Tieren, die zwischen 2-4 mM lagen (Medardus et al. 2014). Bei multiresistenten porzinen *S. enterica*-Stämmen wurden höhere MHKs zwischen 4-8 mM für $ZnCl_2$ ermittelt (Medardus et al. 2014). Bei der Gram-positiven Spezies *Staphylococcus aureus* wurde die Breakpoint für Resistenz gegenüber $ZnCl_2$ bei ≥ 4 mM festgelegt (Aarestrup et al. 2010).

Wie in **Publikation I** dargestellt, lässt die enge Verteilung der drei aufeinander folgenden $ZnCl_2$ -MHKs in dieser Studie auf eine natürlich vorkommende *E. coli*-Population schließen, in der Phänotypen, die sich deutlich als „Nicht-Wildtyp“ vom Rest der Population absetzen, fehlen (**Abbildung 3, unveröffentlicht**). Aufgrund dieser engen Verteilung konnte kein maximaler MHK (ECOFF: epidemiologischer Cut-Off-Wert) für $ZnCl_2$ bei *E. coli* ermittelt werden, der die „Wildtyp“-Population von einer „Nicht-Wildtyp“-Population trennt. In der Literatur sind bisher keine Daten zu einem Cut-Off-Wert von $ZnCl_2$ bei *E. coli* veröffentlicht.

Die Auswahl der Empfindlichkeitsprüfung sowie deren Auswertung in unserer Studie (**Publikation I**) wurden durch die chemischen Eigenschaften von Zink und Zinkverbindungen beeinflusst. Die Löslichkeit von Zinkverbindungen variiert. Zinkazetat, Zinksulfat oder Zinkchlorid lassen sich leicht in Wasser lösen. Dagegen ist Zinkoxid so gut wie unlöslich in Wasser-basierten Medien. Zinksulfat neigt bei pH-Werten über 5,5 zur Komplexbildung (Kim et al. 2018). Aufgrund dieser chemischen Eigenschaften wurde in **Publikation I** ein bereits evaluiertes Mikrodilutionsverfahren zur Empfindlichkeitsprüfung von Schwermetallen einschließlich Zinkchlorid und Bioziden gewählt, obwohl Zinkchlorid bei der Schweinefütterung nicht direkt zum Einsatz kommt. Im Magen des Schweines wandelt die dort gebildete Salzsäure das Zinkoxid im Futtermittel in Zinkchlorid um und wird in der flüssigen Phase gelöst (Henderson et al. 1995). Somit zeigen die Studienergebnisse der $ZnCl_2$ -MHK-Werte auch

Relevanz für die Praxis. Die schwere Wasserlöslichkeit sowie das Neigen zur Komplexbildung von Zink und Zinkverbindungen erschweren zusätzlich die Bestimmung des MHKs. Hier wurde nur ein deutlich abgrenzbarer Zellrasen jeder Vertiefung in der 96-Wellplatte als Wachstum definiert. Eine alternative Methode zur verbesserten Schwermetall-Empfindlichkeitsprüfung bei Bakterien könnte ein Mikrodilutionsverfahren mit Zugabe eines Redox-Indikators darstellen. Aktive Bakterienzellen reduzieren beispielsweise das nichtfluoreszierende Resazurin (blau) zum fluoreszierenden Resorufin (pink) (O'Brien et al. 2000). Mittels des Farbindikators gibt es eine direkte quantifizierbare Methode der metabolischen Aktivität der Bakterien. Zusammenfassend bilden die Wahl der Medien und der pH-Wert entscheidende Faktoren, die die Ermittlung von Toleranz-/Resistenzigenschaften bei Bakterien beeinflussen können.

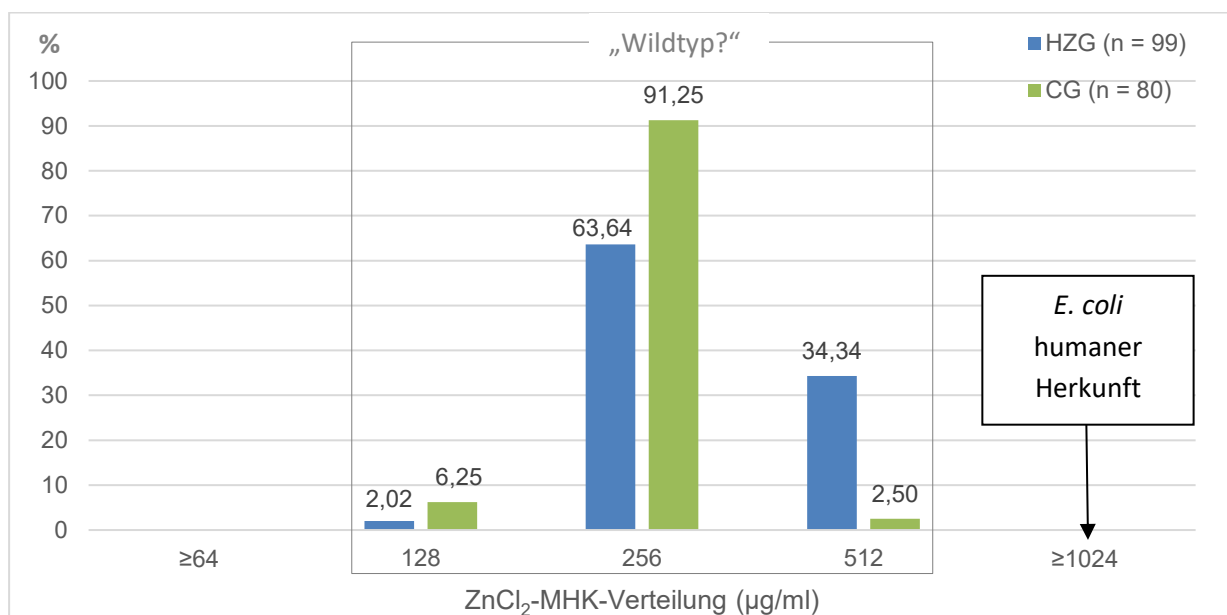


Abbildung 3 | Die enge Verteilung der ZnCl₂-MHKs der *E. coli* aus Publikation I

In der Studie (Publikation I) wurden drei aufeinander folgende ZnCl₂-MHKs gemessen. Der Messbereich von ZnCl₂ lag zwischen 4 – 8192 µg/ml und wurde mittels einem validierten Mikrodilutionsverfahren nach Deus et al. (2017) ermittelt. Im Vergleich zur Literatur und aufgrund der engen Verteilung der ZnCl₂-MHK der *E. coli*-Isolate wird hier auf eine „Wildtyp“-Population geschlossen. Aufgrund der nicht für die gesamte *E. coli* Population repräsentative Studie können keine Rückschlüsse auf die Nicht-Wildtyp Population bzw. deren MHK getroffen werden. Abbildung modifiziert nach (Bywater et al. 2006)

Abkürzung: HZG: Zinkfütterungsgruppe, CG: Kontrollgruppe

4.1.2. Der genotypische Nachweis

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Genen mit dem Vorhandensein einer Zinktoleranz bei *E. coli* in Verbindung gebracht (**Tabelle 3, unveröffentlicht**). Häufig wurden diese Gene als fakultativ beschrieben, d.h. man ging davon aus, dass nur *E. coli* über diese verfügte (Lee et al. 2005; Harris et al. 2001; Grass et al. 2001; Rensing et al. 1997a).

Wie in **Paper I** dargelegt, konnten nahezu alle 104 Zinkhomöostase-Gene, die für die Zink-Transport- und Bindungsproteine sowie Regulationsfaktoren codieren, in allen in dieser Studie untersuchten 179 *E. coli*-Isolaten *in silico* detektiert werden.

Bisher verbinden viele Autoren bestimmte Zinkhomöostase-Gene mit einer möglichen Zinkresistenz/-toleranz (**Tabelle 3, unveröffentlicht**). Am häufigsten werden die P_{1b}-type ATPase ZntA und der Kationdiffusionsvermittler ZitB (CDF, engl. cation diffusion facilitator) mit einer Zinkresistenz/-toleranz assoziiert (Deus et al. 2017; Vidhyaparkavi et al. 2017; Porcheron et al. 2013; Grass et al. 2005; Chao und Fu 2004; Legatzki et al. 2003).

Aus der ersten Studie von Grass et al. (2001) resultiert eine gesteigerte Zinktoleranz bei *E. coli* aus einer Überexpression von *zitB* und die daraus entstehende vermehrte Zinkabgabe in den periplasmatischen Raum (Grass et al. 2001). Außerdem stehen in der Literatur das Zinkresistenz-assoziierte Protein ZraP, der Transkriptionsregulator ZntR, die Serin-Acetyltransferase CysE und der anorganische Phosphattransporter PitA in direktem Zusammenhang mit einer Zinktoleranz/-resistenz (Stocks et al. 2019; Hoegler und Hecht 2018; Beard et al. 2000) (**Publikation I**). Seit der Veröffentlichung über Microarray-Transkriptom-Daten von *E. coli* unter Zinkstress (Lee et al. 2005), wird ZraP aufgrund seiner gesteigerten Expression mit einer Zinktoleranz in Verbindung gebracht. Diesen Zusammenhang können Petit-Hartlein et al. (2015) sowie van der Weel et al. (2019) in ihren Studien nicht bestätigen. Ein weiterer Hinweis auf eine Zinkresistenz stellt die schnelle und anhaltende Detoxifikation von Zink aus *E. coli* in einer Studie dar, die durch die Expression von ZntA vermittelt wird.

Somit wird die Transkription von *zntA* unter Zinkstress durch den Transkriptionsfaktor ZntR hochreguliert (Wang et al. 2012; Brocklehurst und Morby 2000a). Außerdem konnte eine Zinkresistenz auf eine Mutation im *pitA* bei *E. coli*-Isolaten zurückgeführt werden. Der PitA-Transporter konnte als Folge nur noch geringere Mengen an Zink transportieren (Jackson et al. 2008; Beard et al. 2000). Diese Mutation kann bei keinem der *E. coli*-Isolate unserer Studie nachgewiesen werden.

In der Literatur wurden bis heute nicht nur Bindungs- und Transportgene, sondern auch Regulationsfaktoren der Zinkhomöostase-Gene mit einer Zinkresistenz in Verbindung gebracht. Bei Knock-out-Varianten des Zinkaufnahmeregulators Zur (Δzur) in Bakterien konnten zum einen höhere Zinkgehalte in der Zelle gemessen werden, zum anderen steigerte sich die Sensibilität gegenüber hohen Zinkkonzentrationen in der Umgebung. Diese Knock-out-Phänotypen gaben Hinweise darauf, dass Zur nicht nur benötigt wird, um die Zinkaufnahme unter limitierenden Bedingungen zu steigern, sondern auch, um die Zinkaufnahme unter Zinkexzess herunter zu regulieren (Mikhaylina et al. 2018; Gilston et al. 2014; Patzer und Hantke 2000).

Tabelle 3 | Literaturübersicht über Zinkhomöostase-Gene, die bisher mit einer Zinkresistenz assoziiert worden sind.

Gene	Zitat	Referenz
<i>zitB</i> <i>zntA</i>	“Furthermore, the chromosomally-located genes <i>zntA</i> and <i>zitB</i> were present in both isolates from hospitalized humans with MICs of 1024 µg/mL zinc chloride.”	(Deus et al. 2017)
<i>zitB</i> <i>cysE</i>	“We divided the 48 metal-resistant hits into three groups.”	(Hoegler und Hecht 2018)
<i>zitB</i>	“Overexpression of <i>zitB</i> in <i>E. coli</i> resulted in a significant increase in zinc tolerance and reduced uptake of zinc, while overexpression of <i>yjiP</i> did not confer additional zinc resistance, and deletion of <i>yjiP</i> did not alter zinc resistance”	(Grass et al. 2001)
<i>zitB</i>	“ZitB was implicated in a role of an efflux pump by the observations that overexpression of ZitB increased zinc tolerance”	(Chao und Fu 2004)
<i>zitB</i>	“Recently we showed that ZitB, one of the two intrinsic CDF proteins in <i>E. coli</i> , is responsible for Zn ²⁺ resistance.”	(Grass et al. 2005)
<i>zntA</i> <i>zraP</i> <i>hydG</i>	“[...] be involved in Zn tolerance, particularly <i>zntA</i> , <i>zraP</i> , and <i>hydG</i> [...]”	(Lee et al. 2005)
<i>zntA</i>	“This soft metal-translocating P1-type ATPase confers resistance to Pb(II), Cd(II), and Zn(II)”	(Vidhyaparkavi et al. 2017)
<i>zntA</i> <i>zntR</i>	“This screen identified <i>zntA</i> , as well as <i>zntR</i> , which encodes a zinc-dependent activator of <i>zntA</i> ; these genes are known to be required for zinc-resistance”	(Stocks et al. 2019)
<i>zntA</i>	“Expression of <i>zntA</i> from <i>R. metallidurans</i> in <i>Escherichia coli</i> predominantly mediated resistance to zinc.”	(Legatzki et al. 2003)
<i>zntA</i>	“Attempting to counteract these effects, <i>E. coli</i> uses the Zn-translocating P-type ATPase ZntA to export cadmium, implying that mechanisms of zinc and cadmium resistance are closely related.”	(Colaço et al. 2016)
<i>pit</i>	“We describe here the properties of a mutant that showed enhanced resistance to Zn(II). The mutation is located within <i>pitA</i> , which encodes the inorganic phosphate transport system (Pit) in <i>E. coli</i> .”	(Beard et al. 2000)
<i>pitA</i>	“[...] mutations in <i>pitA</i> confer Zn(II) resistance.”	(Jackson et al. 2008)

Es gab keine Assoziation zwischen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. Single Nucleotide Polymorphism) oder Mutationen von Genen und den auftretenden drei unterschiedlichen Zinktoleranz-Werten. Da in der Studie der Einsatz von Zink zu (1) keinen genetischen Veränderungen der *E. coli*-Isolate geführt hat und (2) die Übertragung von mobilen genetischen Elementen sowie (3) der Verlust von Porinen sowie die Hochregulierung von Effluxpumpen mit den durchgeführten Methoden nicht beurteilt werden konnten, wurde kein genauer Mechanismus für eine mögliche Zinkresistenz identifiziert. In Anbetracht dieser Beobachtungen wird die Fähigkeit der *E. coli*-Isolate in der Studie, in Gegenwart von (vergleichsweise) hoher Konzentration von Zink zu überleben, als „Toleranz“ definiert (**Publikation I**).

Andere Bakterienspezies tragen hingegen Gene in ihrem Genom, die nachweislich zu einer direkten Zinkresistenz führen. Einer der bedeutendsten Beispiele bei Gram-negativen Bakterien ist das Czc-System aus *Cupriavidus* mit einer gemeinsamen vermittelten Resistenz gegenüber Cobalt, Zink und Cadmium (Nies et al. 1987). Dieses Gen-Cluster wurde in weiteren Bakterien, wie *Staphylococcus aureus* (Cavaco et al. 2010) und *Pseudomonas aeruginosa* (Perron et al. 2004) identifiziert (siehe auch Kapitel 2.9.1 Zinktoleranz). Ein weiteres Beispiel für eine Zinkresistenz ist das *zinc*-Operon von Cyanobakterien (*Synchocystis* spp.) (Blencowe und Morby 2003), indem genetische Informationen eines Zinktransporters (*zincA*) und seinem Genregulator (*zincR*) lokalisiert sind. Die Expression dieses Zinkexporters vermittelt gleichzeitig eine Zinkresistenz und eine verringerte Zink-Akkumulation in der Zelle (Blencowe und Morby 2003).

4.2. Die Verbreitung von Schwermetall-Resistenzen in der Umwelt

Anhand von diversen Studien konnte sowohl die Umwelt als auch der Gastrointestinaltrakt vom Mensch und von Tieren als mögliches Reservoir für Antibiotika-Resistenzgene (ARGs) aufgezeigt werden (Berendonk et al. 2015). Im Gegensatz zu den meisten Metaboliten von Antibiotika sind Schwermetalle in der Umwelt schwer abbaubar und können daher einen langjährigen Selektionsdruck auf Bakterien in ihrer Umgebung ausüben, der möglicherweise zur Aufrechterhaltung und Ausbreitung (multi-)resistenter Bakterien beiträgt (Argudín et al. 2019; Na et al. 2018; Poole 2017; Becerra-Castro et al. 2015; Hölzel et al. 2012). Mitunter gelangen Schwermetalle in höheren Konzentrationen durch die Fäzes vom Schwein aufgrund von Kupfer- und Zink-Fütterungszusätzen im Schweinefutter in die Umwelt (Medardus et al. 2014). Als Folge gelangten bereits größere Mengen an Schwermetallen in Abwässer, Böden und in das Grundwasser. Diese Mengen können vielfach aufgrund ihrer toxischen Konzentration nicht mehr von Pflanzen verstoffwechselt werden (Noulas et al. 2018).

Als Beispiel für den möglichen Einfluss von Schwermetallen auf die Antibiotika-Resistenz konnte in der Studie von Hölzel et al. (2012) eine signifikant höhere Resistenzrate gegenüber beta-Laktamen bei *E. coli* in kupferhaltigen Schweinemist (Ampicillin, Amoxicillin mit Clavulansäure und Piperacillin) sowie in zinkhaltigen Schweinemist (Piperacillin und Doxycyclin) detektiert werden.

Eine einfache Erklärung für das Auftreten von Antibiotika-resistenten Bakterien in Schwermetall-kontaminierter Umgebung ist das gemeinsame Auftreten von Resistenzgenen gegenüber beider antimikrobieller Wirkstoffe auf dem Chromosom oder auf mobilen genetischen Elementen (MGE), wie Plasmiden (Poole 2017).

Ein Teil der Studien-Isolate mit einer vergleichsweise höheren Zinkchloridtoleranz (512 µg/ml ZnCl₂ MHK) wiesen gleichzeitig Antibiotika-, Schwermetall- und Biozidresistenz- bzw. -toleranzgene auf (**Tabelle 4, unveröffentlicht**). Die Lokalisation dieser Gene konnte auf Klasse-1-Integrans auf zwei verschiedenen Plasmiden (IncFII und IncFIB, engl. Fertility) begrenzt werden (**Publikation I**). In der Literatur treten häufig Resistenzgene gegenüber Sulfonamiden, beta-Laktamen, Aminoglykosiden sowie Tetrazyklinen gleichzeitig auf. Ebenfalls werden Resistenz- bzw. Toleranzgene gegenüber Quecksilber, Cadmium, Arsen und Kupfer sowie Biozid-Resistenzgene wie *qac* auf Plasmiden lokalisiert (Pal et al. 2015).

Tabelle 4 | Übersicht der nachgewiesenen Antibiotika-, Schwermetall- und Biozid-Toleranz- resp. Resistenzgene auf zwei neuen Plasmiden aus der Publikation I

IncFII-Plasmid pRKI3099a, 115kpb		IncFIB-Plasmid pRKI3099b, 102 kbp	
Resistenzgene	Resistenz gegenüber	Resistenzgene	Resistenz gegenüber
<i>aadA1</i>	Aminoglykoside	<i>aadA1</i>	Aminoglycoside
<i>dfrA1</i>	Trimethoprim	<i>sat1</i>	Streptothricin
<i>sul3</i>	Sulfonamide	<i>sul1</i>	Sulfonamide
<i>tet(A)</i>	Tetrazykline		
<i>arsRP</i>	Arsen	<i>merDACRPT</i>	Quecksilber (engl. Mercury)
<i>qacL</i>	quartäre Ammoniumverbindungen	<i>qacEΔ1</i>	quartäre Ammoniumverbindungen (defekt)

MGEs wie Integrans oder ISCR (engl. Insertion sequence common region)-Transposons werden häufig mit denselben Plasmiden detektiert, auf denen gleichzeitig Antibiotika-Resistenz-, Metall- sowie Biozid-Resistenzgene lokalisiert sind (Pal et al. 2015).

Klasse-1-Integrans werden häufig bei Pathogenen aus klinischem Material von Menschen (Sütterlin et al. 2020) oder von verschiedenen lebensmittelliefernden Tieren (Karimi Dehkordi

et al. 2020; Cavicchio et al. 2015; Murinda et al. 2005) nachgewiesen, jedoch auch, wie in **Publikation I** schon aufgeführt, bei kommensalen *E. coli*-Isolaten vom Schwein (Reid et al. 2017; Changkaew et al. 2015). Gleichermaßen werden Klasse-1-Integrone auch bei vielen Erregern aus der Umwelt isoliert, die durch Aktivitäten anthropogenen Ursprungs beeinflusst werden (Pal et al. 2015; Heuer et al. 2012; Gillings et al. 2008).

Der direkte Zusammenhang zwischen Biozid- und Schwermetallbelastungen der Umwelt (Selektion) und der Erhöhung der Abundanz von Integrone führt möglicherweise zur Übertragung von Antibiotika-Resistenzgenen aus Umwelterregern auf klinische Pathogene (Pal et al. 2015). Schon 1967 hat Smith Resistenz(R)-Plasmide aus klinischen *E. coli*- und *Salmonella*-Isolaten isoliert, die sowohl Antibiotika-Resistenzgene als auch Resistenzgene gegenüber Quecksilber, Nickel, Cadmium, Cobalt und Arsen enthielten (Pal et al. 2015; Smith 1967). Heutzutage werden gehäuft Bakterien aus der Umwelt isoliert, die Plasmide mit mehreren gleichzeitig auftretenden antimikrobiellen und Schwermetallresistenzgenen (Co-Selektion) enthalten (Nguyen et al. 2019; Argudín et al. 2019; Li et al. 2017). Bei 25 *E. coli*, die ursprünglich aus erkrankten Tieren stammen, konnten auf IncH2-Plasmiden sowohl zwei Operons, die Resistenzen gegenüber Kupfer (*pco*) und Silber (*sil*) vermitteln, als auch Resistenzgene gegenüber Quinolone (*oqxAB*) und beta-Laktame (*bla_{CTX-M}*) lokalisiert werden (Fang et al. 2016). Das Auftreten der Plasmide konnte hier in einen direkten Zusammenhang zu erhöhten MHK-Werten von CuSO₄ und AgNO₃ gebracht werden (Fang et al. 2016).

Bei klinischen *Pseudomonas aeruginosa*-Isolaten belegt eine aktuelle Studie die Verbreitung der Multiresistenz durch Auftreten einer Megaplasmid-Familie, die sowohl Schwermetall-Resistenzgene gegenüber Tertiium (*terZABCDEF*) und Quecksilber (*merRTPCA* bzw. *merRTPFADE*) als auch Antibiotika-Resistenzgene gegenüber beta-Laktamen (*bla_{VEB}* [engl. Vietnamese extended-spectrum beta-lactamases], *bla_{OXA-10}* [engl. Oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases], *bla_{CARB-3}* [engl. Carbenicillinase-3 beta-lactamase]), Aminoglykoside (*aad* bzw. *ant(2'')*-Ia für Aminoglykosid-Adenyltransferasen oder *aph(6)*-Id für Aminoglykosid-Phosphotransferasen), Sulfonamide (*sul1*), Tetrazykline (*tet*), Makrolide (*ermE*) und Fluorphenicol (*floR*) aufweist (Cazares et al. 2020).

Die Übertragung von Resistenzen über MGEs sind mit wahrscheinlich erheblichen energetischen „Kosten“ für das Bakterium verbunden (Hernando-Amado et al. 2017; Vogwill und MacLean 2015). Dies zeigt sich ggf. durch eine langsamere Wachstumsrate sowie geringere Virulenz oder Übertragungsrate von Genen bei resistenten Bakterien im Gegensatz zum Wildtyp (Andersson und Hughes 2010). Weitere Studien zeigen, dass Klasse-1-Integrone mit geringeren „Fitness-Kosten“ für das Bakterium assoziiert sind (Lacotte et al. 2017) (**Publikation I**). Dennoch erfordert die Mobilisierung, der Erwerb und die stabile Integration

von Integrons im Erbgut vermutlich einen kontinuierlichen Selektionsdruck (Sütterlin et al. 2020). Die entstehenden Nachteile müssen durch einen Selektionsvorteil, zum Beispiel gegenüber Antibiotika oder Schwermetallen, ausgeglichen werden, damit die Plasmid-tragenden Bakterien in der Population erhalten bleiben (Yu et al. 2017; Gullberg et al. 2014). Integrons können auch in das Genom selbst integriert werden und gelten dann als stabiles Element, so dass das Bakterium geringe oder gar keine „Fitnesskosten“ hat (Sütterlin et al. 2020).

Durch den direkten Einfluss des Menschen auf die Verbreitung von Resistenzgenen stellt die schnelle Identifizierung potentieller Eintragungsquellen von ARGs in die Umwelt eine wichtige Rolle in der Resistenzminimierung dar. Zur eindeutigen Eingrenzung der vermeintlichen Quelle von ARGs werden bereits ARG-Verteilungsmuster auf Basis von molekularbiologischen Verfahren (Kombination von PCR-basierter Nachweishäufigkeit bzw. -intensität von Zielgenen und Umweltvariablen) angewendet (Li et al. 2018; He et al. 2014). Durch die Kombination von umfassenden metagenomischen ARG-Analysen mit einem Maschine-learning Klassifikations-tool („SourceTracker“) konnte bereits mögliche „ARG-Kontaminationsquellen“ ausfindig gemacht werden (Li et al. 2018). Darüber hinaus gibt es Methoden, wie Korrelations- und Metagenomanalysen, die die Träger von ARGs identifizieren (Rice et al. 2020). Das „Tracking“ von Schwermetall-kontaminationsquellen sowie das Umwelt-Monitoring von Schwermetall-toleranzen bzw. -resistenzen bei Bakterien sollte durch die in Kapitel 2.10 „Assoziation zwischen bakterieller Schwermetalltoleranz und Antibiotika-Resistenz in der Umwelt“ geschilderten Co-Selektionsphänomene mehr in den Fokus rücken (Thomas IV et al. 2020).

4.3. Colicine im (Konkurrenz-)Kampf gegen Pathogene

Angesichts der Komplexität der intestinalen Mikrobiota liegt es nahe, dass Überlebensstrategien wie die Wachstumshemmung der Konkurrenten durch die Produktion von antimikrobiellen Bakteriozinen wichtig für ein erfolgreiches Überleben der eigenen Spezies bzw. Population ist und somit wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Organisation des intestinalen Mikrobioms darstellt (Zhao et al. 2017).

Insgesamt beinhalteten vergleichsweise wenig *E. coli*-Isolate dieser Studie, die von gesunden Schweinen stammen, Colicin-Gene (HZG: 22%, CG: 35%, **Publikation II**). Bei Tierarten wie z.B. Schafen wird von einem signifikant höheren Vorkommen von colicinogenen *E. coli* bei an Durchfall-erkrankten Individuen berichtet im Vergleich zu gesunden Tieren (Askari und Ghanbarpour 2019). Die Ergebnisse einer neuen Studie zeigen, dass potenziell energetisch aufwendige Abwehrmechanismen in Form von Colicinen für Kommensale in ihrer adaptierten Umgebung keine wichtige Rolle spielen (Samuels et al. 2020). In der Vergangenheit wurde

jedoch den Colicinen eine wichtige Bedeutung für das bakterielle Überleben bei Enteritiden zugesprochen (Kommineni et al. 2015; Stecher et al. 2013). Anfang der 70er Jahre haben Salajka und Sarmanova (1971) gezeigt, dass 34% der ETEC-Isolate, die aus an Durchfallerkrankten Schweinen isoliert wurden, Colicine enthalten. Überraschend mehr apathogene Isolate (49%) trugen ebenfalls Gene für Colicine. Außerdem wurde festgestellt, dass bei zehn genesenen Ferkeln ETEC-Isolate durch apathogene Stämme ersetzt wurden, die Colicine produzierten, welche die ETEC-Isolate *in vitro* zerstört hatten (Salajka und Sarmanova 1971). Eine andere Studie aus Tschechien zeigte, dass Colicine aus ETEC-Isolaten keine Wirkung auf die Kommensalen der intestinalen Mikroflora haben (Trcka und Smarda 2003).

Um diese Erkenntnisse im Rahmen unserer Studie zu prüfen, könnte man die Colicin-Wirkung der *E. coli*-Isolate (**Publikation II**) in Form eines Spot-Bioassay nach Smajs et al. (2010) beurteilen (**Abbildung 4, unveröffentlicht**).

Der Einsatz von Colicinen/Bakteriozinen kann in Zukunft möglicherweise eine Alternative zur Verfütterung von Kationen zur Prävention von *E. coli*-assoziierte Durchfallerkrankungen beim Schwein darstellen (Rhouma et al. 2017a; Cutler et al. 2007; Stahl 2005) bzw. sogar als Alternative zu Antibiotikatherapien eingesetzt werden (Bosák et al. 2020).

Vereinzelt gibt es Studien, die eine erfolgreiche Colicin-Wirkung auf Pathotypen von *E. coli*-Isolaten nachweisen konnten. Die Inhibition der Aktivität von F4⁺- und F18⁺-ETEC-Isolaten konnte beispielsweise *in vitro* und *in vivo* durch Colicin E1 bewirkt werden. Die Wachstumsleistung der untersuchten Schweine stieg an und die Inzidenz von PWD sank deutlich (Cutler et al. 2007). Weitere Studien konnten zudem zeigen, dass colicinogene *E. coli*-Isolate eine Aktivität gegen STEC aufwiesen (Wisener et al. 2015; Schamberger und Diez-Gonzalez 2004) (**Publikation II**). Andere Bakterien wie Laktobazillen (meist im Einsatz als Probiotika) können ebenfalls Bakteriozine produzieren, die unter Umständen die Toxin- und Adhäsionsproduktion der pathogenen *E. coli* inhibieren können (Callaway et al. 2008).

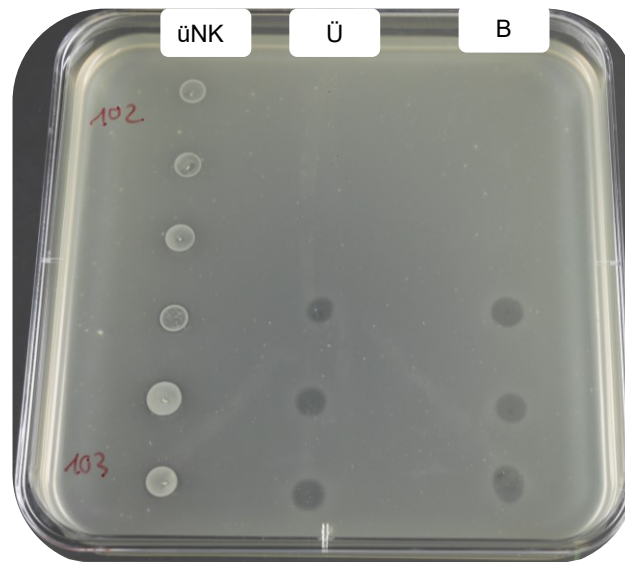


Abbildung 4 | Beurteilung der Colicinwirkung bei *E. coli* mittels Spot-Bioassay

Der Spot-Bioassay nach Smajs et al. (2010) stellt eine Methode zur phänotypischen Beurteilung einer Colicinwirkung bei *E. coli* gegenüber Referenzstämmen dar. Als Beispiel ist oben das Ergebnis eines Spot-Bioassay gezeigt. Hierbei wird mittels der Softagar-Overlay-Technik ein Referenzstamm in einen Agar gegossen. Die zu testenden *E. coli*-Isolate werden über Nacht inkubiert und auf den Agar „gespottet“ (erste Reihe, üNK). Außerdem wird der beim Pelletieren der üN-Kultur entstehende Überstand auf den Agar gegeben (zweite Reihe, Ü). Final wird ein zuvor vorbereiteter Bakteriozin-Extrakt auf den Overlay-Agar gespottet (dritte Reihe, B). Die lytische Aktivität der drei verschiedenen Spots wird ausgewertet. Beispielsweise konnte im Stamm „103“ im Überstand (Spot 2) und im Bakteriozin-Extrakt (Spot 3) eine lytische Aktivität gegenüber dem Indikatorstamm ATCC10536 gezeigt werden. Zur gesamten Beurteilung der Colicinwirkung werden diverse Indikatorstämme verwendet.

4.4. Ausblick auf mögliche Forschungsvorhaben bezüglich der für Zinktoleranz verantwortlichen Mechanismen

Mögliche Homöostase-Veränderungen unter Zinkexzess können in den Bereichen Genregulation und Expression beteiligter Proteine vorliegen (**Publikation I, Tabelle 5**). Um diese Möglichkeiten zu beurteilen, gibt es in der Literatur nur wenig Informationen über die Genexpression der Zinkhomöostase-Proteine, sowie Transkriptionsfaktoren von *E. coli*-Bakterien.

Eine neue Studie (Xu et al. 2019) zeigt einen Zusammenhang zwischen Zinküberschuss und Eisen- sowie Kupferhomöostase in *E. coli*-Bakterien. Daraus resultieren steigende Eisengehalte folglich von sich steigernder Genexpression der Eisenaufnahme-Gene sowie sinkender Genexpression der Eisenspeichergene. Aus dem nun entstandenen intrazellulären Eisen-Exzess wird die Kupferdetoxifikationskaskade aktiviert und die Kupfergehalte sinken in

der Zelle. Diese Studie von Xu et al. (2019) verdeutlicht die Komplexität des Gleichgewichts der physiologischen Funktionen einer Bakterienzelle.

LaVoie (2018) betrachtet die transkriptionelle Antwort von *E. coli* während anorganischer und organischer Quecksilber-Belastung durch RNA-Sequenzierungsanalysen. Mechanismen, die an der Entwicklung der Zinktoleranz/-resistenz in *E. coli* beteiligt sind, bleiben bisher ungeklärt. Vergleichende Transkriptom-Analysen können unter anderem die Zink-induzierte Stressantwort und die Genexpression der Zink-Homöostase- und Regulationsproteine bei *E. coli* unterschiedlicher genetischer Linien näher betrachten.

Eine weitere Möglichkeit für unterschiedliche Zinktoleranzen ist die Persistenz von *E. coli*-Bakterien bei steigenden Zinkkonzentrationen der Umgebung als sogenannte Persister. In der Forschung verwendet man den Begriff Persister bei der Toleranz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen (Amato et al. 2014; Lewis 2007). Es entstehen Subpopulationen, die den akuten Antibiotika-Stress überleben. Ohne Ausbildung von Mutationen reduzieren die Bakterien ihre Zellteilung und treten in eine Art Ruhezustand ein. Sie haben eine günstige phänotypische Nische gefunden, die ihnen den Vorteil gewährt, die Umgebungsveränderung zu überdauern. Tritt der Normalzustand der Umgebung wieder ein, „erwachen“ die Bakterienzellen und steigern ihren Stoffwechsel (Lewis 2010).

Persistierende Zellen können tolerant gegenüber antimikrobiellen Therapien sein. Da Kupfer und weitere Schwermetalle antimikrobielle Eigenschaften aufweisen, wurde die Wirkung von Kupfer in einer Laborstudie auf einer persistierenden *E. coli*-Population getestet. Anhand dieser Population konnte gezeigt werden, dass Kupferverbindungen die Persisterzellen abtöten (Moreira Martins et al. 2020). Weitere Testverfahren mit anderen Schwermetallen in Bezug auf persistierenden *E. coli* sind bisher in der Literatur nicht bekannt.

5. Zusammenfassung

Seit 2006 sind antimikrobielle Fütterungszusatzstoffe in der Europäischen Union (EU) verboten. Um das Auftreten der verlustreichen Post-weaning Diarrhea (PWD) in der Ferkelaufzucht zu reduzieren, welche vor allem durch enterotoxische *E. coli* (ETEC) hervorgerufen wird, werden bislang verschiedene Strategien angewendet. Hierzu zählt die zum Teil exzessive Fütterung von Zinkoxid, welches nach Magenpassage als zweiwertiges Kation vorliegt (Zn^{2+}). Gene, die Resistenzen gegen kationische Spurenelemente vermitteln, sind häufig mit antimikrobiellen Resistenzgenen co-lokalisiert. Daher wurde in früheren Studien die Hypothese aufgestellt, dass Zink-Fütterung eine der Ursachen für die Ausbreitung resistenter Bakterien darstellt.

Bis heute sind die Effekte der zinkreichen Fütterung auf die intestinale Bakterienpopulation beim Schwein, v.a. auf die *E. coli*-Population, nicht vollständig geklärt. Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit die phänotypischen und genotypischen Charakteristika einer repräsentativen Auswahl von *E. coli*-Isolaten zur Aufklärung des Einflusses von Zink als Futterzusatzstoff auf die intestinale *E. coli*-Population beim Schwein untersucht.

Insgesamt wurden 179 *E. coli*-Isolate aus einer Zinkfütterungsstudie mit Absatzferkeln betrachtet. 99 Isolate wurden aus der Zinkfütterungsgruppe (high-zinc fed group [HZG]) und 80 Isolate aus der Kontrollgruppe (control group [CG]) des letzten Beprobungstages (52. Tag) zufällig ausgewählt. Alle Isolate wurden auf Zinktoleranz, antimikrobielle und Schwermetall-Empfindlichkeiten geprüft. Dazu wurden minimale Hemmkonzentrationen (MHK) durch ein Mikrodilutionsverfahren ermittelt. Darüber hinaus wurden Ganzgenomanalysen zur Detektion von antimikrobiellen Resistenz-, Schwermetalltoleranz- und Biozidresistenzgenen sowie Virulenz-assoziierten und Bakteriozin-assoziierten Genen über eine in-house BLAST-basierte Pipeline (Treffer bei $\geq 90\%$ Sequenzähnlichkeit) durchgeführt. Auf Grundlage eines Maximum Common Genome Alignments aller Isolate wurde ein phylogenetischer Baum erstellt. Um genetische Unterschiede der Abstammungslinie zu identifizieren, wurde eine Bayesian Analysis of Population Structure angewandt.

In dieser Studie wurden drei verschiedene Zinkchlorid- ($ZnCl_2$) MHK-Werte bei *E. coli* ermittelt: (1) 128 $\mu g/ml$ (HZG: 2%, CG: 6%), (2) 256 $\mu g/ml$ (HZG: 64%, CG: 91%) und (3) 512 $\mu g/ml$ (HZG: 34%, CG: 3%; $p < 0,001$). Die enge Verteilung der $ZnCl_2$ -MHK-Werte lässt auf eine natürlich vorkommende *E. coli*-Population schließen. Zwischen höheren $ZnCl_2$ MHK-Werten und Isolaten der Zinkfütterungsgruppe sowie niedrigen $ZnCl_2$ MHK-Werten mit Isolaten der Kontrollgruppe bestand eine statistisch signifikante Assoziation (lineares gemischtes

Regressionsmodell, $p = 0,005$). Dieses Ergebnis kann auf einen Selektionsvorteil verschiedener kommensaler *E. coli*-Populationen in Anwesenheit hoher Zinkmengen im Schweinefutter hinweisen. Die Zinkchlorid-Toleranzwerte in dieser Studie zeigen jedoch keinen statistischen Zusammenhang zum Auftreten eines Antibiotikaresistenz-Phänotyps.

Isolate der höheren $ZnCl_2$ MHKs von 512 $\mu g/ml$ wiesen zum Teil ($n=19/36$) zwei neue F (engl. Fertility) -Plasmide auf, die neben diversen antimikrobiellen Resistenzgenen (*aadA1*, *dfrA1*, *sul1*, *sul3* und *tetA*) auch Schwermetalltoleranzgene (*merRTPCDAB* und *arsRP*) sowie Biozidresistenzgene (*qacL* und unterbrochenes *qacE* [*qacEΔ1*]) beinhalteten. Zinkresistenzgene, die für andere Spezies bereits beschrieben sind, wurden auf den Plasmiden nicht lokalisiert.

Die bisher publizierte Literatur hatte verschiedene Gene als verantwortlich für eine Zinkresistenz gesehen, einschließlich *zitB* und *zntA*, die für Zink-Exporter codieren, und *pit*, welches für einen unspezifischen anorganischen Phosphat-Transporter codiert. Ganzgenom-Untersuchungsdaten von Genen, die an der Zinkhomöostase beteiligt sind, offenbaren ein vollständiges Vorhandensein nahezu aller bislang genannten Gene und Faktoren in den *E. coli*-Isolaten dieser Studie, ein Zinkresistenzgen wurde nicht identifiziert.

Die phylogenetischen Analysen zeigten keine Assoziation zwischen den ermittelten Zinkchlorid-Toleranzwerten und der phylogenetischen *E. coli*-Populationsstruktur in der Studie. Die Bayesian Analysis of Population Structure-Cluster spiegelten ausschließlich die Sequenz- resp. Serotypen wider. Das Ergebnis weist darauf hin, dass eine Zinktoleranz keine Eigenschaft eines bestimmten phylogenetischen Hintergrundes ist.

Insgesamt traten weniger Virulenz-assoziierte Gene (41% vs. 65% in Isolaten der Kontrollgruppe, $p < 0,001$) und Bakteriozin-assoziierte Gene (22% vs. 35% in Isolaten der Kontrollgruppe, $p = 0,002$) in Isolaten der Zinkfütterungsgruppe auf. Hier zeichnet sich ein Effekt der Zinkfütterung auf das Vorkommen dieser Gene in der intestinalen *E. coli*-Population ab. Die Verteilung bestimmter Virulenzdeterminanten wies auf deutliche Unterschiede im Auftreten verschiedener assoziierter *E. coli*-Pathotypen (enterotoxische *E. coli* [ETEC], enteropathogene *E. coli* [EPEC], Shigatoxin bildende *E. coli* [STEC]) in beiden Fütterungsgruppen hin (1% HZG, 14% CG). Zink scheint nicht nur die intestinale Zusammensetzung von porzinen *E. coli*-Populationen hinsichtlich der Phänotypen mit erhöhter Zinktoleranz zu begünstigen, sondern auch die Populationsdichte potenziell pathogener Isolate zu verringern.

Weitere Untersuchungen über die Mechanismen, die an der Entwicklung der Zinktoleranz in *E. coli* beteiligt sind, müssen folgen, insbesondere Forschungsarbeiten zur zinkinduzierten Stressantwort durch vergleichende Transkriptom-Analysen.

The influence of zinc as a feed additive on the porcine intestinal *Escherichia coli* population in piglets

6. Summary

In 2006, the European Union banned the use of antimicrobial growth promoters in animal production. Since then, different alternative strategies were used to reduce the economic losses due to post-weaning diarrhea (PWD) associated with particularly enterotoxigenic *Escherichia (E.) coli* (ETEC) in piglet farming. One of the most prominent strategies is supplementation of pig fed with zinc oxide (ZnO). The low pH in the stomach allows the formation of the divalent cation as a soluble salt (Zn²⁺). Of note, genes conferring resistance against cationic trace elements are often co-localized with genes conferring antimicrobial resistance in bacteria. Previous studies hypothesized that zinc feeding selects for antimicrobial resistant bacteria due to co-resistances harbored by on mobile genetic elements. However, effects of high-zinc diets on porcine intestinal bacterial populations, especially *E. coli*, are not fully understood yet.

Therefore, the aim of this study was the phenotypic and genotypic characterization of a representative selection of *E. coli* isolates to clarify the influence of zinc as feed additive on the porcine intestinal *E. coli* population.

In total, 179 *E. coli* isolates, consisting of a group of 99 high-zinc fed (HZG) isolates and a corresponding control group (CG) of 80 isolates were collected from piglets sacrificed at the end of a Zn feeding trial (52nd day). All isolates were screened for zinc tolerance, antimicrobial- and biocide susceptibilities by determination of minimum inhibitory concentrations (MICs). In addition, *in silico* whole genome screening (WGS) of all isolates for genes conferring antimicrobial resistance, heavy metal tolerance and biocide resistance was carried out. In addition, virulence-associated- and bacteriocin-associated genes were identified using an in-house BLAST-based pipeline (hits based on $\geq 90\%$ sequence identity). The maximum common genome alignment was used to generate a phylogenetic tree. Bayesian analysis of population structure was applied to identify genetically distinct lineages based on the constructed phylogeny.

In this study, porcine *E. coli* yielded three different levels of zinc chloride (ZnCl₂) MIC: 128 $\mu\text{g/ml}$ (HZG, 2%; CG, 6%), 256 $\mu\text{g/ml}$ (HZG, 64%; CG, 91%) and 512 $\mu\text{g/ml}$ (HZG, 34%; CG, 3%; $p < 0.001$). The close distribution of ZnCl₂ MICs seems to reflect a naturally occurring *E. coli* population. A statistically significant association was revealed between “higher” ZnCl₂ MIC values and isolates representing high zinc-fed group and “lower” ZnCl₂ MIC values with

isolates of the control group (linear mixed regression model, $p = 0.005$), indicating a selective advantage of distinct commensal *E. coli* populations in the presence of high amounts of zinc in the piglets' diet. The different zinc tolerance levels investigated in this study lacked a particular association with the occurrence of an antibiotic resistance phenotype profile.

The isolates with the 512 $\mu\text{g/ml}$ ZnCl_2 MIC particularly harbored two novel F (Fertility) plasmids ($n = 19/36$) carrying antimicrobial resistance genes (*aadA1*, *dfrA1*, *sul1*, *sul3* and *tetA*), heavy metal tolerance genes (*merRTPCDAB* and *arsRP*) and biocide resistance genes (*qacL* and disrupted *qacE* [*qacE* Δ 1]). Zinc resistance genes that had been previously detected among other species were not identified on the plasmids.

WGS data screening for genes involved in zinc homeostasis revealed an almost ubiquitous presence of most factors tested, including *zitB*, *zntA* both encoding zinc exporters and *pit* encoding unspecific inorganic phosphate transporter formerly described as important for zinc resistance.

The phylogenetic analysis showed no association between zinc tolerance levels and the phylogenetic *E. coli* population structure in the study. The Bayesian Analysis Population Structure cluster reflected just the sequence resp. serotypes. The results suggested that zinc tolerance lacks a particular association with a specific phylogenetic background.

Overall, fewer virulence-associated genes (41% vs. 65% in isolates from control group, $p < 0.001$) and bacteriocin-associated genes (22% vs. 35% in isolates from control group, $p = 0.002$) were detected in isolates from the high-zinc fed group. The results indicate an effect of high-zinc supplementation of the piglets' diet on the occurrences of these genes among intestinal *E. coli* populations: The distribution of typical virulence determinants demonstrated obvious differences in the occurrence of distinct *E. coli* pathotypes (enterotoxigenic *E. coli* [ETEC], enteropathogenic *E. coli* [EPEC] and shiga toxin-producing *E. coli* [STEC]) in both feeding groups (1% in HZG, 14% in CG). Zinc seems not only to favor the intestinal composition of porcine *E. coli* population regarding the phenotypes with increased zinc tolerance, but also to reduce the abundance of potentially pathogenic isolates.

Further research on mechanisms involved in development of zinc tolerance in *E. coli* is needed, especially regarding the zinc-induced stress response, for instance by employment of comparative transcriptomics.

7. Literaturverzeichnis

- Aarestrup, F.M., Cavaco, L., und Hasman, H. (2010): Decreased susceptibility to zinc chloride is associated with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in Danish swine. *Vet Microbiol.* 2010; 142: 455-457. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.10.021
- Aarestrup, F.M., und Hasman, H. (2004): Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet Microbiol.* 2004; 100: 83-89. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.01.013
- Alain B. Pajarillo, E., Chae, J.-P., P. Balolong, M., Bum Kim, H., und Kang, D.-K. (2014): Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *The Journal of General and Applied Microbiology.* 2014; 60: 140-146. doi: 10.2323/jgam.60.140
- Amato, S.M., Fazen, C.H., Henry, T.C., Mok, W.W.K., Orman, M.A., Sandvik, E.L., Volzing, K.G., und Brynildsen, M.P. (2014): The role of metabolism in bacterial persistence. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 70-70. doi: 10.3389/fmicb.2014.00070
- An, H., Fairbrother, J.M., Désautels, C., Mabrouk, T., Dugourd, D., Dezfulian, H., und Harel, J. (2000): Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microb. Pathog.* 2000; 28: 291-300. doi: 10.1006/mpat.1999.0346
- Andersson, D.I., und Hughes, D. (2010): Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 260–271. doi: 10.1038/nrmicro2319
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., und Rosato, A. (2006): Zinc through the Three Domains of Life. *J. Proteome Res.* 2006; 5: 3173-3178. doi: 10.1021/pr0603699
- Anes, J., Mccusker, M.P., Fanning, S., und Martins, M. (2015): The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 587. doi: 10.3389/fmicb.2015.00587
- Anton, A., Weltrowski, A., Haney, C.J., Franke, S., Grass, G., Rensing, C., und Nies, D.H. (2004): Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2004; 186: 7499-7507. doi: 10.1128/JB.186.22.7499-7507.2004
- Argudín, M.A., Hofer, A., und Butaye, P. (2019): Heavy metal resistance in bacteria from animals. *Res. Vet. Sci.* 2019; 122: 132-147. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.11.007
- Ashbolt Nicholas, J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt Kristian, K., Collignon, P., Coors, A., Finley, R., Gaze William, H., Heberer, T., Lawrence John, R., Larsson, D.G.J., McEwen Scott, A., Ryan James, J., Schönfeld, J., Silley, P., Snape Jason, R., Van Den Eede, C., und Topp, E. (2013): Human Health Risk Assessment (HHRA) for Environmental Development and Transfer of Antibiotic Resistance. *Environ. Health Perspect.* 2013; 121: 993-1001. doi: 10.1289/ehp.1206316
- Askari, N., und Ghanbarpour, R. (2019): Molecular investigation of the colicinogenic *Escherichia coli* strains that are capable of inhibiting *E. coli* O157:H7 in vitro. *BMC Vet. Res.* 2019; 15: 14-14. doi: 10.1186/s12917-018-1771-y
- Baban, S. (2017): Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection among Infants and Young Children in Erbil City. 2017.
- Badia, R., Zanello, G., Chevaleyre, C., Lizardo, R., Meurens, F., Martínez, P., Brufau, J., und Salmon, H. (2012): Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* and β -galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with *Escherichia coli* F4 (K88). *Vet. Res.* 2012; 43: 4-4. doi: 10.1186/1297-9716-43-4
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., und McArthur, J.V. (2006): Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 2006; 14: 176–182. doi: 10.1016/j.tim.2006.02.006
- Baranzoni, G.M., Fratamico, P.M., Gangiredla, J., Patel, I., Bagi, L.K., Delannoy, S., Fach, P., Boccia, F., Anastasio, A., und Pepe, T. (2016): Characterization of Shiga Toxin Subtypes and Virulence

- Genes in Porcine Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 574-574. doi: 10.3389/fmicb.2016.00574
- Barth, S., Schwanitz, A., und Bauerfeind, R. (2011): Polymerase chain reaction–based method for the typing of F18 fimbriae and distribution of F18 fimbrial subtypes among porcine Shiga toxin–encoding *Escherichia coli* in Germany. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011; 23: 454-464. doi: 10.1177/1040638711403417
- Beard, S.J., Hashim, R., Membrillo-Hernández, J., Hughes, M.N., und Poole, R.K. (1997): Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (*o732*) encodes a cation transport ATPase. *Mol. Microbiol.* 1997; 25: 883-891. doi: 10.1111/j.1365-2958.1997.mmi518.x
- Beard, S.J., Hashim, R., Wu, G., Binet, M.R.B., Hughes, M.N., und Poole, R.K. (2000): Evidence for the transport of zinc(II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000; 184: 231-235. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09019.x
- Becerra-Castro, C., Machado, R.A., Vaz-Moreira, I., und Manaia, C.M. (2015): Assessment of copper and zinc salts as selectors of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Sci Total Environ.* 2015; 530-531: 367–372. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.102
- Bednorz, C., Guenther, S., Oelgeschläger, K., Kinnemann, B., Pieper, R., Hartmann, S., Tedin, K., Semmler, T., Neumann, K., Schierack, P., Bethe, A., und Wieler, L.H. (2013a): Feeding the probiotic *Enterococcus faecium* strain NCIMB 10415 to piglets specifically reduces the number of *Escherichia coli* pathotypes that adhere to the gut mucosa. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013a; 79: 7896-7904. doi: 10.1128/aem.03138-13
- Bednorz, C., Oelgeschläger, K., Kinnemann, B., Hartmann, S., Neumann, K., Pieper, R., Bethe, A., Semmler, T., Tedin, K., Schierack, P., Wieler, L.H., und Guenther, S. (2013b): The broader context of antibiotic resistance: Zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013b; 303: 396-403. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.06.004
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., und Martinez, J.L. (2015): Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13: 310-317. doi: 10.1038/nrmicro3439
- Binet, M.R.B., und Poole, R.K. (2000): Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 2000; 473: 67-70. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01509-x
- Birckner, V. (1919): The zinc content of some food products. *J. Biol. Chem.* 1919; 38: 191-203. doi:
- Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., und Piddock, L.J. (2015): Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13: 42-51. doi: 10.1038/nrmicro3380
- Blake, D.P., Hillman, K., Fenlon, D.R., und Low, J.C. (2003): Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 95: 428-436. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01988.x
- Blencowe, D.K., und Morby, A.P. (2003): Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003; 27: 291-311.
- Blindauer, C.A. (2015): Advances in the molecular understanding of biological zinc transport. *Chem. Commun. (Camb.)* 2015; 51: 4544–4563. doi: 10.1039/c4cc10174j
- Boniece, J.R., und Mallmann, W.L. (1950): The Optimum Incubation Temperature for the Primary Isolation of Coliform Organisms. *Journal (American Water Works Association)*. 1950; 42: 155-160.
- Bosák, J., Hrala, M., Mícenková, L., und Šmajš, D. (2020): Non-antibiotic antibacterial peptides and proteins of *Escherichia coli*: efficacy and potency of bacteriocins. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2020: 1-14. doi: 10.1080/14787210.2020.1816824
- Braun, V. (1989): The structurally related *exbB* and *tolQ* genes are interchangeable in conferring *tonB*-dependent colicin, bacteriophage, and albomycin sensitivity. *J. Bacteriol.* 1989; 171: 6387-6390. doi: 10.1128/jb.171.11.6387-6390.1989

- Brocklehurst, K.R., und Morby, A.P. (2000a): Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology. *Microbiology*. 2000a; 146: 2277-2282. doi: 10.1099/00221287-146-9-2277
- Brocklehurst, K.R., und Morby, A.P. (2000b): Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology. *Microbiology*. 2000b; 146 (Pt 9): 2277-2282. doi: 10.1099/00221287-146-9-2277
- Brown, N.L., Barrett, S.R., Camakaris, J., Lee, B.T.O., und Rouch, D.A. (1995): Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol. Microbiol.* 1995; 17: 1153-1166. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061153.x
- Burow, E., Rostalski, A., Harlizius, J., Gangl, A., Simoneit, C., Grobbel, M., Kollas, C., Tenhagen, B.-A., und Käsbohrer, A. (2019): Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Prev. Vet. Med.* 2019; 165: 52-62. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.02.008
- Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A., und Bouloc, P. (2009): Global Analysis of Extracytoplasmic Stress Signaling in *Escherichia coli*. *PLOS Genetics*. 2009; 5: e1000651. doi: 10.1371/journal.pgen.1000651
- Bywater, R., Silley, P., und Simjee, S. (2006): Antimicrobial breakpoints—Definitions and conflicting requirements. *Vet. Microbiol.* 2006; 118: 158-159. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.09.005
- Callaway, T.R., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Harvey, R.B., Genovese, K.J., Kennedy, C.N., Venn, D.W., und Nisbet, D.J. (2008): Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Anim. Health Res. Rev.* 2008; 9: 217-225. doi: 10.1017/s1466252308001540
- Cameron, A., Zaheer, R., Adator, E.H., Barbieri, R., Reuter, T., und Mcallister, T.A. (2019): Bacteriocin Occurrence and Activity in *Escherichia coli* Isolated from Bovines and Wastewater. *Toxins (Basel)*. 2019; 11: 475. doi: 10.3390/toxins11080475
- Campbell, J.M., Crenshaw, J.D., und Polo, J. (2013): The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol.* 2013; 4: 19-19. doi: 10.1186/2049-1891-4-19
- Carattoli, A. (2009): Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53: 2227–2238. doi: 10.1128/aac.01707-08
- Carlin, A., Shi, W., Dey, S., und Rosen, B.P. (1995): The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* 1995; 177: 981-986. doi: 10.1128/jb.177.4.981-986.1995
- Casanova, N.A., Redondo, L.M., Dailoff, G.C., Arenas, D., und Fernández Miyakawa, M.E. (2018): Overview of the role of Shiga toxins in porcine edema disease pathogenesis. *Toxicon.* 2018; 148: 149-154. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.04.019
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., und Cavard, D. (2007): Colicin Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007; 71: 158-229. doi: 10.1128/MMBR.00036-06
- Casey, T.A., und Bosworth, B.T. (2009): Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2009; 21: 25-30. doi: 10.1177/104063870902100104
- Cavaco, L.M., Hasman, H., Stegger, M., Andersen, P.S., Skov, R., Fluit, A.C., Ito, T., und Aarestrup, F.M. (2010): Cloning and occurrence of *czrC*, a gene conferring cadmium and zinc resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 3605-3608. doi: 10.1128/AAC.00058-10
- Cavicchio, L., Dotto, G., Giacomelli, M., Giovanardi, D., Grilli, G., Franciosini, M.P., Trocino, A., und Piccirillo, A. (2015): Class 1 and class 2 integrons in avian pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Italy. *Poult. Sci.* 2015; 94: 1202-1208. doi: 10.3382/ps/pev095
- Cazares, A., Moore, M.P., Hall, J.P.J., Wright, L.L., Grimes, M., Emond-Rhéault, J.-G., Pongchaikul, P., Santanirand, P., Levesque, R.C., Fothergill, J.L., und Winstanley, C. (2020): A megaplasmid

- family driving dissemination of multidrug resistance in *Pseudomonas*. *Nat. Commun.* 2020; 11: 1370. doi: 10.1038/s41467-020-15081-7
- Chandrangsu, P., Rensing, C., und Helmann, J.D. (2017): Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2017; 15: 338-350. doi: 10.1038/nrmicro.2017.15
- Changkaew, K., Intarapuk, A., Utrarachkij, F., Nakajima, C., Suthienkul, O., und Suzuki, Y. (2015): Antimicrobial Resistance, Extended-Spectrum beta-Lactamase Productivity, and Class 1 Integrons in *Escherichia coli* from Healthy Swine. *J. Food Prot.* 2015; 78: 1442–1450. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-14-445
- Chao, Y., und Fu, D. (2004): Kinetic Study of the Antiport Mechanism of an *Escherichia coli* Zinc Transporter, *ZitB*. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 12043-12050. doi: 10.1074/jbc.M313510200
- Chapman, T.A., Wu, X.-Y., Barchia, I., Bettelheim, K.A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M., und Chin, J.J.-C. (2006): Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 4782–4795. doi: 10.1128/aem.02885-05
- Chaudhuri, R.R., und Henderson, I.R. (2012): The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12: 214-226. doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.005
- Choi, S.-H., Lee, K.-L., Shin, J.-H., Cho, Y.-B., Cha, S.-S., und Roe, J.-H. (2017): Zinc-dependent regulation of zinc import and export genes by *Zur*. *Nat. Commun.* 2017; 8: 15812. doi: 10.1038/ncomms15812
- Choudhury, R., und Srivastava, S. (2001): Mechanism of zinc resistance in *Pseudomonas putida* strain S4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2001; 17: 149-153. doi: 10.1023/A:1016666000384
- Ciesinski, L., Guenther, S., Pieper, R., Kalisch, M., Bednorz, C., und Wieler, L.H. (2018): High dietary zinc feeding promotes persistence of multi-resistant *E. coli* in the swine gut. *PLoS One.* 2018; 13: e0191660. doi: 10.1371/journal.pone.0191660
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). "Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals, 5th Edition", in: *CLSI standard VET01*. P. Wayne. 5. (USA).
- Cogliani, C., Goossens, H., und Greko, C. (2011): Restricting Antimicrobial Use in Food Animals: Lessons from Europe. *Microbe Magazine.* 2011; 6: 274-279. doi: 10.1128/microbe.6.274.1
- Colaço, H.G., Santo, P.E., Matias, P.M., Bandejas, T.M., und Vicente, J.B. (2016): Roles of *Escherichia coli* *ZinT* in cobalt, mercury and cadmium resistance and structural insights into the metal binding mechanism. *Metallomics.* 2016; 8: 327-336. doi: 10.1039/C5MT00291E
- Conly, J., und Johnston, B. (2005): Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2005; 16: 159-160. doi: 10.1155/2005/892058
- Conway, T., Krogfelt, K.A., und Cohen, P.S. (2004): The Life of Commensal *Escherichia coli* in the Mammalian Intestine. *EcoSal Plus.* 2004; 1. doi: 10.1128/ecosalplus.8.3.1.2
- Cooksey, D.A. (1987): Characterization of a Copper Resistance Plasmid Conserved in Copper-Resistant Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987; 53: 454-456. doi: 10.1128/AEM.53.2.454-456.1987
- Crane, J.K., Byrd, I.W., und Boedeker, E.C. (2011): Virulence inhibition by zinc in shiga-toxicogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2011; 79: 1696-1705. doi: 10.1128/IAI.01099-10
- Crane, J.K., Naeher, T.M., Shulgina, I., Zhu, C., und Boedeker, E.C. (2007): Effect of zinc in enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* 2007; 75: 5974-5984. doi: 10.1128/IAI.00750-07
- Crichton, R.R. (2008). Zinc: Lewis Acid and Gene Regulator In: *Biological Inorganic Chemistry/ Hrsg.: R.R. Crichton, S. 197-210* Amsterdam: Elsevier - ISBN 978-0-444-52740-0
- Cursino, L., Smarda, J., Chartone-Souza, E., und Nascimento, A.M.A. (2002): Recent updated aspects of colicins of *Enterobacteriaceae*. *Braz. J. Microbiol.* 2002; 33: 185-195. doi: 10.1590/S1517-83822002000300001

- Cutler, S.A., Lonergan, S.M., Cornick, N., Johnson, A.K., und Stahl, C.H. (2007): Dietary inclusion of colicin e1 is effective in preventing postweaning diarrhea caused by F18-positive *Escherichia coli* in pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 3830-3835. doi: 10.1128/aac.00360-07
- Debroy, C., Fratamico, P.M., Yan, X., Baranzoni, G., Liu, Y., Needleman, D.S., Tebbs, R., O'Connell, C.D., Allred, A., Swimley, M., Mwangi, M., Kapur, V., Raygoza Garay, J.A., Roberts, E.L., und Katani, R. (2016): Comparison of O-Antigen Gene Clusters of All O-Serogroups of *Escherichia coli* and Proposal for Adopting a New Nomenclature for O-Typing. *PLoS One.* 2016; 11: e0147434. doi: 10.1371/journal.pone.0147434
- Debroy, C., Roberts, E., und Fratamico, P. (2011): Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases.* 2011; 12: 169-185. doi: 10.1017/S1466252311000193
- Delisle, B., Calinescu, C., Mateescu, M.A., Fairbrother, J.M., und Nadeau, E. (2012): Oral immunization with F4 fimbriae and CpG formulated with carboxymethyl starch enhances F4-specific mucosal immune response and modulates Th1 and Th2 cytokines in weaned pigs. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012; 15: 642-656. doi: 10.18433/j30w32
- Delmar, J.A., Su, C.-C., und Yu, E.W. (2015): Heavy metal transport by the CusCFBA efflux system. *Protein Science : A Publication of the Protein Society.* 2015; 24: 1720-1736. doi: 10.1002/pro.2764
- Deredjian, A., Colinon, C., Brothier, E., Favre-Bonté, S., Cournoyer, B., und Nazaret, S. (2011): Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res. Microbiol.* 2011; 162: 689-700. doi: 10.1016/j.resmic.2011.06.007
- Deus, D., Krschek, C., Pfeifer, Y., Sharifi, A.R., Fiegen, U., Reich, F., Klein, G., und Kehrenberg, C. (2017): Comparative analysis of the susceptibility to biocides and heavy metals of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates of human and avian origin, Germany. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2017; 88: 88-92. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.023
- Diaz-Aroca, E., De La Cruz, F., Zabala, J.C., und Ortiz, J.M. (1984): Characterization of the new insertion sequence IS91 from an alpha-hemolysin plasmid of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG.* 1984; 193: 493-499. doi: 10.1007/BF00382089
- Docic, M., und Bilkei, G. (2003): Differences in antibiotic resistance in *Escherichia coli*, isolated from East-European swine herds with or without prophylactic use of antibiotics. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2003; 50: 27-30. doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00609.x
- Dubreuil, J.D. (1997): *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology.* 1997; 143: 1783-1795. doi: 10.1099/00221287-143-6-1783
- Dubreuil, J.D., Isaacson, R.E., und Schifferli, D.M. (2016): Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus.* 2016; 7: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016
- Easton, J.A., Thompson, P., und Crowder, M.W. (2006): Time-dependent Translational Response of *E. coli* to Excess Zn(II). *Journal of Biomolecular Techniques : JBT.* 2006; 17: 303-307. doi:
- Egler, M., Grosse, C., Grass, G., und Nies, D.H. (2005): Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2005; 187: 2297-2307. doi: 10.1128/JB.187.7.2297-2307.2005
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2020): The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 10.0, 2020. 2020.
- Fairbrother, J.M., und Nadeau, É. (2019). Colibacillosis In: *Diseases of Swine/ Hrsg.: J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson & J. Zhang, 807-834* -
- Fairbrother, J.M., Nadeau, É., und Gyles, C.L. (2005): *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: An update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 2005; 6: 17-39. doi: 10.1079/ahr2005105

- Fang, L., Li, X., Li, L., Li, S., Liao, X., Sun, J., und Liu, Y. (2016): Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. *Sci. Rep.* 2016; 6: 25312. doi: 10.1038/srep25312
- Fard, R.M.N., Heuzenroeder, M.W., und Barton, M.D. (2011): Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. *Vet. Microbiol.* 2011; 148: 276–282. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.09.002
- Fernando, D.M., und Kumar, A. (2013): Resistance-Nodulation-Division Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria: Role in Virulence. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2013; 2: 163-181. doi: 10.3390/antibiotics2010163
- Ferreira Da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O.C., und Manaia, C.M. (2007): Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60: 166-176. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00268.x
- Foster, L.J.R., Moy, Y.P., und Rogers, P.L. (2000): Metal binding capabilities of *Rhizobium etli* and its extracellular polymeric substances. *Biotechnol. Lett.* 2000; 22: 1757-1760. doi: 10.1023/A:1005694018653
- Franzin, F.M., und Sircili, M.P. (2015): Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 534738-534738. doi: 10.1155/2015/534738
- Fratamico, P.M., Debroy, C., Liu, Y., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M., und Feng, P. (2016): Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 644-644. doi: 10.3389/fmicb.2016.00644
- Fröhlicher, E., Krause, G., Zweifel, C., Beutin, L., und Stephan, R. (2008): Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 144-144. doi: 10.1186/1471-2180-8-144
- Frydendahl, K. (2002): Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet. Microbiol.* 2002; 85: 169-182. doi: 10.1016/S0378-1135(01)00504-1
- Frydendahl, K., Kåre Jensen, T., Strodl Andersen, J., Fredholm, M., und Evans, G. (2003): Association between the porcine *Escherichia coli* F18 receptor genotype and phenotype and susceptibility to colonisation and postweaning diarrhoea caused by *E. coli* O138:F18. *Vet. Microbiol.* 2003; 93: 39-51. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00348-6
- Furuya, E.Y., und Lowy, F.D. (2006): Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Micro.* 2006; 4: 36-45.
- Gabbianelli, R., Scotti, R., Ammendola, S., Petrarca, P., Nicolini, L., und Battistoni, A. (2011): Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 36. doi: 10.1186/1471-2180-11-36
- Gadd, G.M. (1992): Metals and microorganisms: a problem of definition. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992; 100: 197-203. doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb14040.x
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J.C., und Van Immerseel, F. (2006): Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 946-949. doi: 10.1128/AEM.72.1.946-949.2006
- García-Meniño, I., García, V., Mora, A., Díaz-Jiménez, D., Flament-Simon, S.C., Alonso, M.P., Blanco, J.E., Blanco, M., und Blanco, J. (2018): Swine Enteric Colibacillosis in Spain: Pathogenic Potential of mcr-1 ST10 and ST131 *E. coli* Isolates. *Front. Microbiol.* 2018; 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02659
- Ghazisaeedi, F., Ciesinski, L., Bednorz, C., Johanns, V., Pieper, L., Tedin, K., Wieler, L.H., und Günther, S. (2020): Phenotypic zinc resistance does not correlate with antimicrobial multi-resistance in fecal *E. coli* isolates of piglets. *Gut Pathog.* 2020; 12: 4. doi: 10.1186/s13099-019-0342-5

- Giachi, G., Pallecchi, P., Romualdi, A., Ribechini, E., Lucejko, J.J., Colombini, M.P., und Mariotti Lippi, M. (2013): Ingredients of a 2,000-y-old medicine revealed by chemical, mineralogical, and botanical investigations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013; 110: 1193-1196. doi: 10.1073/pnas.1216776110
- Gillings, M.R., Krishnan, S., Worden, P.J., und Hardwick, S.A. (2008): Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008; 287: 56-62. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01291.x
- Gillor, O., Giladi, I., und Riley, M.A. (2009): Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 165-165. doi: 10.1186/1471-2180-9-165
- Gilston, B.A., Wang, S., Marcus, M.D., Canalizo-Hernandez, M.A., Swindell, E.P., Xue, Y., Mondragon, A., und O'halloran, T.V. (2014): Structural and mechanistic basis of zinc regulation across the *E. coli* Zur regulon. *PLoS Biol.* 2014; 12: e1001987. doi: 10.1371/journal.pbio.1001987
- Gordon, D.M., und Cowling, A. (2003): The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology.* 2003; 149: 3575-3586. doi: 10.1099/mic.0.26486-0
- Grass, G., Fan, B., Rosen, B.P., Franke, S., Nies, D.H., und Rensing, C. (2001): ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 4664-4667. doi: 10.1128/jb.183.15.4664-4667.2001
- Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D.H., Kucharski, L.M., Maguire, M.E., und Rensing, C. (2005): The Metal Permease ZupT from *Escherichia coli* Is a Transporter with a Broad Substrate Spectrum. *J. Bacteriol.* 2005; 187: 1604-1611. doi: 10.1128/JB.187.5.1604-1611.2005
- Grass, G., Wong, M.D., Rosen, B.P., Smith, R.L., und Rensing, C. (2002): ZupT Is a Zn(II) Uptake System in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2002; 184: 864-866. doi: 10.1128/jb.184.3.864-866.2002
- Guevarra, R.B., Hong, S.H., Cho, J.H., Kim, B.-R., Shin, J., Lee, J.H., Kang, B.N., Kim, Y.H., Wattanaphansak, S., Isaacson, R.E., Song, M., und Kim, H.B. (2018): The dynamics of the piglet gut microbiome during the weaning transition in association with health and nutrition. *J Anim Sci Biotechnol.* 2018; 9: 54-54. doi: 10.1186/s40104-018-0269-6
- Guevarra, R.B., Lee, J.H., Lee, S.H., Seok, M.-J., Kim, D.W., Kang, B.N., Johnson, T.J., Isaacson, R.E., und Kim, H.B. (2019): Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *J Anim Sci Biotechnol.* 2019; 10: 1-1. doi: 10.1186/s40104-018-0308-3
- Gullberg, E., Albrecht, L.M., Karlsson, C., Sandegren, L., und Andersson, D.I. (2014): Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio.* 2014; 5: e01918-01914. doi: 10.1128/mBio.01918-14
- Gupta, A., Morby, A.P., Turner, J.S., Whitton, B.A., und Robinson, N.J. (1993): Deletion within the metallothionein locus of cadmium-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (HIP1). *Mol. Microbiol.* 1993; 7: 189-195. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01110.x
- Gupta, S.D., Lee, B.T., Camakaris, J., und Wu, H.C. (1995): Identification of *cutC* and *cutF* (*nlpE*) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1995; 177: 4207-4215. doi: 10.1128/jb.177.15.4207-4215.1995
- Gyles, C.L. (1992): *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can. J. Microbiol.* 1992; 38: 734-746. doi: 10.1139/m92-120
- Hahn, J.D., und Baker, D.H. (1993): Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacologic levels of zinc. *J. Anim. Sci.* 1993; 71: 3020-3024. doi: 10.2527/1993.71113020x
- Haiko, J., und Westerlund-Wikström, B. (2013): The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel).* 2013; 2: 1242-1267. doi: 10.3390/biology2041242
- Hammami, R., Fernandez, B., Lacroix, C., und Fliss, I. (2013): Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013; 70: 2947-2967. doi: 10.1007/s00018-012-1202-3
- Han, Y.-K., und Thacker, P.A. (2010): Effects of Antibiotics, Zinc Oxide or a Rare Earth Mineral-Yeast Product on Performance, Nutrient Digestibility and Serum Parameters in Weanling Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 2010; 23: 1057-1065. doi: 10.5713/ajas.2010.90569

- Hardy, K.G., Meynell, G.G., Dowman, J.E., und Spratt, B.G. (1973): Two major groups of colicin factors: their evolutionary significance. *Mol. Gen. Genet.* 1973; 125: 217-230. doi: 10.1007/bf00270744
- Harel, J., Lapointe, H., Fallara, A., Lortie, L.A., Bigras-Poulin, M., Larivière, S., und Fairbrother, J.M. (1991): Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 745-752. doi: 10.1128/JCM.29.4.745-752.1991
- Harrington, S.M., Sheikh, J., Henderson, I.R., Ruiz-Perez, F., Cohen, P.S., und Nataro, J.P. (2009): The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect. Immun.* 2009; 77: 2465-2473. doi: 10.1128/IAI.01494-08
- Harris, R.M., Webb, D.C., Howitt, S.M., und Cox, G.B. (2001): Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 5008-5014.
- Harrison, J.J., Turner, R.J., und Ceri, H. (2005): High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol.* 2005; 5: 53. doi: 10.1186/1471-2180-5-53
- Hassan, M.-E.-T., Van Der Lelie, D., Springael, D., Römling, U., Ahmed, N., und Mergeay, M. (1999): Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* 1999; 238: 417-425. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00349-2
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., und Boudabous, A. (1998): Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology.* 1998; 64: 7-15. doi: 10.1016/S0960-8524(97)00161-2
- He, L.Y., Liu, Y.S., Su, H.C., Zhao, J.L., Liu, S.S., Chen, J., Liu, W.R., und Ying, G.G. (2014): Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlots environments: identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables. *Environ. Sci. Technol.* 2014; 48: 13120-13129. doi: 10.1021/es5041267
- Henderson, L.M., Brewer, G.J., Dressman, J.B., Swidan, S.Z., Duross, D.J., Adair, C.H., Barnett, J.L., und Berardi, R.R. (1995): Effect of intragastric pH on the absorption of oral zinc acetate and zinc oxide in young healthy volunteers. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 1995; 19: 393-397. doi: 10.1177/0148607195019005393
- Henkel, G., und Krebs, B. (2004): Metallothioneins: Zinc, Cadmium, Mercury, and Copper Thiols and Selenols Mimicking Protein Active Site Features – Structural Aspects and Biological Implications. *Chem. Rev.* 2004; 104: 801-824. doi: 10.1021/cr020620d
- Heo, J.M., Opapeju, F.O., Pluske, J.R., Kim, J.C., Hampson, D.J., und Nyachoti, C.M. (2013): Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*. 2013; 97: 207-237. doi: 10.1111/j.1439-0396.2012.01284.x
- Hernando-Amado, S., Sanz-García, F., Blanco, P., und Martínez, J.L. (2017): Fitness costs associated with the acquisition of antibiotic resistance. *Essays Biochem.* 2017; 61: 37-48. doi: 10.1042/ebc20160057
- Heuer, H., Binh, C.T.T., Jechalke, S., Kopmann, C., Zimmerling, U., Krögerrecklenfort, E., Ledger, T., González, B., Top, E., und Smalla, K. (2012): IncP-1 ϵ Plasmids are Important Vectors of Antibiotic Resistance Genes in Agricultural Systems: Diversification Driven by Class 1 Integron Gene Cassettes. *Front. Microbiol.* 2012; 3: 2. doi: 10.3389/fmicb.2012.00002
- Higham, D.P., Sadler, P.J., und Scawen, M.D. (1984): Cadmium-Resistant *Pseudomonas putida* Synthesizes Novel Cadmium Proteins. *Science.* 1984; 225: 1043-1046. doi: 10.1126/science.225.4666.1043
- Hill, G.M., Mahan, D.C., Carter, S.D., Cromwell, G.L., Ewan, R.C., Harrold, R.L., Lewis, A.J., Miller, P.S., Shurson, G.C., und Veum, T.L. (2001): Effect of pharmacological concentrations of zinc oxide with or without the inclusion of an antibacterial agent on nursery pig performance. *J. Anim. Sci.* 2001; 79: 934-941. doi: 10.2527/2001.794934x
- Hinchliffe, P., Symmons, M.F., Hughes, C., und Koronakis, V. (2013): Structure and Operation of Bacterial Tripartite Pumps. *Annu. Rev. Microbiol.* 2013; 67: 221-242. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155718

- Hobman, J.L., und Crossman, L.C. (2015): Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J. Med. Microbiol.* 2015; 64: 471-497. doi: 10.1099/jmm.0.023036-0
- Hobman, J.L., Penn, C.W., und Pallen, M.J. (2007): Laboratory strains of *Escherichia coli*: model citizens or deceitful delinquents growing old disgracefully? *Mol. Microbiol.* 2007; 64: 881-885. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05710.x
- Hoch, E., Lin, W., Chai, J., Hershinkel, M., Fu, D., und Sekler, I. (2012): Histidine pairing at the metal transport site of mammalian ZnT transporters controls Zn²⁺ over Cd²⁺ selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109: 7202-7207. doi: 10.1073/pnas.1200362109
- Hoegler, K.J., und Hecht, M.H. (2018): Artificial Gene Amplification in *Escherichia coli* Reveals Numerous Determinants for Resistance to Metal Toxicity. *J. Mol. Evol.* 2018; 86: 103-110. doi: 10.1007/s00239-018-9830-3
- Højberg, O., Canibe, N., Poulsen, H.D., Hedemann, M.S., und Jensen, B.B. (2005): Influence of Dietary Zinc Oxide and Copper Sulfate on the Gastrointestinal Ecosystem in Newly Weaned Piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 2267-2277. doi: 10.1128/aem.71.5.2267-2277.2005
- Hollis, G.R., Carter, S.D., Cline, T.R., Crenshaw, T.D., Cromwell, G.L., Hill, G.M., Kim, S.W., Lewis, A.J., Mahan, D.C., Miller, P.S., Stein, H.H., und Veum, T.L. (2005): Effects of replacing pharmacological levels of dietary zinc oxide with lower dietary levels of various organic zinc sources for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 2005; 83: 2123-2129. doi: 10.2527/2005.8392123x
- Hölzel, C.S., Müller, C., Harms, K.S., Mikolajewski, S., Schäfer, S., Schwaiger, K., und Bauer, J. (2012): Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environ. Res.* 2012; 113: 21–27. doi: 10.1016/j.envres.2012.01.002
- Imberechts, H., De Greve, H., und Lintermans, P. (1992): The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Vet. Microbiol.* 1992; 31: 221-233. doi: 10.1016/0378-1135(92)90080-d
- Isaacson, R., und Kim, H.B. (2012): The intestinal microbiome of the pig. *Anim. Health Res. Rev.* 2012; 13: 100-109. doi: 10.1017/S1466252312000084
- J. Genovese, K., Harvey, R.B., Anderson, R.C., und Nisbet, D.J. (2001): Protection of Suckling Neonatal Pigs Against Infection with an Enterotoxigenic *Escherichia coli* Expressing 987P Fimbriae by the Administration of a Bacterial Competitive Exclusion Culture. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2001; 13: 223-228. doi: 10.1080/089106001753341309
- Jackson, R.J., Binet, M.R.B., Lee, L.J., Ma, R., Graham, A.I., Mcleod, C.W., und Poole, R.K. (2008): Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008; 289: 219-224. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01386.x
- Jensen, J., Larsen, M.M., und Bak, J. (2016): National monitoring study in Denmark finds increased and critical levels of copper and zinc in arable soils fertilized with pig slurry. *Environmental Pollution.* 2016; 214: 334-340. doi: 10.1016/j.envpol.2016.03.034
- Jensen, P. (1986): Observations on the maternal behaviour of free-ranging domestic pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1986; 16: 131-142. doi: 10.1016/0168-1591(86)90105-X
- Jin, L.Z., Marquardt, R.R., und Zhao, X. (2000): A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 4200-4204. doi: 10.1128/aem.66.10.4200-4204.2000
- Joensen, K.G., Tetzschner, A.M.M., Iguchi, A., Aarestrup, F.M., und Scheutz, F. (2015): Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53: 2410-2426. doi: 10.1128/JCM.00008-15
- Johnson, A.M., Kaushik, R.S., Francis, D.H., Fleckenstein, J.M., und Hardwidge, P.R. (2009): Heat-Labile Enterotoxin Promotes *Escherichia coli* Adherence to Intestinal Epithelial Cells. *J. Bacteriol.* 2009; 191: 178-186. doi: 10.1128/jb.00822-08
- Johnson, T.J., und Nolan, L.K. (2009): Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 2009; 73: 750–774. doi: 10.1128/mnbr.00015-09

- Johnson, T.J., Shepard, S.M., Rivet, B., Danzeisen, J.L., und Carattoli, A. (2011): Comparative genomics and phylogeny of the Inc11 plasmids: A common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Plasmid*. 2011; 66: 144-151. doi: 10.1016/j.plasmid.2011.07.003
- Kahlmeter, G., Brown, D.F.J., Goldstein, F.W., Macgowan, A.P., Mouton, J.W., Österlund, A., Rodloff, A., Steinbakk, M., Urbaskova, P., und Vatopoulos, A. (2003): European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52: 145-148. doi: 10.1093/jac/dkg312
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., und Mobley, H.L.T. (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Micro.* 2004; 2: 123-140. doi: 10.1038/nrmicro818
- Karimi Dehkordi, M., Halaji, M., und Nouri, S. (2020): Prevalence of class 1 integron in *Escherichia coli* isolated from animal sources in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Trop. Med. Health.* 2020; 48: 16-16. doi: 10.1186/s41182-020-00202-1
- Kauffmann, F. (1964). Das Kauffmann-White Schema In: *The World Problem of Salmonellosis/ Hrsg.: E. Van Oye*, 21-66 Dordrecht: Springer Netherlands - ISBN 978-94-011-9842-4
- Kauffmann, F., und Vahlne, G. (1945): ÜBER DIE BEDEUTUNG DES SEROLOGISCHEN FORMENWECHSELS FÜR DIE BAKTERIOPHAGEN-WIRKUNG IN DER COLI-GRUPPE. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. 1945; 22: 119-137. doi: 10.1111/j.1699-0463.1945.tb05033.x
- Kenworthy, R., und Crabb, W.E. (1963): The intestinal flora of young pigs, with reference to early weaning, *Escherichia coli* and scours. *J. Comp. Pathol.* 1963; 73: 215-228. doi: 10.1016/s0368-1742(63)80025-9
- Kershaw, C.J., Brown, N.L., und Hobman, J.L. (2007): Zinc dependence of *zinT* (*yodA*) mutants and binding of zinc, cadmium and mercury by *ZinT*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 364: 66-71. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.094
- Kholodii, G.Y., Mindlin, S.Z., Bass, I.A., Yurieva, O.V., Minakhina, S.V., und Nikiforov, V.G. (1995): Four genes, two ends, and a *res* region are involved in transposition of Tn5053: a paradigm for a novel family of transposons carrying either a *mer* operon or an integron. *Mol. Microbiol.* 1995; 17: 1189-1200. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061189.x
- Kim, E.-H., Nies, D.H., Mcevoy, M.M., und Rensing, C. (2011): Switch or Funnel: How RND-Type Transport Systems Control Periplasmic Metal Homeostasis. *J. Bacteriol.* 2011; 193: 2381. doi: 10.1128/JB.01323-10
- Kim, H.-S., Nagore, D., und Nikaido, H. (2010): Multidrug Efflux Pump MdtBC of *Escherichia coli* Is Active Only as a B2C Heterotrimer. *J. Bacteriol.* 2010; 192: 1377-1386. doi:
- Kim, H.-S., und Nikaido, H. (2012): Different functions of MdtB and MdtC subunits in the heterotrimeric efflux transporter MdtB(2)C complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 2012; 51: 4188-4197. doi: 10.1021/bi300379y
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., und Bolton, E.E. (2018): PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.* 2018; 47: D1102-D1109. doi: 10.1093/nar/gky1033
- Klein, J.S., und Lewinson, O. (2011): Bacterial ATP-driven transporters of transition metals: physiological roles, mechanisms of action, and roles in bacterial virulence. *Metallomics.* 2011; 3: 1098-1108. doi: 10.1039/c1mt00073j
- Kloubert, V., Blaabjerg, K., Dalgaard, T.S., Poulsen, H.D., Rink, L., und Wessels, I. (2018): Influence of zinc supplementation on immune parameters in weaned pigs. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2018; 49: 231-240. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.01.006
- Knarreborg, A., Miquel, N., Granli, T., und Jensen, B.B. (2002): Establishment and application of an *in vitro* methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology.* 2002; 99: 131-140. doi: 10.1016/S0377-8401(02)00069-X
- Knecht, D., Cholewińska, P., Jankowska-Mąkosa, A., und Czyż, K. (2020): Development of Swine's Digestive Tract Microbiota and Its Relation to Production Indices-A Review. *Animals (Basel).* 2020; 10: 527. doi: 10.3390/ani10030527

- Kommineni, S., Bretl, D.J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P., Cao, Y., Bousounis, P., Kristich, C.J., und Salzman, N.H. (2015): Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*. 2015; 526: 719-722. doi: 10.1038/nature15524
- Kongsted, H., Pedersen, K., Hjulsager, C.K., Larsen, L.E., Pedersen, K.S., Jorsal, S.E., und Bækbo, P. (2018): Diarrhoea in neonatal piglets: a case control study on microbiological findings. *Porcine Health Manag.* 2018; 4: 17-17. doi: 10.1186/s40813-018-0094-5
- Konstantinov, S.R., Awati, A.A., Williams, B.A., Miller, B.G., Jones, P., Stokes, C.R., Akkermans, A.D., Smidt, H., und De Vos, W.M. (2006): Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ. Microbiol.* 2006; 8: 1191-1199. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01009.x
- Kotrba, P., Dolečková, L., De Lorenzo, V., und Ruml, T. (1999): Enhanced Bioaccumulation of Heavy Metal Ions by Bacterial Cells Due to Surface Display of Short Metal Binding Peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 1092-1098. doi: 10.1128/AEM.65.3.1092-1098.1999
- Kourmouli, A., Valenti, M., Van Rijn, E., Beaumont, H.J.E., Kalantzi, O.-I., Schmidt-Ott, A., und Biskos, G. (2018): Can disc diffusion susceptibility tests assess the antimicrobial activity of engineered nanoparticles? *Journal of Nanoparticle Research*. 2018; 20: 62. doi: 10.1007/s11051-018-4152-3
- La Cruz, F.D., und Davies, J. (2000): Horizontal gene transfer and the origin of species: Lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 2000; 8: 128–133. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01703-0
- Lacanna, E., Bigosch, C., Kaefer, V., Boehm, A., und Becker, A. (2016): Evidence for *Escherichia coli* Diguanylate Cyclase DgcZ Interlinking Surface Sensing and Adhesion via Multiple Regulatory Routes. *J. Bacteriol.* 2016; 198: 2524-2535. doi: 10.1128/JB.00320-16
- Lacotte, Y., Ploy, M.-C., und Raheison, S. (2017): Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. *ISME J.* 2017; 11: 1535-1544. doi: 10.1038/ismej.2017.38
- Lallès, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., und Stokes, C.R. (2007): Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.* 2007; 66: 260-268. doi: 10.1017/S0029665107005484
- Lambrecht, E., Van Coillie, E., Van Meervenne, E., Boon, N., Heyndrickx, M., und Van De Wiele, T. (2019): Commensal *E. coli* rapidly transfer antibiotic resistance genes to human intestinal microbiota in the Mucosal Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (M-SHIME). *Int. J. Food Microbiol.* 2019; 311: 108357. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108357
- Lathem, W.W., Bergsbaken, T., Witowski, S.E., Perna, N.T., und Welch, R.A. (2003): Acquisition of *stcE* a C1 Esterase Inhibitor–Specific Metalloprotease, during the Evolution of *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003; 187: 1907-1914. doi: 10.1086/374719
- Lavoie, S.P.S., Anne O. (2018): Transcriptional responses of *Escherichia coli* during recovery from inorganic or organic mercury exposure. *BMC Genomics*. 2018; 19: 52. doi: 10.1186/s12864-017-4413-z
- Lazar, V., Ditu, L.-M., Pircalabioru, G.G., Gheorghe, I., Curutiu, C., Holban, A.M., Picu, A., Petcu, L., und Chifiriuc, M.C. (2018): Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1830-1830. doi: 10.3389/fimmu.2018.01830
- Le Thanh, B.V., Htoo, J.K., Wang, L.F., und Zijlstra, R.T. (2017): Effects of prebiotic or organic acid supplementation on growth performance, nutrient digestibility, and plasma cytokines of weaned pigs housed under poor sanitary conditions. *J. Anim. Sci.* 2017; 95: 138-138. doi: 10.2527/asasmw.2017.285
- Leblanc, S.K.D., Oates, C.W., und Raivio, T.L. (2011): Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2011; 193: 3367-3375. doi: 10.1128/JB.01534-10
- Lee, L.J., Barrett, J.A., und Poole, R.K. (2005): Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. *J. Bacteriol.* 2005; 187: 1124–1134. doi: 10.1128/jb.187.3.1124-1134.2005

- Lee, S.M., Grass, G., Haney, C.J., Fan, B., Rosen, B.P., Anton, A., Nies, D.H., und Rensing, C. (2002): Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002; 215: 273–278. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11402.x
- Legatzki, A., Grass, G., Anton, A., Rensing, C., und Nies, D.H. (2003): Interplay of the Czc System and Two P-Type ATPases in Conferring Metal Resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J. Bacteriol.* 2003; 185: 4354-4361. doi: 10.1128/JB.185.15.4354-4361.2003
- Leimbach, A., Hacker, J., und Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity In: *Between Pathogenicity and Commensalism/ Hrsg.: U. Dobrindt, J.H. Hacker & C. Svanborg*, 3-32 Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg - ISBN 978-3-642-36560-7
- Levin-Reisman, I., Brauner, A., Ronin, I., und Balaban, N.Q. (2019): Epistasis between antibiotic tolerance, persistence, and resistance mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019; 116: 14734. doi: 10.1073/pnas.1906169116
- Lewis, K. (2007): Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5: 48-56. doi: 10.1038/nrmicro1557
- Lewis, K. (2010): Persister Cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64: 357-372. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134306
- Li, L.-G., Xia, Y., und Zhang, T. (2017): Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. *ISME J.* 2017; 11: 651-662. doi: 10.1038/ismej.2016.155
- Li, L.-G., Yin, X., und Zhang, T. (2018): Tracking antibiotic resistance gene pollution from different sources using machine-learning classification. *Microbiome.* 2018; 6: 93. doi: 10.1186/s40168-018-0480-x
- Lima De Silva, A.A., De Carvalho, M.a.R., De Souza, S.a.L., Dias, P.M.T., Da Silva Filho, R.G., De Meirelles Saramago, C.S., De Melo Bento, C.A., und Hofer, E. (2012): Heavy metal tolerance (Cr, Ag AND Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 2012; 43: 1620-1631. doi: 10.1590/S1517-838220120004000047
- Liu, H.-Y., Roos, S., Jonsson, H., Ahl, D., Dicksved, J., Lindberg, J.E., und Lundh, T. (2015): Effects of *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus reuteri* on gut barrier function and heat shock proteins in intestinal porcine epithelial cells. *Physiol Rep.* 2015; 3: e12355. doi: 10.14814/phy2.12355
- Liu, S., Killen, E., Lim, M., Gunawan, C., und Amal, R. (2014): The effect of common bacterial growth media on zinc oxide thin films: identification of reaction products and implications for the toxicology of ZnO. *RSC Advances.* 2014; 4: 4363-4370. doi: 10.1039/C3RA46177G
- Loos, M., Geens, M., Schauvliege, S., Gasthuys, F., Van Der Meulen, J., Dubreuil, J.D., Goddeeris, B.M., Niewold, T., und Cox, E. (2012): Role of heat-stable enterotoxins in the induction of early immune responses in piglets after infection with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2012; 7: e41041-e41041. doi: 10.1371/journal.pone.0041041
- Louie, M., und Cockerill, F.R., 3rd (2001): Susceptibility testing. Phenotypic and genotypic tests for bacteria and mycobacteria. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2001; 15: 1205-1226. doi: 10.1016/s0891-5520(05)70191-4
- Lu, M., Chai, J., und Fu, D. (2009): Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YiiP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009; 16: 1063–1067. doi: 10.1038/nsmb.1662
- Luise, D., Lauridsen, C., Bosi, P., und Trevisi, P. (2019): Methodology and application of *Escherichia coli* F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs. *J Anim Sci Biotechnol.* 2019; 10: 53-53. doi: 10.1186/s40104-019-0352-7
- Luppi, A. (2017): Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Manag.* 2017; 3: 16-16. doi: 10.1186/s40813-017-0063-4
- Luppi, A., Gibellini, M., Gin, T., Vangroenweghe, F., Vandenbroucke, V., Bauerfeind, R., Bonilauri, P., Labarque, G., und Hidalgo, Á. (2016): Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic

- Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Manag.* 2016; 2: 20-20. doi: 10.1186/s40813-016-0039-9
- Maron, D.F., Smith, T.J.S., und Nachman, K.E. (2013): Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global Health.* 2013; 9: 48-48. doi: 10.1186/1744-8603-9-48
- Martinez, J.L. (2014): General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies.* 2014; 11: 33-39. doi: 10.1016/j.ddtec.2014.02.001
- Martinez, J.L., und Baquero, F. (2000): Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44: 1771-1777. doi: 10.1128/aac.44.7.1771-1777.2000
- McNally, A., Oren, Y., Kelly, D., Pascoe, B., Dunn, S., Sreecharan, T., Vehkala, M., Välimäki, N., Prentice, M.B., Ashour, A., Avram, O., Pupko, T., Dobrindt, U., Literak, I., Guenther, S., Schafler, K., Wieler, L.H., Zhiyong, Z., Sheppard, S.K., Mcinerney, J.O., und Corander, J. (2016): Combined Analysis of Variation in Core, Accessory and Regulatory Genome Regions Provides a Super-Resolution View into the Evolution of Bacterial Populations. *PLoS genetics.* 2016; 12: e1006280-e1006280. doi: 10.1371/journal.pgen.1006280
- Medardus, J.J., Molla, B.Z., Nicol, M., Morrow, W.M., Rajala-Schultz, P.J., Kazwala, R., und Gebreyes, W.A. (2014): In-feed use of heavy metal micronutrients in U.S. swine production systems and its role in persistence of multidrug-resistant salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80: 2317–2325. doi: 10.1128/aem.04283-13
- Medeiros, P., Bolick, D.T., Roche, J.K., Noronha, F., Pinheiro, C., Kolling, G.L., Lima, A., und Guerrant, R.L. (2013): The micronutrient zinc inhibits EAEC strain 042 adherence, biofilm formation, virulence gene expression, and epithelial cytokine responses benefiting the infected host. *Virulence.* 2013; 4: 624-633. doi: 10.4161/viru.26120
- Melkebeek, V., Goddeeris, B.M., und Cox, E. (2013): ETEC vaccination in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2013; 152: 37-42. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.024
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., Van Der Lelie, D., und Wattiez, R. (2003): *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003; 27: 385-410. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00045-7
- Mesonero-Escuredo, S., Strutzberg-Minder, K., Casanovas, C., und Segalés, J. (2018): Viral and bacterial investigations on the aetiology of recurrent pig neonatal diarrhoea cases in Spain. *Porcine Health Manag.* 2018; 4: 5-5. doi: 10.1186/s40813-018-0083-8
- Messori, S., Trevisi, P., Simongiovanni, A., Priori, D., und Bosi, P. (2013): Effect of susceptibility to enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 and of dietary tryptophan on gut microbiota diversity observed in healthy young pigs. *Vet. Microbiol.* 2013; 162: 173-179. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.09.001
- Mikhaylina, A., Ksibe, A.Z., Scanlan, D.J., und Blindauer, C.A. (2018): Bacterial zinc uptake regulator proteins and their regulons. *Biochem. Soc. Trans.* 2018: BST20170228. doi: 10.1042/bst20170228
- Monchy, S., Benotmane, M.A., Janssen, P., Vallaey, T., Taghavi, S., Van Der Lelie, D., und Mergeay, M. (2007): Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J. Bacteriol.* 2007; 189: 7417-7425. doi: 10.1128/JB.00375-07
- Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M., und Giannella, R.A. (1983): Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 1983; 41: 1340. doi: 10.1128/IAI.41.3.1340-1351.1983
- Morais, P.V., Branco, R., und Francisco, R. (2011): Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bv11 a strain highly resistant. *Biometals.* 2011; 24: 401-410. doi: 10.1007/s10534-011-9446-1
- Moredo, F.A., Pineyro, P.E., Marquez, G.C., Sanz, M., Colello, R., Etcheverria, A., Padola, N.L., Quiroga, M.A., Perfumo, C.J., Galli, L., und Leotta, G.A. (2015): Enterotoxigenic *Escherichia coli*

- Subclinical Infection in Pigs: Bacteriological and Genotypic Characterization and Antimicrobial Resistance Profiles. *Foodborne Pathog. Dis.* 2015; 12: 704–711. doi: 10.1089/fpd.2015.1959
- Moreira Martins, P.M., Gong, T., De Souza, A.A., und Wood, T.K. (2020): Copper Kills *Escherichia coli* Persister Cells. *Antibiotics* (Basel). 2020; 9. doi: 10.3390/antibiotics9080506
- Muniesa, M., Recktenwald, J., Bielaszewska, M., Karch, H., und Schmidt, H. (2000): Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect. Immun.* 2000; 68: 4850-4855. doi: 10.1128/iai.68.9.4850-4855.2000
- Murinda, S.E., Ebner, P.D., Nguyen, L.T., Mathew, A.G., und Oliver, S.P. (2005): Antimicrobial resistance and class 1 integrons in pathogenic *Escherichia coli* from dairy farms. *Foodborne Pathog. Dis.* 2005; 2: 348-352. doi: 10.1089/fpd.2005.2.348
- Na, G., Lu, Z., Gao, H., Zhang, L., Li, Q., Li, R., Yang, F., Huo, C., und Yao, Z. (2018): The effect of environmental factors and migration dynamics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in estuary environments. *Sci. Rep.* 2018; 8: 1663. doi: 10.1038/s41598-018-20077-x
- Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T., und Yamaguchi, A. (2002): The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J. Bacteriol.* 2002; 184: 4161-4167. doi: 10.1128/jb.184.15.4161-4167.2002
- Nagy, B., Casey, T.A., und Moon, H.W. (1990): Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 651-653. doi: 10.1128/JCM.28.4.651-653.1990
- Nagy, B., und Fekete, P.Z. (1999): Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 1999; 30: 259-284.
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., und Smith, D.F. (1974): Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.* 1974; 119: 736-747.
- Nguyen, C.C., Hugie, C.N., Kile, M.L., und Navab-Daneshmand, T. (2019): Association between heavy metals and antibiotic-resistant human pathogens in environmental reservoirs: A review. *Front. Environ. Sci. Eng.* 2019; 13: 46. doi: 10.1007/s11783-019-1129-0
- Nies, D., Mergeay, M., Friedrich, B., und Schlegel, H.G. (1987): Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* 1987; 169: 4865-4868. doi: 10.1128/jb.169.10.4865-4868.1987
- Nies, D.H. (2007): How Cells Control Zinc Homeostasis. *Science.* 2007; 317: 1695-1696. doi: 10.1126/science.1149048
- Nies, D.H., und Grass, G. (2009): Transition Metal Homeostasis. *EcoSal Plus.* 2009; 3. doi: 10.1128/ecosalplus.5.4.4.3
- Niewerth, U., Frey, A., Voss, T., Le Bouguéneq, C., Baljer, G., Franke, S., und Schmidt, M.A. (2001): The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8: 143-149. doi: 10.1128/CDLI.8.1.143-149.2001
- Nikaido, H. (2011): Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 2011; 77: 1-60. doi: 10.1002/9780470920541.ch1
- Nishino, K., und Yamaguchi, A. (2001): Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 5803-5812. doi: 10.1128/JB.183.20.5803-5812.2001
- Noulas, C., Tziouvalekas, M., und Karyotis, T. (2018): Zinc in soils, water and food crops. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2018; 49: 252-260. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.02.009
- O'brien, J., Wilson, I., Orton, T., und Pognan, F. (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 5421-5426. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
- Odermatt, A., und Solioz, M. (1995): Two trans-Acting Metalloregulatory Proteins Controlling Expression of the Copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 4349-4354. doi: 10.1074/jbc.270.9.4349

- Okusu, H., Ma, D., und Nikaido, H. (1996): AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 306–308.
- Olafson, R.W., Abel, K., und Sim, R.G. (1979): Prokaryotic metallothionein: Preliminary characterization of a blue-green alga heavy metal-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979; 89: 36-43. doi: 10.1016/0006-291X(79)90939-2
- Orskov, I., und Orskov, F. (1977): Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic *E. coli* strains from diarrhea in adults and children. Occurrence of the CF (colonization factor) antigen and of hemagglutinating abilities. *Med. Microbiol. Immunol.* 1977; 163: 99-110. doi: 10.1007/bf02121825
- Osek, J. (1999): Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet. Microbiol.* 1999; 68: 209-217. doi: 10.1016/s0378-1135(99)00109-1
- Outten, C.E., Halloran, und Thomas, V. (2001): Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis. *Science.* 2001; 292: 2488. doi: 10.1126/science.1060331
- Outten, C.E., Outten, F.W., und O'halloran, T.V. (1999): DNA Distortion Mechanism for Transcriptional Activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR Homologue in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 37517-37524. doi: 10.1074/jbc.274.53.37517
- Padilla-Benavides, T., George Thompson, A.M., Mcevoy, M.M., und Arguello, J.M. (2014): Mechanism of ATPase-mediated Cu⁺ export and delivery to periplasmic chaperones: the interaction of *Escherichia coli* CopA and CusF. *J. Biol. Chem.* 2014; 289: 20492-20501. doi: 10.1074/jbc.M114.577668
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., und Larsson, D.G.J. (2015): Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics.* 2015; 16: 964. doi: 10.1186/s12864-015-2153-5
- Patzer, S.I., und Hantke, K. (1998): The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1998; 28: 1199–1210. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00883.x
- Patzer, S.I., und Hantke, K. (2000): The Zinc-responsive Regulator Zur and Its Control of the *znu* Gene Cluster Encoding the ZnuABC Zinc Uptake System in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 24321-24332. doi: 10.1074/jbc.M001775200
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J.-L., und Köhler, T. (2004): CzcR-CzcS, a Two-component System Involved in Heavy Metal and Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 8761-8768. doi: 10.1074/jbc.M312080200
- Petersen, K.F., und Abu-Ghazaleh, R. (1960): Schnellmethode zur routinemäßigen Prüfung der biochemischen Leistungen von Enterobakterien. *Z. Hyg. Infektionskr.* 1960; 146: 510-521. doi: 10.1007/BF02156735
- Petit-Hartlein, I., Rome, K., De Rosny, E., Molton, F., Duboc, C., Gueguen, E., Rodrigue, A., und Coves, J. (2015): Biophysical and physiological characterization of ZraP from *Escherichia coli*, the periplasmic accessory protein of the atypical ZraSR two-component system. *Biochem. J.* 2015; 472: 205-216. doi: 10.1042/BJ20150827
- Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P., und Battistoni, A. (2010): The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *J. Bacteriol.* 2010; 192: 1553-1564. doi: 10.1128/JB.01310-09
- Pickard, J.M., Zeng, M.Y., Caruso, R., und Núñez, G. (2017): Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol. Rev.* 2017; 279: 70-89. doi: 10.1111/imr.12567
- Pontel, L.B., Scampoli, N.L., Porwollik, S., Checa, S.K., McClelland, M., und Soncini, F.C. (2014): Identification of a *Salmonella ancillary* copper detoxification mechanism by a comparative analysis of the genome-wide transcriptional response to copper and zinc excess. *Microbiology (Reading, England).* 2014; 160: 1659-1669. doi: 10.1099/mic.0.080473-0

- Poole, K. (2017): At the Nexus of Antibiotics and Metals: The Impact of Cu and Zn on Antibiotic Activity and Resistance. *Trends Microbiol.* 2017; 25: 820-832. doi: 10.1016/j.tim.2017.04.010
- Poolman, J.T., und Wacker, M. (2016): Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *The Journal of infectious diseases.* 2016; 213: 6-13. doi: 10.1093/infdis/jiv429
- Porcheron, G., Garenaux, A., Proulx, J., Sabri, M., und Dozois, C.M. (2013): Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic *Enterobacteria*: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3: 90. doi: 10.3389/fcimb.2013.00090
- Poulsen, H.D. (1995): Zinc Oxide for Weanling Piglets. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science.* 1995; 45: 159-167. doi: 10.1080/09064709509415847
- Pultz, N.J., Stiefel, U., Subramanyan, S., Helfand, M.S., und Donskey, C.J. (2005): Mechanisms by Which Anaerobic Microbiota Inhibit the Establishment in Mice of Intestinal Colonization by Vancomycin-Resistant *Enterococcus*. *J. Infect. Dis.* 2005; 191: 949-956. doi: 10.1086/428090
- Quan, S., Koldewey, P., Tapley, T., Kirsch, N., Ruane, K.M., Pfizenmaier, J., Shi, R., Hofmann, S., Foit, L., Ren, G., Jakob, U., Xu, Z., Cygler, M., und Bardwell, J.C.A. (2011): Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011; 18: 262. doi: 10.1038/nsmb.2016
- Reid, C.J., Wyrsh, E.R., Roy Chowdhury, P., Zingali, T., Liu, M., Darling, A.E., Chapman, T.A., und Djordjevic, S.P. (2017): Porcine commensal *Escherichia coli*: a reservoir for class 1 integrons associated with IS26. *Microbial Genomics.* 2017; 3: -. doi: 10.1099/mgen.0.000143
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., und Rosen, B.P. (2000): CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97: 652-656. doi: 10.1073/pnas.97.2.652
- Rensing, C., Mitra, B., und Rosen, B.P. (1997a): The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997a; 94: 14326-14331. doi: 10.1073/pnas.94.26.14326
- Rensing, C., Moodley, A., Cavaco, L.M., und Mcdevitt, S.F. (2018): Resistance to Metals Used in Agricultural Production. *Microbiol Spectr.* 2018; 6. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0025-2017
- Rensing, C., Pribyl, T., und Nies, D.H. (1997b): New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J. Bacteriol.* 1997b; 179: 6871-6879. doi: 10.1128/jb.179.22.6871-6879.1997
- Rhouma, M., Fairbrother, J.M., Beaudry, F., und Letellier, A. (2017a): Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet. Scand.* 2017a; 59: 31-31. doi: 10.1186/s13028-017-0299-7
- Rhouma, M., Fairbrother, J.M., Thériault, W., Beaudry, F., Bergeron, N., Laurent-Lewandowski, S., und Letellier, A. (2017b): The fecal presence of enterotoxin and F4 genes as an indicator of efficacy of treatment with colistin sulfate in pigs. *BMC Microbiol.* 2017b; 17: 6-6. doi: 10.1186/s12866-016-0915-0
- Rice, E.W., Wang, P., Smith, A.L., und Stadler, L.B. (2020): Determining Hosts of Antibiotic Resistance Genes: A Review of Methodological Advances. *Environmental Science & Technology Letters.* 2020; 7: 282-291. doi: 10.1021/acs.estlett.0c00202
- Robinson, J.B., und Tuovinen, O.H. (1984): Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiol. Rev.* 1984; 48: 95-124. doi: 10.1128/membr.48.2.95-124.1984
- Romeo, A., Vacchina, V., Legros, S., und Doelsch, E. (2014): Zinc fate in animal husbandry systems. *Metallomics.* 2014; 6: 1999-2009. doi: 10.1039/C4MT00062E
- Rouch, D.A., Lee, B.T.O., und Morby, A.P. (1995): Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J. Ind. Microbiol.* 1995; 14: 132-141. doi: 10.1007/BF01569895

- Salajka, E., Salajkova, Z., Alexa, P., und Hornich, M. (1992): Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhoea in pigs. *Vet. Microbiol.* 1992; 32: 163-175. doi: 10.1016/0378-1135(92)90103-Z
- Salajka, E., und Sarmanova, Z. (1971): An investigation into the role of colicines in the predominance of pathogenic *Escherichia coli* types in enteric *E. coli* infections in weanling pigs. *Acta Veterinaria Brno.* 1971; 40: 247-252.
- Samuels, A.N., Roggiani, M., Smith, K.A., Zhu, J., Goulian, M., und Kohli, R.M. (2020): Deciphering the Role of Colicins during Colonization of the Mammalian Gut by Commensal *E. coli*. *Microorganisms.* 2020; 8: 664. doi: 10.3390/microorganisms8050664
- Savarino, S.J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B.M., Levine, M.M., Guandalini, S., und Guerry, P. (1993): Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993; 90: 3093-3097. doi: 10.1073/pnas.90.7.3093
- Schamberger, G.P., und Diez-Gonzalez, F. (2002): Selection of recently isolated colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 2002; 65: 1381-1387. doi: 10.4315/0362-028x-65.9.1381
- Schamberger, G.P., und Diez-Gonzalez, F. (2004): Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 2004; 67: 486-492. doi: 10.4315/0362-028x-67.3.486
- Schwarz, S., Cloeckert, A., und Roberts, M.C. (2005). Mechanisms and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents In: *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin/ Hrsg.: F.M. Aarestrup, 73-98 -*
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., Van Duijkeren, E., Johnson, A.P., und Gaastra, W. (2010a): Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol.* 2010a; 141: 1-4. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.013
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., Van Duijkeren, E., Johnson, A.P., und Gaastra, W. (2010b): Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010b; 65: 601-604. doi: 10.1093/jac/dkq037
- Schwechheimer, C., und Kuehn, M.J. (2015): Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13: 605-619. doi: 10.1038/nrmicro3525
- Seiler, C., und Berendonk, T.U. (2012): Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 2012; 3: 399. doi: 10.3389/fmicb.2012.00399
- Shell, W.S., Sayed, M.L., Allah, F.M.G., Gamal, F.E.M., Khedr, A.A., Samy, A.A., und Ali, A.H.M. (2017): Matrix-assisted laser desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry as a reliable proteomic method for characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates. *Vet World.* 2017; 10: 1083-1093. doi: 10.14202/vetworld.2017.1083-1093
- Shi, J., Yu, X., Zhang, M., Lu, S., Wu, W., Wu, J., und Xu, J. (2011): Potential risks of copper, zinc, and cadmium pollution due to pig manure application in a soil-rice system under intensive farming: a case study of Nanhu, China. *J. Environ. Qual.* 2011; 40: 1695-1704. doi: 10.2134/jeq2010.0316
- Shin, R., Suzuki, M., und Morishita, Y. (2002): Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51: 201-206. doi: 10.1099/0022-1317-51-3-201
- Silver, S., und Phung, L.T. (2005): A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2005; 32: 587-605. doi: 10.1007/s10295-005-0019-6
- Slaveykova, V.I., Parthasarathy, N., Dedieu, K., und Toescher, D. (2010): Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Environmental Pollution.* 2010; 158: 2561-2565. doi: 10.1016/j.envpol.2010.05.016
- Smajs, D., Mícenková, L., Smarda, J., Vrba, M., Sevčíková, A., Vališová, Z., und Woznicová, V. (2010): Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a

- potential virulence factor. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 288-288. doi: 10.1186/1471-2180-10-288
- Smith, D.H. (1967): R factors mediate resistance to mercury, nickel, and cobalt. *Science.* 1967; 156: 1114-1116. doi: 10.1126/science.156.3778.1114
- Smith, M.G., Jordan, D., Chapman, T.A., Chin, J.J.C., Barton, M.D., Do, T.N., Fahy, V.A., Fairbrother, J.M., und Trott, D.J. (2010): Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 2010; 145: 299-307. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.04.004
- So, M., und Mccarthy, B.J. (1980): Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980; 77: 4011-4015. doi: 10.1073/pnas.77.7.4011
- Sousa, C., Cebolla, A., und De Lorenzo, V. (1996): Enhanced metalloadsorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nat. Biotechnol.* 1996; 14: 1017. doi: 10.1038/nbt0896-1017
- Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N., und Poole, K. (1998): Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42: 65-71. doi: 10.1128/AAC.42.1.65
- Srivastava, V., Sarkar, A., Singh, S., Singh, P., De Araujo, A.S.F., und Singh, R.P. (2017): Agroecological Responses of Heavy Metal Pollution with Special Emphasis on Soil Health and Plant Performances. *Front. Environ. Sci.* 2017; 5. doi: 10.3389/fenvs.2017.00064
- Stahl, C.H. (2005): Colicins as antibiotic alternatives for the treatment and prevention of post-weaning diarrhea and edema disease in swine. *Animal Industry Report.* 2005; 2. doi: 10.31274/ans_air-180814-1097
- Starke, I.C., Pieper, R., Neumann, K., Zentek, J., und Vahjen, W. (2014): The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2014; 87: 416-427. doi: 10.1111/1574-6941.12233
- Stecher, B., Denzler, R., Maier, L., Bernet, F., Sanders, M.J., Pickard, D.J., Barthel, M., Westendorf, A.M., Krogfelt, K.A., Walker, A.W., Ackermann, M., Dobrindt, U., Thomson, N.R., und Hardt, W.-D. (2012): Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109: 1269-1274. doi: 10.1073/pnas.1113246109
- Stecher, B., Maier, L., und Hardt, W.-D. (2013): 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11: 277-284. doi: 10.1038/nrmicro2989
- Stocks, C.J., Phan, M.-D., Achard, M.E.S., Nhu, N.T.K., Condon, N.D., Gawthorne, J.A., Lo, A.W., Peters, K.M., Mcewan, A.G., Kapetanovic, R., Schembri, M.A., und Sweet, M.J. (2019): Uropathogenic *Escherichia coli* employs both evasion and resistance to subvert innate immune-mediated zinc toxicity for dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019; 116: 6341-6350. doi: 10.1073/pnas.1820870116
- Suiryanrayna, M.V.a.N., und Ramana, J.V. (2015): A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *J Anim Sci Biotechnol.* 2015; 6: 45-45. doi: 10.1186/s40104-015-0042-z
- Sutherland, M.A., Backus, B.L., und Mcglone, J.J. (2014): Effects of Transport at Weaning on the Behavior, Physiology and Performance of Pigs. *Animals (Basel).* 2014; 4: 657-669. doi: 10.3390/ani4040657
- Sütterlin, S., Bray, J.E., Maiden, M.C.J., und Tano, E. (2020): Distribution of class 1 integrons in historic and contemporary collections of human pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2020; 15: e0233315-e0233315. doi: 10.1371/journal.pone.0233315
- Sütterlin, S., Téllez-Castillo, C.J., Anselem, L., Yin, H., Bray, J.E., und Maiden, M.C.J. (2018): Heavy Metal Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Urine Samples from Sweden, Germany, and Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62: e00209-00218. doi: 10.1128/AAC.00209-18
- Sweeney, N.J., Klemm, P., McCormick, B.A., Moller-Nielsen, E., Utley, M., Schembri, M.A., Laux, D.C., und Cohen, P.S. (1996): The *Escherichia coli* K-12 *gntP* gene allows *E. coli* F-18 to occupy a

- distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infect. Immun.* 1996; 64: 3497-3503. doi: 10.1128/IAI.64.9.3497-3503.1996
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., und Denamur, E. (2010): The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8: 207-217. doi: 10.1038/nrmicro2298
- Thomas Iv, J.C., Oladeinde, A., Kieran, T.J., Finger Jr., J.W., Bayona-Vásquez, N.J., Cartee, J.C., Beasley, J.C., Seaman, J.C., McArthur, J.V., Rhodes Jr., O.E., und Glenn, T.C. (2020): Co-occurrence of antibiotic, biocide, and heavy metal resistance genes in bacteria from metal and radionuclide contaminated soils at the Savannah River Site. *Microbial Biotechnology.* 2020; 13: 1179-1200. doi: 10.1111/1751-7915.13578
- Touchon, M., Perrin, A., De Sousa, J.a.M., Vangchhia, B., Burn, S., O'brien, C.L., Denamur, E., Gordon, D., und Rocha, E.P.C. (2020): Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLOS Genetics.* 2020; 16: e1008866. doi: 10.1371/journal.pgen.1008866
- Trcka, J., und Smarda, J. (2003): Is there any function for colicinogeny in the post-weaning diarrhoea of piglets? *Vet. Med. (Praha).* 2003; 48: 190-198. doi: 10.17221/5769-VETMED
- Tseng, M., Fratamico, P.M., Bagi, L., Delannoy, S., Fach, P., Manning, S.D., und Funk, J.A. (2014a): Diverse virulence gene content of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from finishing swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014a; 80: 6395-6402. doi: 10.1128/AEM.01761-14
- Tseng, M., Fratamico, P.M., Manning, S.D., und Funk, J.A. (2014b): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine: the public health perspective. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases.* 2014b; 15: 63-75. doi: 10.1017/S1466252313000170
- Tsiloyiannis, V.K., Kyriakis, S.C., Vlemmas, J., und Sarris, K. (2001): The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Res. Vet. Sci.* 2001; 70: 287-293. doi: 10.1053/rvsc.2001.0476
- Us Food and Drug Administration (2013). "New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food-Producing Animals: Recommendations for Drug Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI #209".
- Vahjen, W., Pieper, R., und Zentek, J. (2011): Increased dietary zinc oxide changes the bacterial core and enterobacterial composition in the ileum of piglets. *J. Anim. Sci.* 2011; 89: 2430–2439. doi: 10.2527/jas.2010-3270
- Vahjen, W., Pietruszynska, D., Starke, I.C., und Zentek, J. (2015): High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. *Gut Pathog.* 2015; 7: 23. doi: 10.1186/s13099-015-0071-3
- Vallee, B.L., und Auld, D.S. (1990): Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry.* 1990; 29: 5647–5659. doi: 10.1021/bi00476a001
- Vallee, B.L., und Falchuk, K.H. (1993): The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 1993; 73: 79-118. doi: 10.1152/physrev.1993.73.1.79
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., und Laxminarayan, R. (2015): Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015; 112: 5649. doi: 10.1073/pnas.1503141112
- Van Der Weel, L., As, K.S., Dekker, W.J.C., Van Den Eijnden, L., Van Helmond, W., Schiphorst, C., Hagen, W.R., und Hagedoorn, P.-L. (2019): ZraP, the most prominent zinc protein under zinc stress conditions has no direct role in in-vivo zinc tolerance in *Escherichia coli*. *J. Inorg. Biochem.* 2019; 192: 98-106. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.12.013
- Vanderwaal, K., und Deen, J. (2018): Global trends in infectious diseases of swine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018; 115: 11495. doi: 10.1073/pnas.1806068115
- Ventola, C.L. (2015): The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015; 40: 277-283.
- Vetcast *Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (VetCAST)* [Online]. Abgerufen am: 05.02.2021 um 18.15 Uhr, von https://www.eucast.org/ast_of_veterinary_pathogens/

- Vidhyaparkavi, A., Osborne, J., und Babu, S. (2017): Analysis of *zntA* gene in environmental *Escherichia coli* and additional implications on its role in zinc translocation. 3 Biotech. 2017; 7: 9-9. doi: 10.1007/s13205-017-0613-0
- Vidotto, M.C., Florian, E.C., und Ono, M.A. (2013): Prevalence of the *paa* gene (porcine attaching and effacing associated) in porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (PEPEC) associated with postweaning diarrhea in south Brazil. Braz. J. Microbiol. 2013; 44: 515-517. doi: 10.1590/s1517-83822013000200030
- Vieira, G., Sabarly, V., Bourguignon, P.-Y., Durot, M., Le Fèvre, F., Mornico, D., Vallenet, D., Bouvet, O., Denamur, E., Schachter, V., und Médigue, C. (2011): Core and Panmetabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2011; 193: 1461. doi: 10.1128/JB.01192-10
- Vogwill, T., und Maclean, R.C. (2015): The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. Evol Appl. 2015; 8: 284-295. doi: 10.1111/eva.12202
- Vu-Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Mora, A., López, C., González, E.A., und Blanco, J. (2007): Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. Vet. J. 2007; 174: 176-187. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.05.019
- Waldron, K.J., Rutherford, J.C., Ford, D., und Robinson, N.J. (2009): Metalloproteins and metal sensing. Nature. 2009; 460: 823. doi: 10.1038/nature08300
- Walk, C.L., Wilcock, P., und Magowan, E. (2015): Evaluation of the effects of pharmacological zinc oxide and phosphorus source on weaned piglet growth performance, plasma minerals and mineral digestibility. Animal. 2015; 9: 1145-1152. doi: 10.1017/S175173111500035X
- Wallmann, J., Kaspar, H., und Potschka, H. (2014). 46 Klinische Grenzwerte für die Klassifizierung von MHK-Werten unter Berücksichtigung der Bakterienspezies, Indikation und Tierart. In: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren/Hrsg: Löscher W., Richter A., Potschka H.; 9. Auflage, S. 716-718. Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme Verlagsgruppe - ISBN 978-3-8304-1251-9
- Wang, D., und Fierke, C.A. (2013): The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. Metallomics. 2013; 5: 372-383. doi: 10.1039/c3mt20217h
- Wang, D., Hosteen, O., und Fierke, C.A. (2012): ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. J. Inorg. Biochem. 2012; 111: 173-181. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.02.008
- Wang, Q., Han, Y., Shi, K., Fan, X., Wang, L., Li, M., und Wang, G. (2017): An Oxidoreductase AioE is Responsible for Bacterial Arsenite Oxidation and Resistance. Sci. Rep. 2017; 7: 41536. doi: 10.1038/srep41536
- Wang, T., Yang, X., Gao, F., Zhao, C., Kang, Y., Wang, Y., und Shen, X. (2016): Zinc acquisition via ZnuABC in *Yersinia pseudotuberculosis* facilitates resistance to oxidative stress. Ann. Microbiol. 2016; 66: 1189-1197. doi: 10.1007/s13213-016-1205-7
- Wang, Y.Z., Xu, Z.R., Lin, W.X., Huang, H.Q., und Wang, Z.Q. (2004): Developmental Gene Expression of Antimicrobial Peptide PR-39 and Effect of Zinc Oxide on Gene Regulation of PR-39 in Piglets. Asian-Australas J Anim Sci. 2004; 17: 1635-1640. doi: 10.5713/ajas.2004.1635
- Warner, D.M., und Levy, S.B. (2012): SoxS increases the expression of the zinc uptake system ZnuACB in an *Escherichia coli* murine pyelonephritis model. J. Bacteriol. 2012; 194: 1177-1185. doi: 10.1128/jb.05451-11
- Watly, J., Potocki, S., und Rowinska-Zyrek, M. (2016): Zinc Homeostasis at the Bacteria/Host Interface-From Coordination Chemistry to Nutritional Immunity. Chemistry. 2016. doi: 10.1002/chem.201602376
- Webster, R.E. (1991): The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 1991; 5: 1005-1011. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb01873.x
- Wei, Y., und Fu, D. (2005): Selective Metal Binding to a Membrane-embedded Aspartate in the *Escherichia coli* Metal Transporter YiiP (FieF). J. Biol. Chem. 2005; 280: 33716-33724. doi: 10.1074/jbc.M506107200

- Wei, Y., und Fu, D. (2006): Binding and transport of metal ions at the dimer interface of the *Escherichia coli* metal transporter YiiP. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281: 23492–23502. doi: 10.1074/jbc.M602254200
- Weiner, M., Dacko, J., und Osek, J. (2004): Molecular analysis of enterotoxigenic, shigatoxigenic and enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from suckling piglets with diarrhoea by the use of pulsed-field electrophoresis. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2004; 48: 225-231.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., und Achtman, M. (2006): Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 2006; 60: 1136-1151. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- Wisener, L.V., Sargeant, J.M., O'connor, A.M., Faires, M.C., und Glass-Kaastra, S.K. (2015): The use of direct-fed microbials to reduce shedding of *Escherichia coli* O157 in beef cattle: a systematic review and meta-analysis. *Zoonoses Public Health*. 2015; 62: 75-89. doi: 10.1111/zph.12112
- World Organisation for Animal Health (2019): Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals - better understanding of the global situation. 2019; 3. Bericht.
- Xu, Z., Wang, P., Wang, H., Yu, Z.H., Au-Yeung, H.Y., Hirayama, T., Sun, H., und Yan, A. (2019): Zinc excess increases cellular demand for iron and decreases tolerance to copper in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2019. doi: 10.1074/jbc.RA119.010023
- Yamamoto, K., und Ishihama, A. (2005): Transcriptional response of *Escherichia coli* to external zinc. *Journal of Bacteriology*. 2005; 187: 6333-6340. doi: 10.1128/jb.187.18.6333-6340.2005
- Yang, S., Deng, W., Liu, S., Yu, X., Mustafa, G.R., Chen, S., He, L., Ao, X., Yang, Y., Zhou, K., Li, B., Han, X., Xu, X., und Zou, L. (2020): Presence of heavy metal resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates and analysis of resistance gene structure in *E. coli* E308. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020; 21: 420-426. doi: 10.1016/j.jgar.2020.01.009
- Yazdankhah, S., Rudi, K., und Bernhoft, A. (2014): Zinc and copper in animal feed - development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2014; 25. doi: 10.3402/mehd.v25.25862
- Yu, Z., Gunn, L., Wall, P., und Fanning, S. (2017): Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food Microbiol.* 2017; 64: 23-32. doi: 10.1016/j.fm.2016.12.009
- Zajacova, Z.S., Faldyna, M., Kulich, P., Kummer, V., Maskova, J., und Alexa, P. (2013): Experimental infection of gnotobiotic piglets with *Escherichia coli* strains positive for EAST1 and AIDA. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2013; 152: 176-182. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.011
- Zajacova, Z.S., Konstantinova, L., und Alexa, P. (2012): Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in *astA* positive strains. *Vet. Microbiol.* 2012; 154: 369-375. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.07.029
- Zhang, W., Berberov, E.M., Freeling, J., He, D., Moxley, R.A., und Francis, D.H. (2006): Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. *Infect. Immun.* 2006; 74: 3107-3114. doi: 10.1128/IAI.01338-05
- Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A., und Francis, D. (2007): Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet. Microbiol.* 2007; 123: 145-152. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.02.018
- Zhao, Z., Orfe, L.H., Liu, J., Lu, S.-Y., Besser, T.E., und Call, D.R. (2017): Microcin PDI regulation and proteolytic cleavage are unique among known microcins. *Sci. Rep.* 2017; 7: 42529. doi: 10.1038/srep42529
- Zhou, Y., Xu, Y.-B., Xu, J.-X., Zhang, X.-H., Xu, S.-H., und Du, Q.-P. (2015): Combined toxic effects of heavy metals and antibiotics on a *Pseudomonas fluorescens* strain ZY2 isolated from swine wastewater. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 2839–2850. doi: 10.3390/ijms16022839
- Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Desautels, C., Donnenberg, M.S., Beaudry, M., und Fairbrother, J.M. (1994): Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect. Immun.* 1994; 62: 4153-4159. doi: 10.1128/iai.62.10.4153-4159.1994

8. Anhang

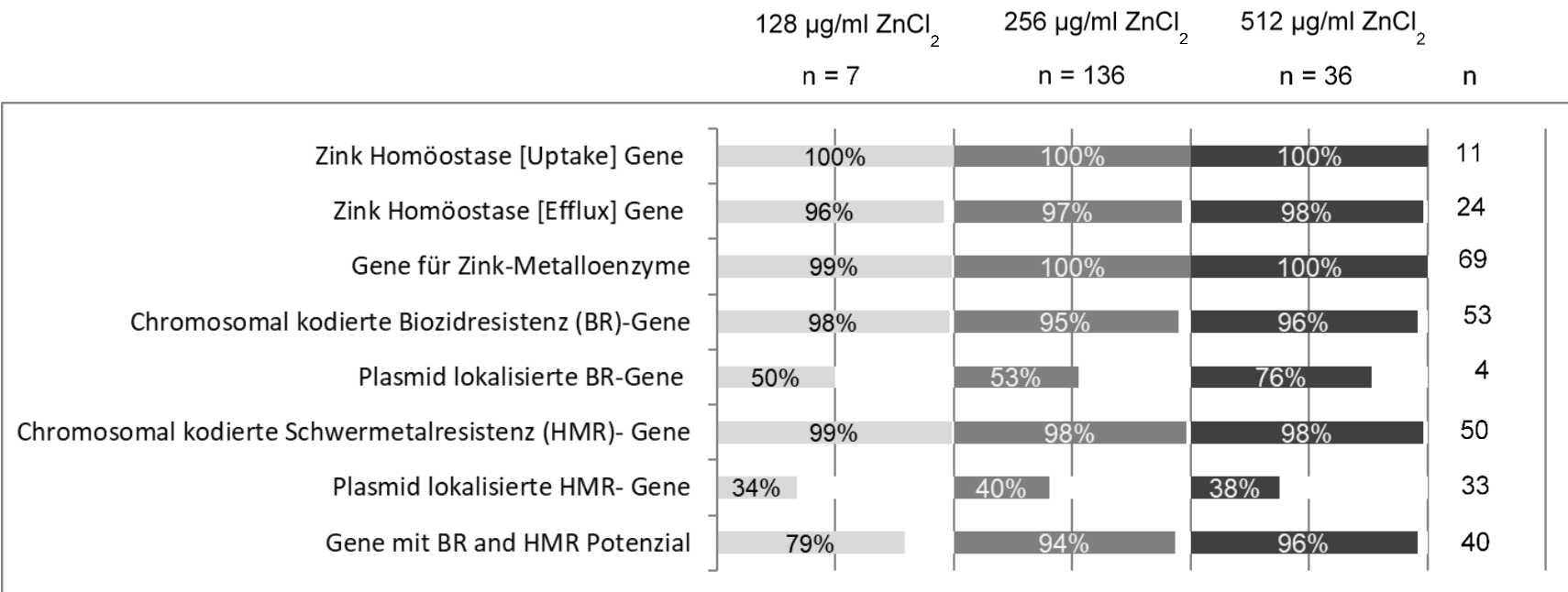
8.1. Tabelle A | Diagnostische Marker von porzinen pathogenen *E. coli*

Patho- typ	Diagnostische Marker				Weitere Virulenzfaktoren				Klinik	Referenzen
	Protein	Gen	Marker	Lokalisation	Adhäsion	Lokalisation	Toxin	Lokalisation		
ETEC	STa	<i>estA</i>	Hitzestabile Enterotoxine	P, T	<i>faeG</i> (F4)	P	<i>astA</i> (EAST1)	P	PWD	Luppi et al. 2016; Moredo et al. 2015; Zajacova et al. 2012; Chapman et al. 2006; Dubreuil 1997
	STb	<i>estB</i>		P	<i>fanC</i> (F5)	P				
	LT-I	<i>eltA</i>	Hitzelabile Enterotoxine	P	<i>fasA</i> (F6)	P, C				
	LT-II	<i>eltB</i>		P	<i>fedA</i> (F18) <i>f41</i> (F41) <i>aida</i> (AIDA-I)	P C P				
EPEC	Eae	<i>eae</i>	Intimin	PAI	<i>paa</i> (porcine EAE- associated factor)	P	<i>ehxA</i> (EhxA)	P	PWD	Vidotto et al. 2013; Chapman et al. 2006
EHEC	Eae	<i>eae</i>	Intimin	PAI	<i>paa</i> (porcine EAE- associated factor)	P	<i>ehxA</i> (EhxA)	P		Tseng et al. 2014a; Chapman et al. 2006
STEC	STx	<i>stx1</i> <i>stx2</i>	Shigatoxin	Ph Ph	<i>eae</i>	PAI	<i>aida</i> (AIDA)	C	D, ED	Tseng et al. 2014a; Barth et al. 2011; Chapman et al. 2006; Niewerth et al. 2001
	STx2e	<i>stx2e</i>	Shigatoxin 2e	Ph	<i>f18ab</i> (F18ab)	P				
EAEC	AAF	<i>aaf</i>	Aggregative Adhärenz-Fimbrien	P	<i>pic</i> (Pic)	C	<i>astA</i> (EAST1)	P		Harrington et al. 2009; Chapman et al. 2006; Weiner et al. 2004
					<i>aggR</i> (AggR)	C, P	<i>setAB</i> (ShET-1)	PAI		
DAEC	AFA	<i>afa</i>	afimbriales Adhäsion	C, P	<i>aah</i> (AAH)	C			UTI, D	Chapman et al. 2006
	AIDA	<i>aida</i>	Adhäsion involviert in diffuser Adhärenz	C						

Abkürzungen

ETEC: enterotoxische *E. coli*; EPEC: enteropathogene *E. coli*; EHEC: enterohämorrhagische *E. coli*; STEC: Shigatoxin produzierende *E. coli*; EAEC: enteroaggregative *E. coli*; DAEC: diffuse adhärenz *E. coli*; VAGs: Virulenz-assoziierte Gene; P: Plasmid; C: Chromosom; Ph: Phage; PAI: Pathogenitätsinsel; T: Transposon; PWD: Post-weaning Diarrhea; HUS: hämolytisch urämisches Syndrom; D: Diarrhö; ED: Edema Disease; UTI: Urogenitaltraktinfektion

8.2. Tabelle B | Prozentuale Verteilung der Zinkhomöostase- und Schwermetall- bzw. Biozidresistenzgene in der *E. coli*-Studiensammlung



In annähernd allen 179 *E. coli* Genomen wurden Gene der Zinkhomöostase und Gene, die für Zinkmetalloenzyme codieren, gefunden. Schwermetall- und Biozidresistenzgene, die auf Plasmiden lokalisiert sind, scheinen eine signifikante Assoziation zu den Isolaten der Zinkfütterungsgruppe zu haben ($p \leq 0,005$).

9. Publikationsverzeichnis

VERÖFFENTLICHUNGEN

2020

(2020a): **V.C. Johanns**, L. Epping, T. Semmler, F. Ghazisaeedi, A. Lübke-Becker, Y. Pfeifer, I. Eichhorn, R. Merle, A. Bethe, B. Walther, L.H. Wieler. High-zinc supplementation of weaned piglets affects frequencies of virulence and bacteriocin associated genes among intestinal *Escherichia coli* populations. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020. Dec 16; 7:614513. doi: 10.3389/fvets.2020.614513

(2020b): F. Ghazisaeedi, L. Ciesinski, C. Bednorz, **V. Johanns**, L. Pieper, K. Tedin, L.H. Wieler, S. Günther. Phenotypic zinc resistance does not correlate with antimicrobial multi-resistance in fecal *E. coli* isolates of piglets. *Gut pathogens*, 2020. 12(4).

2019

(2019a): **V.C. Johanns**, F. Ghazisaeedi, L. Epping, T. Semmler, A. Lübke-Becker, Y. Pfeiffer, A. Bethe, I. Eichhorn, R. Merle, B. Walther, L.H. Wieler. Effects of a Four-Week High-Dosage Zinc Oxide Supplemented Diet on Commensal *Escherichia coli* of Weaned Pigs. *Frontiers in Microbiology*, 2019. Nov 28; 10(2734). doi: 10.3389/fmicb.2019.02734

VORTRÄGE

2019

(2019a): **V.C. Johanns**, F. Ghazisaeedi, L. Epping, T. Semmler, B. Walther, L.H. Wieler. High zinc oxide diets: effects on porcine intestinal *Escherichia coli* populations. 38. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe "AVID", Bad Staffelstein, 11.09.-13.09.2019

(2019b): **V.C. Johanns**, F. Ghazisaeedi, L. Epping, T. Semmler, B. Walther, L.H. Wieler. Different levels of zinc tolerance among porcine *Escherichia coli*. Junior Scientist Zoonoses Meeting, Berlin, 20.06.-22.06.2019

2018

(2018a): **V.C. Johanns**, T. Semmler, L. Epping, B. Walther, L.H. Wieler. High zinc oxide diets: effects on porcine intestinal *Escherichia coli* populations. National Symposium on Zoonoses Research 2018, Berlin, 17.10.-19.10.2018

(2018b): **V.C. Johanns**, T. Semmler, B. Walther, L.H. Wieler. Modulatory effects of high zinc oxide diets on porcine intestinal *Escherichia coli* populations. Junior Scientist Zoonoses Meeting, Hamburg, 07.06.-09.06.2018

(2018c): **V.C. Johanns**, T. Semmler, B. Walther, L.H. Wieler. Effects of high zinc oxide diets in porcine intestinal *Escherichia coli* populations. Tagung der Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, Hannover, 30.05.-01.06.2018

POSTER

2019

(2019a): **V.C. Johanns**, F. Ghazisaeedi, L. Epping, T. Semmler, B. Walther, L.H. Wieler. Four-week high zinc oxide diets: effects on commensal intestinal *Escherichia coli*-populations of weaned piglets. National Symposium on Zoonoses Research 2019, Berlin, 16.10.-18.10.2019

(2019b): **V.C. Johanns**, F. Ghazisaeedi, L. Epping, T. Semmler, B. Walther, L.H. Wieler. Different levels of zinc tolerance among porcine *Escherichia coli*. Junior Scientist Zoonoses Meeting, Berlin, 20.06.-22.06.2019

2018

(2018a): **V.C. Johanns**, T. Semmler, L. Epping, B. Walther, L.H. Wieler. High zinc oxide diets: unravelling effects on porcine intestinal *Escherichia coli* populations. Diplomanden- und Doktoranden-Meeting, Robert Koch-Institut, Berlin, 21.11.2018

(2018b): **V.C. Johanns**, T. Semmler, B. Walther, L.H. Wieler. Modulatory effects of high zinc oxide diets on porcine intestinal *Escherichia coli* populations. Junior Scientist Zoonoses Meeting, Hamburg, 07.06.-09.06.2018

2017

(2017a): **V.C. Johanns**, T. Semmler, B. Walther, L.H. Wieler. Tracking the effects of high-Zinc oxide diets in porcine intestinal *E. coli* populations. National Symposium on Zoonoses Research 2017, Berlin, 12.10.-13.10.2017

(2017b): **V.C. Johanns**, T. Semmler, B. Walther, L.H. Wieler. Apprehending the effects of high-Zinc oxide diets on porcine intestinal *E. coli* populations. 10. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Sciences“, Berlin, 22.09.2017

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen und beteiligten Personen danken, die mich bei der Bearbeitung meines Promotionsvorhabens und der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. L.H. Wieler für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas und für die Chance am Robert Koch-Institut gearbeitet zu haben. Trotz vieler neuer Aufgaben am Robert Koch-Institut haben Sie, Herr Prof. Wieler, stets immer eine hilfreiche Empfehlung gehabt.

Besonders danken möchte ich Dr. Birgit Walther für die hervorragende Betreuung. Trotz Anfangsschwierigkeiten eines Folgeprojektes und einer für dich „neuen“ Gram-negativen Spezies hast du deine Energie investiert um aus mir und dem Projektthema alles herauszuschöpfen. Vielen Dank für die vorantreibenden Diskussionen, das kritische Lesen vieler Texte und die tolle Arbeit mit dir.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Antina Lübke-Becker für Ihr immer offenes Ohr und Ihre hilfreichen Vorschläge während meiner Promotion bedanken. Ebenso geht der Dank an Dr. Astrid Bethe für die beginnende Betreuung meines Promotionsvorhabens sowie Ihre stetige Hilfe. Ebenfalls geht ein großes Dankeschön an Dr. Karsten Tedin und Fereshteh Ghazisaeedi für Ihre Tipps und guten Ratschläge. Außerdem möchte ich mich für den herzlichen und guten Start meines Promotionsvorhabens am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen am FB Veterinärmedizin an der FU Berlin bei allen ehemaligen Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern bedanken, insbesondere bei dir, Dr. Inga Eichhorn, sowie bei allen Labor-Assistenten, hier geht ein besonderes Dankeschön an Petra Krienke.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Michael Laue für die gute Aufnahme in die Arbeitsgruppe ZBS4 am Robert Koch-Institut. Ebenfalls spreche ich meinen Dank Dr. Christoph Schaudinn (ZBS4) aus, der immer außergewöhnliche gute Ideen präsent hatte und diese auch jederzeit in die Tat umgesetzt hat. Vielen Dank an alle Kollegen aus ZBS4 für den regen Austausch zwischendurch sowie in jeder Mittagspause. Besonders möchte ich euch, Charlotte Huber, Anne Kauter und Dr. Julia Assmann, für die gemeinsame wunderbare, abwechslungsreiche und sehr intensive Zeit als Doktorandin danken.

Darüber hinaus möchte ich dem bioinformatischen Team um Dr. Torsten Semmler aus NG1 „Mikrobielle Genomik“ am Robert Koch-Institut recht herzlich danken. Ein ganz besonderer Dank geht auch hier an Lennard Epping. Dieses Team stand mir unentwegt zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite.

DANKSAGUNG

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

Meiner Familie danke ich für eure Geduld, ständige Ermutigung, guten Zusprüche und die regelmäßigen, sehr wichtigen, „Hilfs“-Pakete per Post.

Ein weiterer großer Dank geht an Stefanie Lüth für die vielen wichtigen hilfreichen Gespräche, die sportlichen Ablenkungsmanöver und deine Freundschaft.

Michael Tarnowski, danke für dein immer offenes Ohr und deine ruhige Art und Weise. Danke, dass du mir stets den Rücken freigehalten und mich in jedem Moment zum Lachen gebracht hast und dass du immer versucht hast, mich und mein Thema zu verstehen.

11. Finanzierungsquelle

Die Arbeiten wurden finanziell durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

Finanzierungsnummer WI 1436/12-1.

12. Conflict of Interest

Ich erkläre, dass die vorliegende Arbeit und die daraus entstandenen Publikationen in Abwesenheit jeglicher kommerziellen oder finanziellen Beziehungen, die als potentieller Interessenkonflikt ausgelegt werden könnten, ausgeführt worden sind.

13. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Der Einfluss von Zink als Futterzusatzstoff auf die porzine intestinale *Escherichia coli*-Population beim Ferkel“ selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe und die den verwendeten Quellen und Hilfsmitteln wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Berlin, 22.12.2021

Vanessa Catharina Johans