

# Mikrobiologische Charakterisierung von anthropogen beeinflussten Wassersystemen und Evaluierung von Abwasserbehandlungsverfahren

---

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktor der Ingenieurwissenschaften (Dr. –Ing.)**

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)  
genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl. Biol. Johannes Alexander  
aus Sondershausen

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Harald Horn

Korreferent 1: Prof. Dr. rer. nat. Johannes Gescher

Korreferent 2: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Schwartz

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2017

## **Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. Harald Horn vom Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie und Wassertechnologie für das Übernehmen des Erstgutachtens.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Johannes Gescher vom Institut für Angewandte Biowissenschaften für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich möchte speziell Prof. Dr. Thomas Schwartz für seine Geduld, seine hilfreichen Ratschläge und Diskussionensimpulse danken, sowie für sein motiviertes Engagement im Hinblick auf die Betreuung meiner Arbeit.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für die freundliche Atmosphäre. Mein besonderer Dank geht an Thomas Jäger für seine tatkräftige Unterstützung sowie Dr. Andreas Dötsch, Boris Kühl, Mareike Marten und Silke Kirchen für ihre Ratschläge und Anregungen.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und dem Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) am KIT Campus Nord.

Meiner Familie danke ich herzlich für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

## Zusammenfassung

Die Charakterisierung von Belastungssituationen unterschiedlicher aquatischer Bereiche und technischer Prozesse mit klinisch relevanten Bakterien und Antibiotikaresistenzen ist Gegenstand dieser Arbeit und soll dazu dienen, mikrobielle Hot Spots zu identifizieren und Ansätze zur Unterbrechung von Verbreitungswegen zu untersuchen. Als Untersuchungsgebiet wurde das Donauried ausgewählt, dessen anthropogen beeinflusste Wassersysteme verschiedene Wasserschutzzonen passieren oder sich in der Nähe von Trinkwasserfassungen befinden. Neben Fließgewässern mit direktem oder indirektem Abwassereinfluss, Regenüberlaufbecken und Grundwassermessstellen wurden auch Klinikabwässer und Kläranlagen unterschiedlicher Größe und Ausstattung untersucht. Die mikrobiologische Charakterisierung dieser Wassersysteme erfolgte durch eine Auswahl von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen und opportunistischen Bakterien-Parametern. Zur deren Detektion und Quantifizierung wurden qPCR-Systeme entwickelt und Primer-Kombinationen für das *vanA* (Vancomycin) Resistenzgen, *blaVIM* (Imipenem) Resistenzgen, *ampC* (Ampicillin) Resistenzgen und *ermB* (Erythromycin) Resistenzgen verwendet. Als Parameter für die kritischen mikrobiologische Zielorganismen wurden genetische Marker für Enterokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Koagulase negative Staphylokokken (CNS) genutzt.

In ungeklärten Krankenhausabwässern sowie in den entsprechenden Kläranlagenzuläufen wurden die höchsten Abundanzen an Antibiotikaresistenzen und opportunistischen Bakterien aller untersuchten Wassersysteme quantifiziert. In den Abläufen der jeweiligen Kläranlage wurden teilweise Reduktionen von 99% für einige, aber nicht alle, untersuchten opportunistischen Bakterien festgestellt. Im Gegensatz zu den taxonomischen Genmarkern wiesen die meisten der Antibiotikaresistenzgene einen gegenteiligen Trend auf. Einige Gene wurden demnach deutlich häufiger in der Bakterienpopulation des Kläranlagenablaufs nachgewiesen im Vergleich zum Zulauf. Der Einfluss dieser Emission von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen wurde auch in den aufnehmenden Vorflutern deutlich. Selbst einige Grundwässer, auch ohne die Anwesenheit der ursprünglichen Resistenzträger, wiesen Abundanzen aller vier Antibiotikaresistenzgene auf. Diese Diskrepanz zwischen taxonomischen Markern und Resistenzdeterminanten weist auf eine unterschiedliche Dynamik dieser Parametergruppen hin und unterstreicht die Wichtigkeit einer erweiterten mikrobiologischen Charakterisierung von anthropogen beeinflussten Habitaten.

Mit dem Hinblick auf die mikrobiologischen Ergebnisse aus der Modellregion Donauried zum Eintrag von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien durch Kläranlagen, wurde an der kommunalen Kläranlage Südhessen ein Ozonsystem in Kombination mit vier Filtersystemen (belüftete granulierter Aktivkohle, unbelüftete granulierter Aktivkohle, belüfteter Biofilter und unbelüfteter Biofilter) auf die Reduktion der mikrobiologischen Belastungen hin untersucht. Ozondosen von  $0,85 \pm 0,15$  g Ozon pro g gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) wurden verwendet, um den Ablauf einer konventionellen Kläranlage zu behandeln. Dabei wurde neben der mikrobiellen Reduktion auch eine Selektion von spezifischen Antibiotika-resistenten Bakterien, sowie dem Bakterium *P. aeruginosa* festgestellt. Die vier nachfolgenden parallel installierten Filtersysteme bildeten den Abschluss dieser Abwasserbehandlung und zeigten neben hohen Schwankungen in den Abundanzen der untersuchten Antibiotikaresistenzgene und taxonomischen Markern im jeweiligen Ablauf keine signifikante Reduktion an.

Um das Phänomen der Selektion der untersuchten Antibiotikaresistenzgene weiter zu untersuchen, wurde am Großklärwerk Ulm-Steinhäule eine Pilotanlage mit einer Verfahrenskombination aus Ozon- und nachfolgender UV-Behandlung installiert. Dabei wurde ebenfalls der Einfluss verschiedener Ozondosen (0,7, 1,0 und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC) berücksichtigt. Durch die nachfolgende UV-Behandlung (100 – 300 J pro m<sup>2</sup>) und Erhöhung der Ozondosis wurde eine zusätzliche Reduktion von *P. aeruginosa*, Enterokokken sowie von Imipenem-resistenten Bakterien (*blaVIM*) erreicht.

Neben dem Nachweis von Antibiotikaresistenzen und opportunistischen Bakterien wurde über PCR, Illumina 16S Amplicon-Sequenzierung und PCR-DGGE Analysen die Selektion von ozonrobusten Bakterien bestätigt, so dass der Anteil dieser hygienisch relevanten Parameter in der überlebenden Bakterienpopulation durch die Ozonbehandlung nicht verringert, sondern erhöht wurde (Anreicherung); trotz einer allgemeinen Reduktion der Bakterienfracht von ca. 96%.

Um die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und opportunistisch pathogenen Bakterien durch Kläranlagen zu verringern, sind weiterführende Abwasserbehandlungsmaßnahmen notwendig, damit die Wasserressourcen im Donauried besser geschützt werden können. Eine Ozonbehandlung von konventionell gereinigtem Abwasser stellt ein Mittel zur Reduktion hygienisch wichtiger mikrobiologischer Parameter dar. Dennoch war die Anreicherung einiger Antibiotikaresistenzgene und Bakterien durch die Ozonbehandlung nur teilweise mit einer höheren Ozondosis in Kombination mit UV zu verhindern. Die Verknüpfung aus Ozonung und UV-Behandlung führt zu einer weiteren Verbesserung der Abwasserqualität, eliminiert das

bestehende Restrisiko der Verbreitung von hygienisch relevanten mikrobiologischen Parametern jedoch nicht vollständig.

## Abstract

The dissemination of medically relevant antibiotic resistance genes (*bla*VIM, *vanA*, *ampC*, *ermB*, and *mecA*) and opportunistic bacteria (*E. faecium/faecalis*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, and CNS) was determined in different anthropogenically influenced aquatic habitats in a selected region of Germany (Donauried). Over a period of two years, four differently sized wastewater treatment plants (WWTP) with and without clinical influence, three surface waters, four rain overflow basins, and three groundwater sites were analyzed by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). Results were calculated in cell equivalents per 100 ng of total DNA extracted from water samples biomass, firstly, and, secondly, per 100 mL sample volume, which seems to underestimate the abundance of antibiotic resistance and opportunistic bacteria. High abundances of opportunistic bacteria and antibiotic resistance genes (ARGs) were quantified in clinical wastewaters and influents of the adjacent WWTP. The removal capacities of WWTP were up to 99% for some, but not all investigated bacteria. The abundances of most ARG targets were found to be increased in the bacterial population after conventional wastewater treatment. As a consequence, downstream surface water and also some groundwater compartments displayed high abundances of all four ARGs. It became obvious that the dynamics of the ARG differed from the dynamics of the opportunistic bacteria.

An ozone treatment system was installed at the municipal WWTP Südhessen and was investigated to analyze its impact on clinically relevant bacteria and antibiotic resistant genes. A dosage of  $0.85 \pm 0.15$  g ozone per 1 g DOC was used to treat conventional clarified wastewater. PCR, qPCR analyses, Illumina 16S Amplicon Sequencing, and PCR-DGGE indicated a diverse pattern of robustness and susceptibilities of opportunistic bacteria and accumulation of some ARGs after ozone treatment. Molecular marker genes for enterococci indicated a high susceptibility towards ozone and were reduced by almost 99%, but were still present in the bacterial population after ozone treatment. In contrast, *Pseudomonas aeruginosa* displayed only minor changes in abundance after ozone treatment. The investigated ARGs demonstrated an even more diverse pattern. After ozone treatment, the erythromycin resistance gene (*ermB*) was reduced by 2 orders of magnitude, but simultaneously, the abundance of two other clinically relevant ARGs increased within the surviving wastewater population (*vanA*, *bla*VIM). PCR-DGGE analysis and 16S-Amplicon-Sequencing confirmed a selection-like process in combination with substantial diversity loss within the vital wastewater population after ozone treatment. Especially the PCR-DGGE results demonstrated the survival of GC-rich bacteria after ozone treatment.

To investigate the phenomenon of antibiotic resistance genes selection by ozone treatment, additional analyses were performed at the municipal WWTP of Neu Ulm-Steinhäule. Alongside different ozone doses (0.7, 1.0 and 1.5 g O<sub>3</sub> per g DOC) the impact of a process combination utilizing ozone treatment with subsequent UV irradiation (100 – 300 J per m<sup>2</sup>) on the abundance of antibiotic resistance genes and opportunistic bacteria was investigated. Combining these two processes resulted in an additional reduction of *P. aeruginosa*, enterococci and *bla*VIM.

To minimize the dissemination of antibiotic resistance genes and opportunistic bacteria via discharge from municipal WWTPs into the environment of Donauried, additional wastewater treatments are needed to protect the water resources in this area. An additional ozone treatment displayed the capability to reduce hygienically relevant microbial parameters in wastewater. The observed selection of some antibiotic resistance genes and opportunistic bacteria in the surviving population is only partially countered by using a higher ozone concentration in combination with UV irradiation. Also, no total elimination of hygienically relevant microbial parameters was observed.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Wissenschaftliche und regulatorische Hintergründe im Hinblick auf Krankheitserreger und Antibiotikaresistenzen.....	1
1.2	Motivation .....	3
1.3	Kenntnisstand.....	5
1.3.1	Antibiotikaresistenzsituation in der Humanmedizin.....	5
1.3.2	Antibiotikaverbrauch in der Humanmedizin .....	7
1.3.3	Antibiotikaresistenzsituation in der Veterinärmedizin.....	7
1.3.4	Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin.....	8
1.3.5	Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt .....	8
1.3.6	Kläranlagen als Hot Spot für Antibiotikaresistenzen und opportunistische Bakterien .....	10
1.3.7	Oxidative Verfahren als mögliche weiterführenden Abwasserbehandlung.....	13
1.3.7.1	Das Ozonverfahren .....	13
1.3.7.2	Das Photo-Fenton Verfahren.....	17
1.3.7.3	Die TiO <sub>2</sub> -Photokatalyse.....	17
1.3.8	Stressantworten von Bakterien auf oxidative Verfahren.....	18
1.3.9	Wissenslücken und Forschungsbedarf .....	19
2	Untersuchungsgebiete und Methoden.....	21
2.1	Beschreibung der aquatischen Habitate in der Modellregion Donauried .....	21
2.2	Beschreibung der Ozon-Pilotanlage an der Kläranlage Südhessen.....	24
2.3	Beschreibung der Ozon-Pilotanlage mit nachgeschalteter UV-Anlage am Großklärwerk Neu Ulm-Steinhäule.....	25
2.4	Aufarbeitung der Wasser- und Abwasserproben .....	26
2.5	Ausgewählte mikrobiologische Parameter: opportunistische Bakterien.....	26
2.6	Ausgewählte mikrobiologische Parameter: klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene.....	28
2.7	Quantitative Real-Time PCR .....	29
2.8	Berechnung von Zelläquivalenten.....	30
2.9	Bakterielle Lebend/Tot-Differenzierung .....	32
2.10	Bestimmung der Nuklease-Aktivität.....	32
2.11	Erfassung von DNA-Schäden .....	33
2.12	Populationsanalyse mittels reverser Transkription und PCR-DGGE.....	33
2.13	Populationsanalyse mittels Illumina 16S Amplicon-Sequenzierung.....	35
3	Ergebnisse und Diskussion .....	36



3.1	DNA als Maß für Biomasse und mikrobiologische Abundanzen in wasserführenden Systemen der Modellregion Donauried .....	36
3.1.1	Charakterisierung der Bakterienpopulationen durch die Verwendung von Zelläquivalenten .....	37
3.1.2	Abundanzen von Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien in der Bakterienpopulation untersuchter wasserführender Systeme .....	38
3.1.2.1	Klinikabwässer .....	39
3.1.2.2	Kommunale Kläranlagen .....	43
3.1.2.3	Oberflächengewässer .....	46
3.1.2.4	Regenüberlaufbecken .....	47
3.1.2.5	Grundwässer .....	48
3.1.3	Jahreszeitliche Schwankungen von Antibiotikaresistenzen in Korrelation zur Antibiotikakonzentration .....	49
3.1.3.1	Abundanz der Antibiotikaresistenzen .....	49
3.1.3.2	Abundanz der Antibiotika .....	51
3.1.4	Zusammenfassung der mikrobiologischen Charakterisierung in den untersuchten wasserführenden Systemen in der Modellregion Donauried .....	53
3.2	Mikrobiologische Charakterisierung einer Ozonbehandlung an der Kläranlage Südhessen .....	54
3.2.1	Molekularbiologische Untersuchungen zur Antibiotikaresistenz-Abundanz .....	55
3.2.2	Molekularbiologische Untersuchungen zur Abundanz opportunistischer Bakterien .....	59
3.2.3	Molekularbiologische Populationsanalyse .....	62
3.2.3.1	PCR-DGGE .....	62
3.2.3.2	Illumina 16S Amplicon-Sequenzierung .....	64
3.2.4	Nuklease-Aktivität in mit Ozon behandeltem Abwasser .....	66
3.2.5	DNA Schäden in der überlebenden Bakterienpopulation im Abwasser nach Ozonung .....	66
3.2.6	Mikrobiologisches Regenerationspotential .....	67
3.2.7	Verfahrenskombination aus Ozonbehandlung mit nachgeschalteten Filtersystemen .....	72
3.2.8	Zusammenfassung der mikrobiologischen Charakterisierung einer Ozonbehandlung an der Kläranlage Südhessen .....	74
3.3	Mikrobiologische Charakterisierung einer Ozonbehandlung an der Großkläranlage Neu Ulm-Steinhäule .....	75
3.3.1	Kulturbasierte Untersuchungen mit Indikatorbakterien .....	75
3.3.2	Verfahrenskombinationen von Ozon- und UV-Behandlung zur Reduktion des mikrobiellen Restrisikos an der Großkläranlage Neu Ulm-Steinhäule .....	76
3.3.3	Zusammenfassung der mikrobiologischen Charakterisierung einer Ozonbehandlung und Verfahrenskombinationen an der Großkläranlage Neu Ulm-Steinhäule .....	89

3.4	Mikrobiologisches Bewertungskonzept zur Evaluierung technischer Systeme .....	90
4	Ausblick .....	96
5	Veröffentlichungen .....	99
6	Literaturverzeichnis.....	101
7	Anhang.....	109

## Abkürzungsverzeichnis

<b>23S rDNA</b>	Gen für die 23S ribosomale Untereinheit auf der DNA
<b>A</b>	Adenin, Nukleotidbase
<b>ampC</b>	Ampicillinresistenzgen
<b>AOC</b>	biologisch verfügbarer organischer Kohlenstoff
<b>blaVIM</b>	Imipenemresistenzgen
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>C</b>	Cytosin, Nukleotidbase
<b>ca-MRSA</b>	Community-assoziierte Methicillin- resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid
<b>Cl<sub>2</sub></b>	gasförmiges Chlor
<b>ClO<sub>2</sub></b>	Chlordioxid
<b>DGGE</b>	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNasen</b>	Desoxyribonukleasen
<b>DOC</b>	gelöster organischer Kohlenstoff
<b>dNTPs</b>	Desoxyribonukleotidtriphosphate
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige DNA
<b>ECDC</b>	European Centre of Disease and Control
<b>ecfX</b>	Gen für den Sigma-70-Faktor von <i>P. aeruginosa</i>
<b>EMA</b>	Ethidiumbromidmonoazid
<b>ESBL</b>	Erweitertes beta-Laktam Resistenzspektrum
<b>ermB</b>	Erythromycinresistenzgen
<b>G</b>	Guanin, Nukleotidbase
<b>GAC</b>	Granulierte Aktivkohle
<b>HGT</b>	Horizontaler Gentransfer
<b>HO•</b>	Hydroxyl-Radikale

---

<b>HOCl</b>	Hypochlorid
<b>HACCP</b>	Hazard Analysis and Critical Control Points
<b>ha-MRSA</b>	Hospital-assoziierte Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>IfSG</b>	Infektionsschutzgesetz
<b>KBE</b>	Kolonie-bildende Einheiten
<b>KPC-2/3</b>	Klebsiellen-Carbapenemasen
<b>la-MRSA</b>	Livestock-assoziierte Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>LU</b>	Light Unit
<b><i>mecA</i></b>	Methicillinresistenzgen
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>NDM-1</b>	Neu-Delhi Metallo-Beta-Laktamase
<b>NTC</b>	no template control
<b>OXA-48</b>	Enterobakterielle Carbapenemase
<b>OTU</b>	Operational Taxonomical Unit
<b>PC</b>	Polycarbonat-Membran
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PMA</b>	Propidium-Monoazid
<b>PVPP</b>	Polyvinylpyrrolidon
<b>qPCR</b>	quantitative PCR
<b>R<sup>2</sup></b>	Bestimmtheitsmaß
<b>rDNA</b>	Ribosomale DNA
<b>rRNA</b>	Ribosomale RNA
<b><i>recA</i></b>	Gen für Rekombinase A
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäuren
<b>ssDNA</b>	Einzelstrang-DNA
<b>T</b>	Thymin, Nukleotidbase
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Titandioxid
<b>TrinkwV</b>	Trinkwasserverordnung

<b>TrisHCl</b>	TRIS Hydrochlorid
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b><i>vanA</i></b>	Vancomycinresistenzgen
<b>VBNC</b>	Viable but nonculturable
<b>VRE</b>	Vancomycin-resistente Enterokokken

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Antibiotikaresistenzzunahme bei gleichzeitiger Abnahme einer effektiven Antibiotikatherapie (Brooks & Brooks, 2014).....	1
<b>Abbildung 2</b> Grundlage für die Erstellung eines mikrobiologischen Bewertungskonzeptes (nach Schwartz 2012).....	3
<b>Abbildung 3</b> Einfluss und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und opportunistischen Bakterien. Die Fragezeichen weisen auf noch ungeklärte Verbreitungspfade hin. ....	11
<b>Abbildung 4</b> Mechanismen des horizontalen Gentransfers (RiSKWa-Statuspapier: Bewertungskonzepte der Mikrobiologie mit den Schwerpunkten neue Krankheitserreger und Antibiotikaresistenzen, 2015) .....	12
<b>Abbildung 5</b> Schematische Darstellung der Inaktivierung von Bakterien durch DNA-Schäden hervorgerufen durch Ozon. Beispielhaft dargestellt am Thymin (ohne Phosphat-Rest), ein Grundbausteine der DNA.....	15
<b>Abbildung 6</b> Geografische Lage der untersuchten Messstellen im Donauried. Dreiecke entsprechen Klinikabwässer, Rechtecke entsprechen Kläranlagen Zu- und Abläufe, Kreise entsprechen Oberflächengewässern, Rauten stellen Regenüberlaufbecken und Hexagone Grundwassermessstellen dar (aus Alexander et al., 2015). ....	23
<b>Abbildung 7</b> Das Behandlungssystem am Klärwerk Südhessen bestehend aus konventioneller Belebungsanlage (43.000 EW) mit anschließender Mikrosiebung, Ozonung im Pilotmaßstab, sowie Aktivkohle- und Biofiltration im halbtechnischen Maßstab. Probenahmestellen sind rot markiert	24
<b>Abbildung 8</b> Das Behandlungssystem am Klärwerk Neu Ulm-Steinhäule bestehend aus mechanischer, konventioneller und adsorptiver Reinigung. Der Ablauf der biologischen Reinigung wurde für die Behandlung der weiterführenden Abwasserbehandlungsmaßnahmen verwendet. Probenahmestellen sind rot markiert. ....	25
<b>Abbildung 9</b> Prinzip der qPCR Quantifizierung. Die Floureszenzintensität ( $R_n$ ) nimmt auf Grund der PCR-Amplifizierung mit jedem Zyklus fortlaufend zu. Sobald der Schwellenwert (Threshold) überschritten und signifikant über dem Hintergrundsignal liegt, wird der Ct-Wert aufgezeichnet. Je größer der Ct-Wert, umso geringer die Anzahl der Genkopien.....	29
<b>Abbildung 10</b> Berechnung von Zelläquivalenten durch die Korrelation von Kultivierung und qPCR Quantifizierung.....	31
<b>Abbildung 11</b> Muster der Antibiotikaresistenzgene in der bakteriellen Gesamtpopulation und gemessenen Gesamtantibiotikakonzentration, hier als Summenparameter dargestellt, ausgehend vom Klinikabwasser, über die lokale Kläranlage bis in die Donau aus 5 Probenkampagnen. ....	51
<b>Abbildung 12</b> Ozonbehandlung im Pilotmaßstab mit nachgeschalteten Filtersystemen.....	55
<b>Abbildung 13</b> Abundanzen der Untersuchten Antibiotikaresistenzgene in Zelläquivalenten pro 100 ng Gesamt-DNA. Analysiert wurden nur die lebenden Anteile der Bakterienpopulationen aus insgesamt 48 Probenahmen. Dargestellt sind die Abundanzen im Zulauf des Ozonbehandlung und im Ablauf. ....	58
<b>Abbildung 14</b> Abundanzen der untersuchten opportunistischen Bakterien in Zelläquivalenten pro 100 ng Gesamt-DNA. Analysiert wurden nur die lebenden Anteile der Bakterienpopulationen aus insgesamt 48 Probenahmen. Dargestellt sind die Abundanzen im Zulauf des Ozonanlage und im Ablauf. ....	60
<b>Abbildung 15</b> Effekt der Ozonung auf die bakterielle Population im Abwasser. ....	62
<b>Abbildung 16</b> Standard PCR-DGGE Populationsanalyse. 3 unabhängige Abwasserproben vor und nach Ozonbehandlung sind dargestellt. Intensität der Banden ist auf die Häufigkeit der jeweiligen Bakterienspezies innerhalb der Gesamtpopulation zurück zu führen. Dadurch sind Reduktions- und	

<i>Selektionsprozesse durch die Ozonbehandlung zu erkennen. Analysiert wurden nur die lebenden Anteile der Bakterienpopulationen. O3in: Zulauf der Ozonanlage; O3 out: Ablauf des Ozonsystems.</i>	
<b>Abbildung 17</b> Die IlluminaMiSeq 16S Populationsanalyse vom Zu- und Ablaufs des Ozonsystems. Nur Gattungen mit mehr als 1% Abundanz sind dargestellt. Hervorgehoben sind die dominanten Gattungen nach der Ozonbehandlung.....	65
<b>Abbildung 18</b> DNA-Schäden in der Bakterienpopulation induziert durch die Ozonbehandlung ....	67
<b>Abbildung 19</b> Abundanz des Enterokokken 23S Markers in der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlage (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung .....	68
<b>Abbildung 20</b> Geringe Abundanz von Staphylokokken (MRSA und CNS) im Zulauf der Kläranlage (nach Rechen) und nach konventioneller Klärung. Nach anschließender Ozonbehandlung ist der genetische Marker ( <i>mecA</i> ) nicht mehr nachweisbar .....	69
<b>Abbildung 21</b> Anteil an <i>P. aeruginosa</i> an der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlage (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung .....	69
<b>Abbildung 22</b> Abundanzen für das Antibiotikaresistenzgen <i>blaVIM</i> anteilig an der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlage (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung .....	70
<b>Abbildung 23</b> Abundanzen für das Antibiotikaresistenzgen <i>vanA</i> anteilig an der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlagen (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung .....	71
<b>Abbildung 24</b> Abundanzen für das Antibiotikaresistenzgen <i>ampC</i> anteilig an der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlagen (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung .....	71
<b>Abbildung 25</b> Abundanzen für das Antibiotikaresistenzgen <i>ermB</i> anteilig an der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlagen (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung .....	72
<b>Abbildung 26</b> Einfluss der konventionellen Klärung mit anschließender Ozonbehandlung auf die Konzentration der kultivierbaren <i>E. coli</i> und coliformen Keime .....	76
<b>Abbildung 27</b> Prozentualer Anteil der antibiotikaresistenten <i>E. coli</i> und coliformen Keime an der Gesamtkeimzahl .....	76
<b>Abbildung 28</b> Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf <i>P. aeruginosa</i> in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (grün) der jeweiligen Abwasserbehandlung .....	77
<b>Abbildung 29</b> Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O <sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf <i>P. aeruginosa</i> in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (grün) der jeweiligen Abwasserbehandlung .....	78
<b>Abbildung 30</b> Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf Enterokokken in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (blau) der jeweiligen Abwasserbehandlung .....	79
<b>Abbildung 31</b> Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O <sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf Enterokokken in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (blau) der jeweiligen Abwasserbehandlung .....	80
<b>Abbildung 32</b> Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf Imipenem-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (rot) der jeweiligen Abwasserbehandlung .....	81
<b>Abbildung 33</b> Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O <sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf Imipenem-resistente Bakterien in der	

---

<i>überlebenden Bakterien-population vor (grau) und nach (rot) der jeweiligen Abwasserbehandlung</i>	82
<b>Abbildung 34</b> <i>Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf Vancomycin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (dunkelblau) der jeweiligen Abwasserbehandlung</i>	83
<b>Abbildung 35</b> <i>Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf Vancomycin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterien-population vor (grau) und nach (dunkelblau) der jeweiligen Abwasserbehandlung</i>	84
<b>Abbildung 36</b> <i>Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf Ampicillin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (gelb) der jeweiligen Abwasserbehandlung</i>	85
<b>Abbildung 37</b> <i>Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf Ampicillin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterien-population vor (grau) und nach (gelb) der jeweiligen Abwasserbehandlung</i>	86
<b>Abbildung 38</b> <i>Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf Erythromycin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (violett) der jeweiligen Abwasserbehandlung</i>	87
<b>Abbildung 39</b> <i>Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf Erythromycin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterien-population vor (grau) und nach (violett) der jeweiligen Abwasserbehandlung</i>	88



## Tabellenverzeichnis

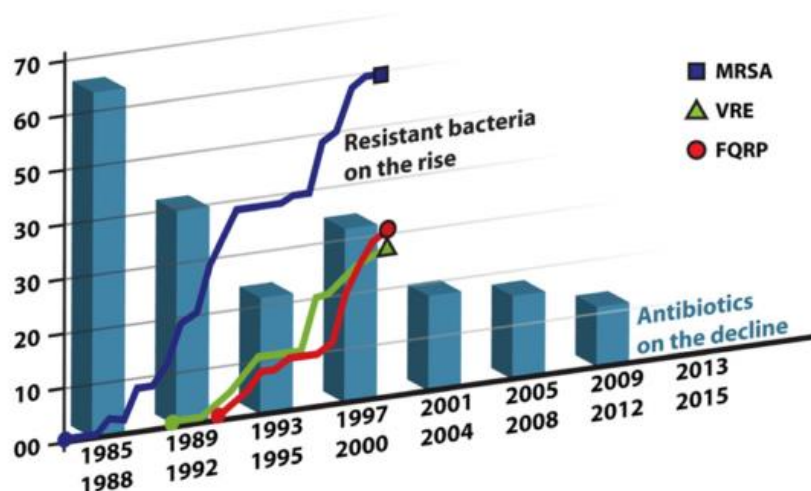
<b>Tabelle 1</b> Antibiotikaresistenzraten bakterieller Krankenhausinfektionen. Robert Koch-Institut: ARS, Stand 28.01.2014 .....	6
<b>Tabelle 2</b> Dosis-Wirkungs-Koeffizient für 99% Inaktivierung (mg pro min/L).....	14
<b>Tabelle 3</b> Geschwindigkeitskonstante verschiedener Nukleinsäure-Basen und verwandten Substanzen mit Ozon ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) bei unterschiedlicher Protonierung (Flyunt, 2007) .....	15
<b>Tabelle 4</b> Übersicht der untersuchten Messstellen im Donauried .....	22
<b>Tabelle 5</b> Primersysteme zur Detektion opportunistischer Bakterien .....	27
<b>Tabelle 6</b> Primersysteme zur Detektion von Antibiotikaresistenzgenen.....	28
<b>Tabelle 7</b> Kultivierung von antibiotikaresistenten Bakterien nach CLSI Standards.....	30
<b>Tabelle 8</b> Primersystem zur Amplifikation eines 16S Fragments für PCR-DGGE Analysen .....	34
<b>Tabelle 9</b> DNA-Konzentrationen pro 100 mL aus jeder der untersuchten Messstellen im Donauried. Der Durchschnittswert basiert auf 5 Probenahmen über einen Zeitraum von 12/2012 bis 02/2014. ....	37
<b>Tabelle 10</b> Gleichungen der Kalibriergeraden zur Berechnung der Zelläquivalente von Antibiotikaresistenzträgern und opportunistischen Bakterien.....	38
<b>Tabelle 11</b> Häufigkeiten der Antibiotikaresistenzgene in der Bakterienpopulation der untersuchten Messstellen. Mittelwerte aus 6 Probenahmen innerhalb des 2-jährigen Monitorings, dargestellt in Zelläquivalenten pro 100 ng Gesamt-DNA. Zusätzlich sind die Standardabweichungen aufgeführt (je Messstelle 6 Untersuchungen als Triplikate). ....	40
<b>Tabelle 12</b> Häufigkeiten opportunistischer Mikroorganismen in der Bakterienpopulation der untersuchten Messstellen. Mittelwerte aus 6 Probenahmen innerhalb des 2-jährigen Monitorings, dargestellt in Zelläquivalenten pro 100 ng Gesamt-DNA. Zusätzlich sind die Standardabweichungen aufgeführt (je Messstelle 6 Untersuchungen als Triplikate). ....	41
<b>Tabelle 13</b> Häufigkeiten der Antibiotikaresistenzgene in der Bakterienpopulation der untersuchten Messstellen. Mittelwerte aus 6 Probenahmen innerhalb des 2-jährigen Monitorings, dargestellt in Zelläquivalenten pro 100 mL Wasservolumen. Zusätzlich sind die Standardabweichungen aufgeführt (je Messstelle 6 Untersuchungen als Triplikate). ....	42
<b>Tabelle 14</b> Häufigkeiten opportunistischer Mikroorganismen in der Bakterienpopulation der untersuchten Messstellen. Mittelwerte aus 6 Probenahmen innerhalb des 2-jährigen Monitorings, dargestellt in Zelläquivalenten pro 100 mL Wasservolumen. Zusätzlich sind die Standardabweichungen aufgeführt (je Messstelle 6 Untersuchungen als Triplikate). ....	43
<b>Tabelle 15</b> Konzentrationen von Antibiotika und Antibiotikametaboliten in Klinikabwasser und in der nachfolgenden Kläranlage (LOD: Limit of Detection, NS: No Signal). ....	52
<b>Tabelle 16</b> Nukleotid-Anteil der identifizierten dominanten Bakterienspezies (nach Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).....	65
<b>Tabelle 17</b> Einfluss von nachgeschalteten Bio- und granulierter Aktivkohle Filter auf die Abundanz von Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien. Alle Filter wurden als Parallelsystem anschließend an die Ozonbehandlung installiert. Abundanzen sind in Zelläquivalenten pro 100 ng DNA dargestellt. ....	73
<b>Tabelle 18</b> Mikrobiologischer Bewertungsindex (MBI).....	92
<b>Tabelle 19</b> Anwendung der Bewertungsmatrix auf den Zulauf der Ozonbehandlung .....	92
<b>Tabelle 20</b> Anwendung der Bewertungsmatrix auf den Ablauf der Ozonung. In Klammern ist der Wert der Reduktionsleistung/Akkumulation angegeben .....	93

# 1 Einleitung

## 1.1 Wissenschaftliche und regulatorische Hintergründe im Hinblick auf Krankheitserreger und Antibiotikaresistenzen

Die Ausbreitung von bakteriellen Krankheitserregern, die eine Unempfindlichkeit gegenüber gängigen Antibiotikatherapien aufweisen, wird weltweit von den Gesundheitsbehörden in der Human- und Veterinärmedizin mit zunehmender Besorgnis zur Kenntnis genommen. Ein Fortführen dieser Entwicklung birgt die Gefahr, dass der Ausgang von bakteriellen Infektionskrankheiten schwerwiegende bis tödliche Folgen für den Patienten haben wird.

Die Entstehung einer Antibiotikaresistenz ist ein evolutionärer Vorgang, den Bakterien aufgrund ihrer genetischen Vielfalt, Mutationsrate und kurzen Reproduktionszyklen bestens beherrschen. Durch den übermäßigen Gebrauch von Antibiotika beschleunigt sich diese Entwicklung und gibt antibiotikaresistenten Bakterien die Möglichkeit, sich ungehindert zu vermehren und andere selektionsbestimmenden Einflüsse (z.B. zwischenartliche Konkurrenz) zu ignorieren. Durch die Übertragung und die Akkumulation von Antibiotikaresistenzgenen entstehen multiresistente Erreger, gegen die eine Vielzahl von Antibiotika unwirksam sind. Diese Entwicklung findet sich häufig in Krankenhäusern wieder, da durch den hohen Einsatz an Antibiotika und dem Auftreten von Hygienemängeln die Selektion und Ausbreitung antibiotikaresistenter Infektionserreger beschleunigt wird. Eine Verschärfung dieser Problematik entsteht zusätzlich dadurch, dass die Anzahl neu zugelassener Antibiotikapräparate rückläufig ist, obwohl sich die Antibiotikaresistenzen häufen (Abbildung 1).



**Abbildung 1** Antibiotikaresistenzzunahme bei gleichzeitiger Abnahme einer effektiven Antibiotikatherapie (Brooks & Brooks, 2014)

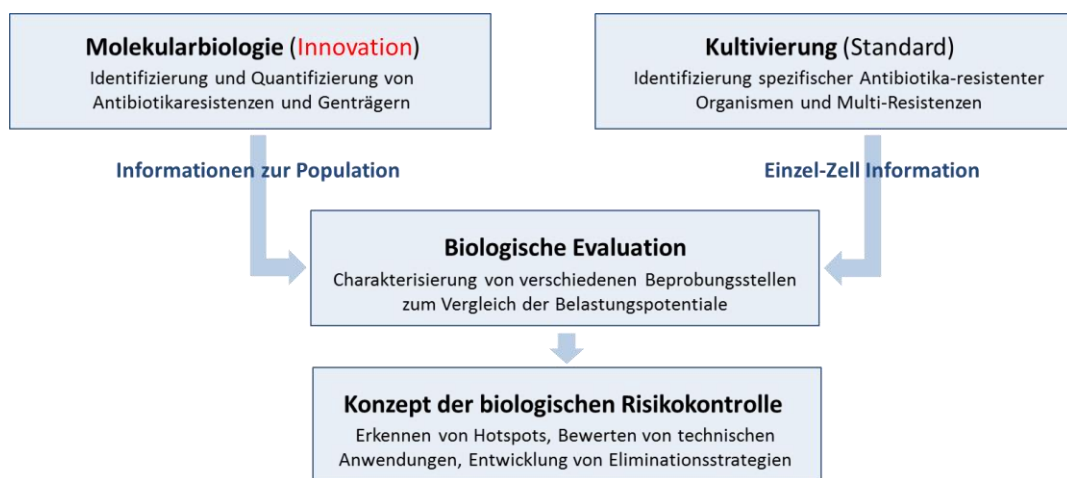
Aber auch im Bereich der Nutztierhaltung verursacht die Zunahme an antibiotikaresistenten Bakterien Probleme. Neben Behandlungsproblemen, analog zum Menschen, kommen auch höhere wirtschaftliche Ausgaben für die Tierhaltung sowie ein erhöhter Antibiotikaverbrauch hinzu (Kapitel 1.3.4). Über die Tiermast gelangen Antibiotika als Muttersubstanz oder als Metabolit mit den Ausscheidungen der behandelten Tiere in die Umwelt. Über Gülle und Mist sowie Freilandhaltung werden diese Substanzen durch Abschwemmungen in Oberflächen- und Grundwässer eingetragen. Die Kontamination mit niedrig konzentrierten Antibiotika und resistenten Bakterien haben Einfluss auf die Induktion von Selektionsereignissen, Antibiotikaresistenzentwicklung und Genübertragungen, die bis heute noch nicht vollständig verstanden sind (Rizzo et al., 2013).

Die Belastung von wasserführenden Systemen mit antibiotikaresistenten Bakterien beschreibt die WHO als ein wachsendes, globales Problem, dem mit angepassten Überwachungsmechanismen und Kontrollansätzen Einhalt geboten werden muss. Neben Abschwemmungen von landwirtschaftlichen Nutzflächen, die einen direkten Eintragsweg für antibiotikaresistente Bakterien in angrenzende Gewässer darstellen können, tragen vor allem Abwassersysteme aus dem Bereich der Industrie (Kühlwasser), der Krankenhäuser (behandlungsbedingte Schadstofffrachten), der Landwirtschaft (Schlachtbetriebe) sowie kommunaler Haushalte über kommunale Kläranlagen zur Kontamination der angrenzenden Vorfluter bei (Kapitel 1.3.6, Abbildung 3).

Eine Vielzahl von abwasserbezogenen Parametern stimuliert dabei die Verbreitung von genetischem Material innerhalb einer Population (Michael et al., 2013). So stimulieren z.B. Antibiotika in Konzentrationen weit unter der medizinisch wirksamen Dosis eine erhöhte Genexpression und induzieren Aktivitäten, die zur Entwicklung und Verbreitung von Resistenzmechanismen führen oder dienen der Zell-Zell Kommunikation (Davies, 2006). Eine genetische Antwort auf diese Art der Stimulation ist der horizontale Gentransfer (HGT), durch den genetisches Material auch zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies übertragen werden kann. Dieser Umstand wird zusätzlich durch eine hohe Bakteriendichte und Magnesium- sowie Calciumionen (1,0 – 1,5 mM), die im Abwasser aber auch Oberflächengewässer in relevanten Konzentrationen häufig nachgewiesen werden, begünstigt (Davies, Spiegelman and Yim, 2006). Im Gegensatz zu den niedrigen Konzentrationen der Antibiotika in der Wasserphase führt eine Akkumulation von Mikroorganismen und adsorbierten Antibiotika im Rahmen der Abwasserbehandlung (Klärschlamm) zu einer Erhöhung des Selektionsdrucks und zu gesteigerten Mutations- sowie Rekombinationsereignissen in Bakterien. Mit dem jeweiligen Selektionsvorteil führt dies zu einer Häufung an antibiotikaresistenten Mikroorganismen nach der Abwasserbehandlung und in nachfolgenden Oberflächengewässern (Rizzo et al., 2013).

Dabei spielen Antibiotikaresistenzgene, die mit mobilen genetischen Elementen (Plasmide, Transposons und Integrons) assoziiert sind, eine wichtige Rolle für Rohwasser, das z. B. zur Trinkwasseraufbereitung genutzt wird. Diese mobilen Elemente können auch auf autochthone Trinkwasserbakterien übertragen werden und spielen damit eine wichtige Rolle als Reservoir für klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene (Schwartz et al., 2003).

Die derzeitige Definition einer Antibiotikaresistenz basiert auf klinischen Standardtests mit festgelegten Bestimmungsgrenzen (EUCAST/CLSI) und soll Aufschluss über den Erfolg oder Misserfolg einer Antibiotikatherapie geben. Es ist allerdings fraglich, ob diese für den klinischen Bereich zugeschnittenen Methoden und Bestimmungsgrenzen auch auf die Umweltmikrobiologie angewendet werden können, da die Antibiotikakonzentrationen in der Umwelt meist um ein vielfaches niedriger sind (subletal), aber trotzdem genetische modulatorische Effekte vielfältig beobachtet wurden. Außerdem werden die Verteilungen von Antibiotikaresistenzgenen in der Gesamtpopulation nicht berücksichtigt. Abbildung 2 gibt einen Überblick, auf welchen Grundlagen ein Bewertungskonzept für Antibiotikaresistenzen in der Umwelt beruhen kann und welche Ziele damit erreicht werden sollen.



**Abbildung 2** Grundlage für die Erstellung eines mikrobiologischen Bewertungskonzeptes (nach Schwartz 2012)

## 1.2 Motivation

Der Schutz des Wassers vor mikrobiologischer Kontamination insbesondere durch Krankheitserreger erfolgt derzeit gemäß dem § 37 IfSG und besagt, dass "Wasser für den menschlichen Gebrauch so beschaffen sein muss, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit, insbesondere durch Krankheitserreger, nicht zu besorgen ist". Im Bereich der Trinkwasseraufbereitung und -verteilung ist die mikrobielle Überwachung in der Trinkwasserverordnung (§ 7 und § 14 TrinkwV) geregelt und basiert auf

einem Indikatorprinzip (*E.coli*, Enterokokken pro 100 mL) als Endproduktkontrolle. Dabei beruht diese Kontrolle auf Methoden, die vor mehr als 100 Jahren etabliert wurden, um Infektionserreger fäkaler Herkunft wie Cholera oder Typhus, zu erkennen. Die gesetzlich geregelten Richtwerte für Mikroorganismen beziehen sich dabei nur auf das aufbereitete Trinkwasser, obwohl im § 5 (5) IfSG auch auf den Status des Rohwassers eingegangen wird, der ausgehend vom mikrobiologischen Zustand des Gewässers, eine Desinfektion erfordert. Auch im § 41 (1) IfSG wird darauf hingewiesen, dass die Abwasserbeseitigung so zu bewerkstelligen ist, dass keine Gefahren für die menschliche Gesundheit durch Krankheitserreger entstehen. In der für die Gewässerqualität zuständigen EG-Wasserrahmenrichtlinie sind allerdings keine Regelungen für das Auftreten und die Überwachung von Krankheitserregern oder Antibiotikaresistenzen im Gewässer festgelegt.

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Zunahme wasserassoziierter Krankheitserreger beobachtet, die mit dem derzeitigen Routineverfahren zur Wasserqualitätssicherung nicht detektiert werden konnten (Jones and Roworth 1996; Olsen et al., 2002). Ursachen dafür sind die Lücken im derzeitigen Kontrollsystemen wie das geringe Untersuchungsvolumen von 100 mL, die geringe Persistenz von Indikatorbakterien im Gewässer, die Abhängigkeit von der Kultivierbarkeit der Erreger und die erhöhte Anfälligkeit der Indikatoren gegenüber Desinfektionsmittel. Zu diesen wasserassozierten Krankheitserregern können auch antibiotikaresistente Mikroorganismen gehören, die aufgrund von veränderten Umweltverhältnissen ein gesteigertes Vermehrungspotential besitzen. Unter Berücksichtigung des im § 37 (1) IfSG genannten Besorgnisgrundsatzes müssen daher Anpassungen unternommen werden, um die hygienisch mikrobiologische Wasserqualität zu verbessern.

Im Gegensatz zur derzeitigen Endproduktkontrolle im Trink- und Abwasserbereich bietet das aus der Lebensmittelindustrie stammende *Hazard Analysis and Critical Control Point* (HACCP) Konzept einen systematischen Ansatz. Dieser beinhaltet die Überwachung kritischer Kontrollpunkte auf dem Weg zum Verbraucher, um mögliche Risiken für das Endprodukt abschätzen zu können. Für wasserführende Systeme bedeutet das, dass der Weg über Abwasser, Abwasserbehandlung, Vorfluter sowie den Vorfluter beeinflussende Wässer (Regenentlastungsbecken) und Grundwässer bei einer Risikocharakterisierung einbezogen werden müssen.

Daraus resultieren die nachfolgend gelisteten Ziele dieser Arbeit:

- Erfassung und Quantifizierung von Belastungssituationen für klinisch relevante Antibiotikaresistenzen und opportunistische Bakterien im Klinikabwasser, kommunalem Abwasser, Oberflächengewässer, Regenüberlaufbecken und Grundwasser
- Schaffung neuer Bezugsgrößen zur Abschätzung eines mikrobiologischen Risikopotentials für die Bewertung wasserführender Systeme
- Mikrobiologische Bewertung einer weiterführenden Abwasserbehandlung (Ozonung) in Kombination mit verschiedenen Filtersystemen oder UV-Behandlung (4. Reinigungsstufe)
- Die Entwicklung eines mikrobiologischen, handlungsorientierten Bewertungskonzepts für klinisch relevante Antibiotikaresistenzen und opportunistische Bakterien in wasserführenden Systemen

### **1.3 Kenntnisstand**

Ein Überblick zur derzeitigen Belastungssituation im human- sowie veterinärmedizinischen Bereich im Zusammenhang mit dem Antibiotikaverbrauch und der Antibiotikaresistenzsituation sowie mögliche Abwasserbehandlungsverfahren ist notwendig, um geeignete Maßnahmen zur Eindämmung der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen über wasserführende Systeme langfristig und damit nachhaltig umsetzen zu können.

#### **1.3.1 Antibiotikaresistenzsituation in der Humanmedizin**

Methicillinresistenz bei Staphylokokken

Die Inzidenz „hospital acquired“ Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (ha-MRSA) in deutschen Krankenhäusern stieg zwischen 1999 und 2004 kontinuierlich an und bewegte sich zwischen 2005 bis 2011 auf einem konstanten Niveau um 20%. In den Folgejahren wurde ein stetiger Rückgang von MRSA in den Kliniken verzeichnet, der 2013 ein Tiefststand von 12,8% erreichte (GERMAP 2012). Entgegen diesem Trend meldete das Robert Koch-Institut (RKI) 2014 wieder einen Anstieg auf 21,7% MRSA Patientenisolaten (Tabelle 1). Neben ha-MRSA sind die sogenannten „community“ (Lebensgemeinschaft) assoziierten MRSA (ca-MRSA) und „lifestock“ (Tierzucht) assoziierten MRSA (la-MRSA) von steigender Relevanz, da deren Abundanzen insbesondere in Regionen mit intensiver Nutztierhaltung zunimmt. Diese Zoonosen sind vor allem für das Einbringen anderer Methicillinresistenz-Varianten (*mecC*) und neuen Antibiotikaresistenzgenen, wie *cfr* (Linezolidresistenz), von Bedeutung. Dieser Umstand ist

besondere Aufmerksamkeit gewidmet, da eine Möglichkeit zur Übertragung von *cfr* auf ha-MRSA befürchtet wird (GERMAP 2012, Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch).

#### Vancomycin- und ESBL-Resistenz

Neben MRSA verzeichnet das RKI einen steigenden Trend an nosokomialen Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) auf Intensivstationen (18,5%). Neben MRSA und VRE nimmt die Inzidenz von Erregern mit einem erweiterten Spektrum an Beta-Laktam-Antibiotikaresistenzen (ESBL), wie beispielsweise *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Klebsiella pneumoniae* zu. Diese Mikroorganismen sind auch gegen moderne Antibiotika wie Cephalosporine der dritten und vierten Generation resistent. Hinzu kommt, dass die für die ESBL-Bildung verantwortlichen Gene häufig auf Plasmiden lokalisiert sind. Diese ringförmigen, mobilen genetischen Elemente können sowohl leicht auf Bakterien derselben Spezies als auch auf Bakterien verschiedener Spezies übertragen werden. Die Resistenzrate an ESBL bildenden *E. coli* verzeichnet in den vergangenen Jahren eine stetige Zunahme und liegt derzeit bei fast 15% aller klinischen Isolate (DART 2020, Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie).

#### Carbapenemresistenz

Ebenfalls besorgniserregend ist die zunehmende Resistenz gegenüber Carbapenemen. Die wichtigsten Carbapenemresistenzen (KPC-2 und 3, NDM-1, OXA-48, VIM) wurden ab 2012 deutlich häufiger in Patientenisolaten nachgewiesen als in den Jahren zuvor (RKI, 2013). Carbapeneme werden als Reserveantibiotika zur Behandlung schwerer Infektionskrankheiten eingesetzt. Bei Infektionen mit Erregern, die gegen diese Art von Antibiotika resistent sind, stehen nur noch wenige Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung, oder auch gar keine.

**Tabelle 1** Antibiotikaresistenzraten bakterieller Krankenhausinfektionen. Robert Koch-Institut: ARS, Stand 28.01.2014

<b>Methicillin</b> resistenzgen ( <i>mecA</i> ) aus <b>Staphylokokken</b> :	<b>21,7%</b> aller klinischen Infektionen
<b>Ampicillin</b> resistenzgen ( <i>ampC</i> ) aus <b>Enterobacteriaceae</b> :	<b>51,2%</b> aller klinischen Infektionen
<b>Vancomycin</b> resistenzgen ( <i>vanA</i> ) aus <b><i>E. faecium/faecalis</i></b> :	<b>18,5%</b> aller klinischen Infektionen
<b>Imipenem</b> resistenzgen ( <i>blaVIM</i> ) aus <b><i>P.aeruginosa</i></b> :	<b>11,6%</b> aller klinischen Infektionen
<b>Erythromycin</b> resistenzgen ( <i>ermB</i> ) aus <b><i>S. pneumoniae</i></b> :	<b>62,9%</b> aller klinischen Infektionen

### **1.3.2 Antibiotikaverbrauch in der Humanmedizin**

In der Humanmedizin gehören Antibiotika zu den 5 häufigsten verordneten Arzneimitteln in Deutschland. Da aber meist akute Erkrankungen behandelt werden, ist die Therapiedauer vergleichsweise kurz. Dadurch fällt das Verordnungsvolumen im Gegensatz zu vielen anderen Medikamenten weitaus geringer aus. Zu den am häufigsten verschriebenen Antibiotika zählen Basispenicilline (Oral- und Aminopenicilline), Tetracycline, Makrolide und Chinolone mit 168, 66, 47 und 38 Millionen verordneten Tagesdosen (GERMAP 2012). Im europäischen Vergleich orientiert sich Deutschland damit im unteren Drittel zusammen mit den Niederlanden, Österreich, den skandinavischen Ländern, Slowenien, Russland und der Schweiz. Griechenland, Zypern, Frankreich, Italien und Belgien bilden die Spitzengruppe mit teilweise mehr als doppelt so vielen Tagesdosen pro 1.000 Einwohner. Die absolute Menge an verordneten Antibiotika in Deutschland betrug im Jahr 2011 zwischen 700 und 800 Tonnen pro Jahr und liegt damit unter den veterinärmedizinisch verordneten Mengen. Für mehr als 50% der verordneten Antibiotika sind Hausärzte verantwortlich. Wobei der Gesamtantibiotikaverbrauch leicht und der Anteil der Reserveantibiotika stark angestiegen ist.

### **1.3.3 Antibiotikaresistenzsituation in der Veterinärmedizin**

Bei Schweinemastbetrieben sowie Geflügelfarmen, Klein- und Heimtieren wurden in den letzten Jahren verstärkt multiresistente Keime nachgewiesen, die auch auf den Menschen übertragen werden können. Bei Untersuchungen von Menschen mit direktem Kontakt zu Tieren aus Mastbetrieben lag die Besiedlung mit MRSA bei 24%. Bei Menschen ohne direkten Kontakt lag die Anzahl der positiven MRSA Befunde bei nur 1,5% (Bisdorff et al., 2011). Zusätzlich zur direkten Übertragung vom Tier auf den Menschen und von Mensch zu Mensch können sich antibiotikaresistente Bakterien durch den Einsatz von Gülle als Dünger auch auf Pflanzen ansiedeln. Dadurch können resistente Keime auch auf Obst und Gemüse gelangen. Weiterhin kann auch die Verregnung und Bewässerung mit Abwasser-belastetem Oberflächengewässer zur Kontamination von Kulturpflanzen führen (indirect reuse). Dadurch können Rückkopplungen zum Menschen nicht ausgeschlossen werden.

Keime aus Mastbetrieben weisen vermehrt Resistenzen gegen Fluorchinolone und Cephalosporine der dritten Generation auf und vereinzelt wurden auch Enterobakterien mit Carbapenemasen festgestellt (DART 2020). Die Resistenzverteilung zeigt, dass die meisten Erreger von Atemwegsinfektionen bei Tieren empfindlicher auf Antibiotikabehandlung reagieren (*Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* und *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Resistenzraten unter 20%), als Erreger von Durchfallerkrankungen (Gülle) und Hautinfektionen.



*E. coli* von Schweinen und Geflügel wiesen hohe Resistenzraten gegenüber Ampicillin, Doxycyclin und Tetracyclin auf. *P. aeruginosa*-Isolate aus Heimtieren zeigten gleichbleibend hohe Resistenzen gegen eine Vielzahl an Antibiotika (GERMAP 2012).

#### **1.3.4 Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin**

Bundesweite Daten zu den Abgabemengen von Antibiotika an Tierärzte werden seit dem Jahr 2011 erfasst. Dabei wurden im Jahr 2011 und 2012 insgesamt 1.706 bzw. 1.619 Tonnen (Grundsubstanz) an antimikrobiell wirksamen Substanzen an Tierärzte abgegeben. Damit nimmt Deutschland eine Spitzenposition im europäischen Vergleich mit Spanien (1.781 Tonnen pro Jahr) und Italien (1.672 Tonnen pro Jahr) ein. Alle anderen europäischen Länder meldeten weniger als 1.000 Tonnen an Antibiotika pro Jahr. Damit kommen im Veterinärbereich doppelt so viele Antibiotika zum Einsatz als zur Behandlung von humanen Infektionskrankheiten. Dieser Trend scheint rückläufig zu sein, da pharmazeutische Unternehmen und Großhändler im Jahr 2013 nur noch 1.452 Tonnen Antibiotika an Tierärzte abgegeben haben. Das sind 167 Tonnen weniger als im Vorjahr und rund 250 Tonnen weniger als im Jahr 2011. Die Menge an Fluorchinolonen, deren Verwendung in der Tiermedizin aufgrund ihrer Bedeutung in der Humanmedizin kritisch gesehen wird, ist 2013 allerdings erneut gestiegen. Es wurden von diesen Antibiotika zwölf Tonnen abgegeben, zwei Tonnen mehr als 2012 und vier Tonnen mehr als 2011 (DART 2020).

Zu den am häufigsten verabreichten Antibiotika zählen die Gruppen der Tetracycline (564 - 566 Tonnen pro Jahr), Penicilline (498 - 527 Tonnen pro Jahr), Sulfonamide (162 - 185 Tonnen pro Jahr), Makrolide (145 - 173 Tonnen pro Jahr) und Polypeptidantibiotika (124 - 127 Tonnen pro Jahr). Neben diesen „alten“ Substanzen werden allerdings zu einem geringeren Anteil auch Cephalosporine der 3. und 4. Generation verbraucht (8 bzw. 3,5 Tonnen pro Jahr) (Germap 2012).

#### **1.3.5 Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt**

Neben abiotischen Schadstoffen spielen für die Gewässerqualität auch fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzen eine zunehmend wichtigere Rolle. Neben Viren, Pilzen und Parasiten sind ca. 200 Bakterienarten als obligat pathogen, fakultativ oder opportunistisch pathogen eingestuft. Diese Bakterien können über Abwasserwege oder landwirtschaftliche Abschwemmungen zu einer Kontamination von aquatischen Systemen führen. Durch die Art der Kontamination können Menschen entweder durch Aufnahme und Kontakt mit einem resistenten pathogenen Bakterium aus dem Wasser direkt, oder indirekt durch eine Übertragung von

Antibiotikaresistenzgenen autochtoner Bakterien auf Pathogene gefährdet werden, welche dadurch eine zukünftige Infektionstherapie bedrohen können. Im Gegensatz zu chemischen Schadstoffen ist bei bakteriellen Kontaminationen aufgrund des Vermehrungspotentials, der Physiologie der Mikroorganismen, dem Zustand des menschlichen Immunsystems und der Expositionszeit eine vergleichbare Risikoabschätzung nur schwer möglich.

Als primäre anthropogene Quellen für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt werden Abwässer aus Kliniken, kommunalen Kläranlagen und Abwässer der Mast- und Lebensmittelbetriebe angesehen. Neben der häufigen Verwendung von Antibiotika kann es auch durch die Emission von Bioziden als Desinfektionsmittel oder anderen antimikrobiell wirksamen Chemikalien zu einer möglichen Co-Selektion von Antibiotikaresistenzen in Bakterien kommen. Wie zuvor in Kapitel 1.1 beschrieben, kommt es während des Klärprozesses zu einer Anreicherung von bestimmten Antibiotika durch Adsorption an Flocken des Belebtschlamm (z.B. Fluorchinolone). Damit verbunden ist auch eine Akkumulation bzw. Selektion von Antibiotikaresistenzen bei hoher Bakteriendichte im Belebtschlamm. Daher sind Kläranlagen auch eine relevante sekundäre Quelle von Antibiotikaresistenzen.

Die *World Health Organisation* (WHO) beschreibt das Auftreten und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen als globales Problem mit dem die Menschheit in Zukunft in verstärktem Maße konfrontiert sein wird (Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014). Es ist deshalb notwendig, einerseits das Auftreten und die Verbreitung von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen zu untersuchen, und andererseits die Effizienz zusätzlicher Abwasserbehandlungen zur Reduktion von Antibiotika-resistenten Bakterien in aufbereitetem Abwasser von kommunalen Kläranlagen zu analysieren.

Die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen, ausgelöst durch den Menschen, ist ein höchst kritisches Beispiel der bakteriellen Evolution mit großer Relevanz für die Human- und Veterinärmedizin. Zum Beispiel kann eine multiple Antibiotikaresistenz eine Therapie im Infektionsfall deutlich erschweren oder unmöglich machen und dadurch erhebliche gesundheitliche Konsequenzen nach sich ziehen. Das bedeutet, dass diese Problematik eine direkte Auswirkung auf unsere Gesellschaft hat.

Der Anstieg der beobachteten Antibiotikaresistenzen ist ursächlich durch den hohen Verbrauch von Antibiotika bedingt. Für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt können vier Mechanismen genannt werden:

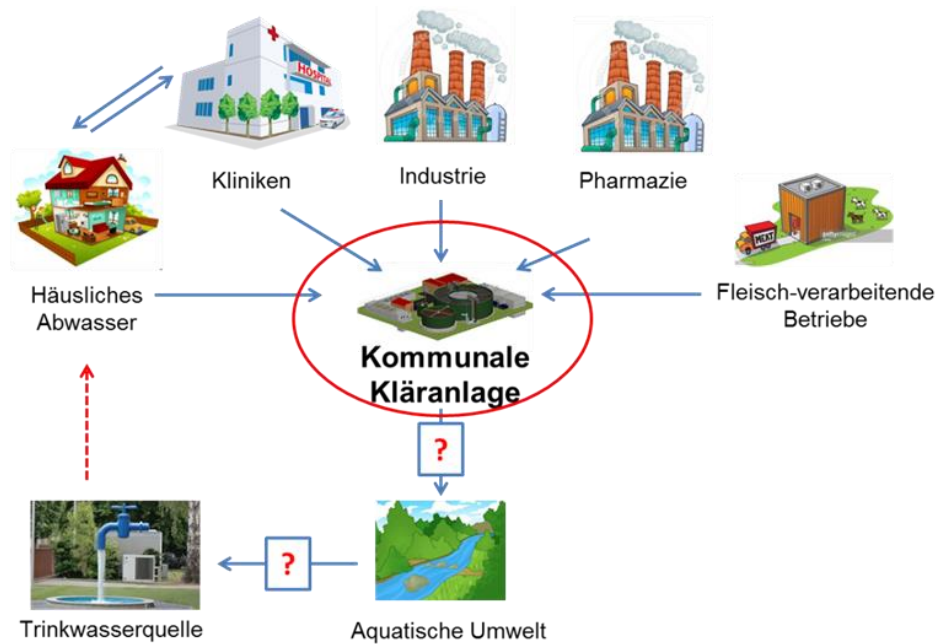
- Der horizontale Gentransfer von Antibiotikaresistenzgenen zwischen Bakterien gleicher und unterschiedlicher Spezies

- Selektionsereignisse resistenter Bakterien durch antimikrobiell wirksame Substanzen (auch gerade bei niedrigen Konzentrationen)
- Genetische Prädispositionen für Mutations- und Rekombinationsereignisse in Bakterien
- Direkte Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien aus der Human- und Veterinärmedizin

Durch diese Mechanismen wird die Resistenzlage einerseits durch gerichtete molekulare Prozesse und andererseits durch spontane Ereignisse beeinflusst.

### **1.3.6 Kläranlagen als Hot Spot für Antibiotikaresistenzen und opportunistische Bakterien**

Pharmazeutika werden über Ausscheidungen von Mensch und Tier und durch unsachgemäße Entsorgung in die aquatische Umwelt eingetragen. Humanpharmazeutika wie Antibiotika gelangen aus privaten Haushalten, Kliniken, Industrie und fleischverarbeitenden Betrieben in die kommunalen Kläranlagen und sind eine wichtige Entstehungsquelle von resistenten und multiresistenten Bakterien. Daher werden Kläranlagen als ein Hot Spot für den Transfer von Resistenzgenen zwischen aquatischen Bakterien diskutiert (Abbildung 3). Antibiotika sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, da das Ausmaß ihres Einflusses auf die Verbreitung von humanpathogenen Mikroorganismen im Abwasser noch nicht vollständig geklärt ist. Dabei liegen die gefundenen Konzentrationen von Antibiotika im Abwasser deutlich unter denen, die vom medizinischen Bereich als minimale Wirkkonzentration (MHK) beschrieben sind (Hirsch, Ternes, Haberer, & Kratz, 1999; Michael et al., 2013). Dennoch beeinflussen sie in erster Linie sensitive Bakterien und selektieren möglicherweise resistente Mikroorganismen in wasserführenden Systemen. Untersuchungen mit subletalen Konzentrationen von Antibiotika haben gezeigt, dass diese z.B. Biofilmbildung induzieren, Mutationen hervorrufen sowie bakterielle Stressantworten in Bakterien, wie den Viable But Not Culturable (VBNC) Status, auslösen können. Alle diese Mechanismen können eine Erhöhung des MHK bewirken. Weiterhin können Antibiotikametabolite im picomolaren Bereich bereits nach kurzer Zeit Resistenzen induzieren, die unabhängig von der Muttersubstanz sind (Kohanski, DePristo, & Collins, 2010; Tettevin, Basuino, & Chambers, 2009).



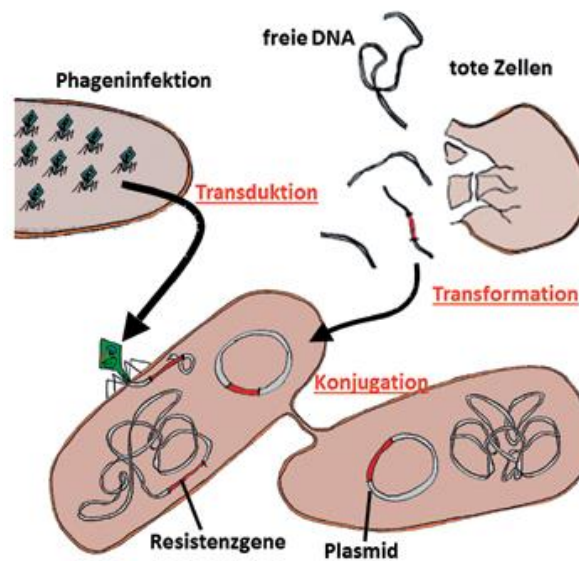
**Abbildung 3** Einfluss und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und opportunistischen Bakterien. Die Fragezeichen weisen auf noch ungeklärte Verbreitungspfade hin.

Die derzeitige Abwasserbehandlung ist auf die Reduktion von Feststoffen, organischen und chemischen Substanzen sowie Nährstoffen fokussiert, um den Vorfluter und nachfolgende Gewässer zu schonen und einen guten ökologischen Zustand zu bewahren. Für einige der hygienisch relevanten Keime ist im Belebtschlammbecken der biologischen Stufe aufgrund der vorherrschenden Bedingungen und zwischenartlicher Konkurrenz Endstation. Jedoch werden nicht alle Keime zurückgehalten und auch Antibiotikaresistenzgene werden nicht vollständig eliminiert. Jede Belebtschlammflocke gleicht einem Mikrokosmos mit Millionen verschiedener Bakterien. Hier erfolgt der Gentransfer von Antibiotikaresistenzen zwischen Bakterien im erhöhten Maße. Übertragbare Gene liegen häufig auf mobilen genetischen Elementen (Transposon, Integron, Plasmide), und werden unter erleichterten Bedingungen (z.B. hohe Zelldichte/Zelldiversität) weitergegeben bzw. ausgetauscht.

So erlangen Bakterien Resistenzgene, ohne dass sie selbst Kontakt mit einem Antibiotikum hatten. Diese Art der Übertragung kann über drei Mechanismen erfolgen (Abbildung 4).

- Bakterien können genetische Informationen durch Aufnahme von Fremd-DNA z.B. aus freigesetzter DNA toter Bakterien aufnehmen und in ihr Erbgut integrieren. Ein Vorgang, der als Transformation bezeichnet wird. Im Abwasser ist die freie DNA meist an Partikeln oder in Biofilmen gebunden und dadurch wesentlich stabiler und vor Abbau geschützt.

- Der zweite Mechanismus wird als Konjugation bezeichnet, bei dem ein Zell-Zell-Kontakt Voraussetzung ist. Hier werden genetische mobile Elemente über Zellstrukturen direkt zwischen den Bakterien weitergegeben. Auch hier ist die hohe Zelldichte und -diversität eine Voraussetzung, wie sie in Abwassersysteme oder Biofilmen vorzufinden sind.
- Die Transduktion ist der dritte Mechanismus, über den ein horizontaler Gentransfer möglich ist. Dabei spielen Phagen eine wesentliche Rolle, da sie Teile ihres Erbguts beim Befall in das Erbgut der Bakterienzellen integrieren. Letztlich funktioniert der Phage als Transportvehikel für Fremd-DNA und damit auch von Antibiotikaresistenzgenen.



**Abbildung 4** Mechanismen des horizontalen Gentransfers (RiSKWa-Statuspapier: Bewertungskonzepte der Mikrobiologie mit den Schwerpunkten neue Krankheitserreger und Antibiotikaresistenzen, 2015)

Neben den schon genannten Zelldichten und Zelldiversitäten begünstigen auch weitere Abwasser- und umweltspezifische Parameter wie z.B. die Anwesenheit von relevanten Magnesium-/Calciumionen, Nährstoffversorgung und hohen Phosphatkonzentration (vor allem im Klärschlamm) den horizontalen Gentransfer.

Das aufbereitete Abwasser kann somit zahlreiche Bakterien enthalten, die Resistenzgene erworben haben und über den Auslauf der Kläranlage die aquatische Umwelt erreichen. Das damit verbundene Risikopotential im Hinblick auf Vermehrung, Selektion und Gentransfer ist derzeit nicht näher charakterisiert. Dieses nicht näher charakterisierte Risikopotential ist auch für die Trinkwasseraufbereitung von Relevanz. Der Schutz von Rohwässern vor der Kontamination mit Krankheitserregern und bakteriellen Trägern von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen dient der allgemeinen Gesundheitsvorsorge. Zum jetzigen Zeitpunkt kann nicht abgeschätzt werden, von wem und unter welchen Bedingungen klinisch relevante

Antibiotikaresistenzen aus dem Rohwasser (im Rahmen des Aufbereitungsprozesses zum Trinkwasser) auch auf später im Trinkwasser vorhandenen Bakterien übertragen werden können.

Da die klassischen Kläranlagensysteme nicht dafür ausgelegt sind, um beispielsweise hygienisch relevante Bakterien oder Antibiotikaresistenzgene zu reduzieren, sind weiterführende technische und regulatorische Maßnahmen notwendig, um die Verbreitung dieser wichtigen mikrobiologisch relevanten Parameter zu verringern und einen nachhaltigen Umgang mit der Ressource Wasser zu gewährleisten. Weiterführende Abwasserbehandlungsmaßnahmen sind nötig, um die mikrobiologische Abwasserqualität zu verbessern. Derzeit werden vor allem oxidative Verfahren eingesetzt, um Spurenstoffe und einen Großteil der Bakterienfracht im Abwasser zu reduzieren. Da der Fokus dieser Prozesse in den vergangenen Jahren auf der Reduktion und Inaktivierung von chemischen Kontaminanten lag, sind Informationen über deren Einfluss auf die mikrobiologische Population, Antibiotikaresistenzgene oder Gentransferereignissen noch lückenhaft bzw. nur mit Referenzsystemen untersucht (Michael et al., 2013; Rizzo et al., 2013).

### **1.3.7 Oxidative Verfahren als mögliche weiterführenden Abwasserbehandlung**

Aufgrund der Erkenntnisse, dass die konventionellen Abwassertechnologien die Bakterienfracht zwar reduzieren, aber einen wesentlichen Anteil zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen beitragen, sind weitere technische Maßnahmen erforderlich, um die Ausbreitung kritischer mikrobiologischer Kontaminanten in aquatischen Systemen über Abwasserwege zu reduzieren. In den letzten Jahren wurden daher vor allem oxidative Verfahren diskutiert, deren Fokus vornehmlich auf der Eliminierung von Pharmazeutika und Mikroverunreinigungen liegt, aber zusätzlich auch zur Keimreduktion beitragen kann. Dieser Effekt entsteht bei Verfahren wie Photo-Fenton, TiO<sub>2</sub> oder Ozon durch die Generierung von hoch reaktiven Hydroxylradikalen, die vor allem mit ungesättigten Kohlenstoffverbindungen in Bakterien reagieren. Nachfolgend sind die verschiedenen Verfahren beschrieben.

#### **1.3.7.1 Das Ozonverfahren**

Ozon wird seit mehreren Jahren aufgrund seiner starken oxidierenden Wirkung erfolgreich zur Desinfektion (Viren) sowie zur Eliminierung von Pharmazeutika und anderer Mikroverunreinigungen im Trinkwasser eingesetzt (Ternes et al., 2002; Westerhoff et al., 2005). Durch den temperaturabhängigen raschen Zerfall des Ozonmoleküls in wässriger Umgebung entstehen zudem keine toxischen Rückstände, was ein Vorteil im Gegensatz zu chemischen

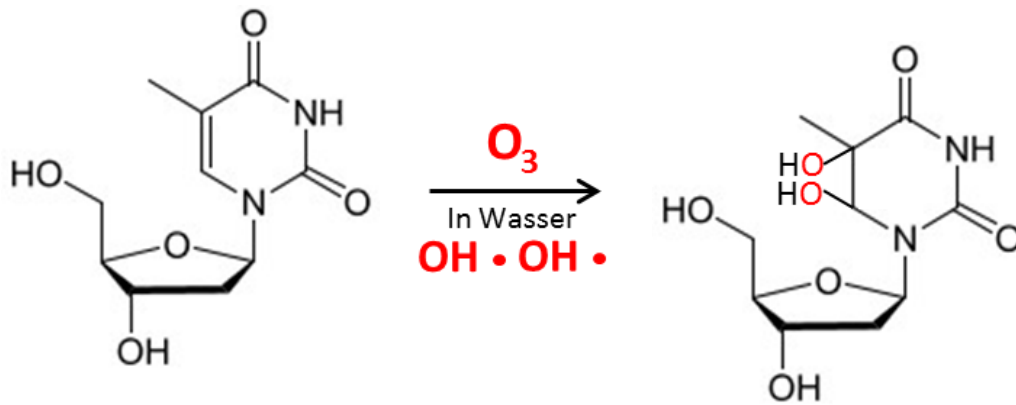
Desinfektionsmitteln ist. Die gesteigerte Effektivität der Ozonung beruht dabei auf dem höheren elektrochemischen Potential gegenüber anderen Oxidantien wie  $\text{Cl}_2/\text{HOCl}$ , oder  $\text{ClO}_2$  sowie einem verbesserten Dosis-Wirkungs-Koeffizienten (Tabelle 2; Hoff, 1986).

**Tabelle 2** Dosis-Wirkungs-Koeffizient für 99% Inaktivierung (mg pro min/L)

Organismus	Ozone (pH 6-7)	Chlor (pH 6 -7)	Chloramine (pH 8-9)	Chlordioxid (pH 6-7)
<i>E. coli</i>	0,02	0,034 - 0,05	95 - 180	0,4 - 0,75
Poliovirus 1	0,1 - 0,2	1,1 - 2,5	770 - 3.740	0,2 - 6,7
Rotavirus	0,006 - 0,06	0,01 - 0,05	3.806 - 6.480	0,2 - 2,1
<i>Giardia lamblia</i>	0,5 - 0,6	47 - 150+	-	-
<i>Giardia muris</i>	1,8 - 2,0	30 - 630	-	7,2 - 18,5

Neben der Oxidation von chemischen Verunreinigungen wird die Ozonung in der Trinkwasseraufbereitung vor allem zur Desinfektion von Viren, Bakterien und Protozoen eingesetzt (von Gunten, 2003). Die Effektivität der Ozonung beruht dabei auf der Reaktivität des Ozonmoleküls mit einer Vielzahl von chemischen Verbindungen direkt oder durch die Bildung von  $\text{HO}\cdot$  Radikalen.  $\text{HO}\cdot$  Radikale besitzen dabei ein höheres Oxidationspotential als das Ozon selbst und führen zu einer raschen Reaktion mit biologischen Molekülen, was ausschlaggebend für den Zelltod sein soll. Die Desinfektionswirkung der in der Trinkwasseraufbereitung genutzte Ozonung beruht dabei auf der Zerstörung der äußeren Zellkompartimente (Zellwand und Membran), gefolgt vom Ausströmen innerer Zellbestandteile, der Reaktion mit den aromatischen Strukturen der DNA und Stickstoff-Kohlenstoff-Bindungen von Proteinen (Depolymerisierung). Vor allem die Inaktivierung von DNA-Molekülen ist dabei ein wichtiger Schritt, um die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen zu minimieren.

Untersuchungen über die Reaktivität von DNA-Molekülen mit Ozon haben gezeigt, dass nur 43% der Nukleotide oxidiert sein müssen, um die Struktur der DNA-Doppelhelix zu depolymerisieren (Cataldo, 2006). Dabei ist die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber Ozon abhängig von der Art des jeweiligen Nukleotids. Von allen vier DNA-Nukleotiden weist Thymin die höchste Reaktivität gegenüber Ozon auf (Abbildung 5, Geschwindigkeitskonstante  $4,2 \times 10^4$  L pro Mol und Sekunde), gefolgt von Guanin mit  $1,6 \times 10^4$  L pro Mol und Sekunde. Im Vergleich dazu besitzen Cytosin und Adenin nur  $1/10$  bzw.  $1/1000$  der Reaktivität von Thymin und Guanin gegenüber Ozon (Tabelle 3). Aufgrund der Basenpaarung (AT und GC) ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zur vollständigen Inaktivierung der DNA-Doppelhelix der Anteil an Guanin, da zu diesem Zeitpunkt Thymin schon vollständig oxidiert ist.



**Abbildung 5** Schematische Darstellung der Inaktivierung von Bakterien durch DNA-Schäden hervorgerufen durch Ozon. Beispielhaft dargestellt am Thymin (ohne Phosphat-Rest), ein Grundbausteine der DNA.

**Tabelle 3** Geschwindigkeitskonstante verschiedener Nukleinsäure-Basen und verwandten Substanzen mit Ozon ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) bei unterschiedlicher Protonierung (Flyunt, 2007)

Substrat	pKs Wert	protoniert	neutral	deprotoniert
Thymin	9,9; >12	-	$4,2 \times 10^4$	$\sim 3 \times 10^6$
Thymidin	9,8	-	$3,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$
5'-dTMP	10	-	$1,6 \times 10^4$	
1,3-Dimethyl-Uracil	-	-	$2,8 \times 10^3$	-
Uracil	9,5; >13	-	650	$9,2 \times 10^5$
6-Methyl-Uracil	9,8	-	140	$6,0 \times 10^5$
5-Chloro-Uracil	8	-	$4,3 \times 10^3$	$1,3 \times 10^6$
Orotsäure	2,1; 9,45	-	$5,9 \times 10^3$	n. u.
Iso-Orotsäure	4,2; 8,9	-	$3,7 \times 10^3$	n. u.
Cytosin	4,6; 12,2	18	$1,4 \times 10^3$	$1,5 \times 10^6$
2'-Deoxycytidin	4,3	44	$3,5 \times 10^3$	-
Cytidin	4,15	40	$3,5 \times 10^3$	-
5'-dCMP	4,6		$1,4 \times 10^3$	
Adenin	4,15; 9,8	5	12	$1,3 \times 10^5$
2'-Deoxyadenosin	3,8	5	14	
AdenosinGMP	2,9; 9,7		$5 \times 10^4$	
DNA		-	410	-

Bisherige Untersuchungen zur mikrobiologischen Inaktivierung wurden mit Referenzbakterien wie *E. coli* durchgeführt. Dort beobachtete man einen Rückgang der *E. coli* Keimzahl nach Ozonbehandlung von mehreren Zehnerpotenzen (Zhuang et al., 2014; Dodd, 2012). Die Effizienz



der Desinfektionswirkung durch die Ozonbehandlung ist abhängig von der Kontaktzeit, Ozondosis und der individuellen Physiologie bzw. Metabolismus des Bakteriums. Die Ozonung sollte nach Möglichkeit mit konventionell geklärtem Abwasser gefahren werden, da die Konzentration an gelösten Feststoffen im Abwasser Einfluss auf die benötigte Ozondosis hat. Die schnelle Wirkung des Ozons hat einen Nachteil, denn bei mikrobiellen Aggregaten führt die kurze Reaktionszeit und der rasche Zerfall des Ozons zu einer drastisch reduzierten Wirkung (shielding) und geringen Nachhaltigkeit der Behandlung (Zimmermann et al., 2011). Vor allem Biofilme zeigen sich als äußerst robust gegenüber Desinfektionsmitteln und stellen ein Problem in vielen wasserführenden Prozessen dar (Ford, 1999).

Neben der mikrobiologischen Inaktivierung und Elimination chemischer Kontaminanten beeinflusst die Ozonung aber auch die Enzymaktivität von frei im Wasser vorkommenden, natürlichen Nukleasen. Diese Enzyme, auch Hydrolasen genannt, spalten das Zuckerphosphatgerüst der DNA. Dieser Vorgang reduziert die freigesetzten, im Wasser vorkommenden DNA-Moleküle und ist ein willkommener Effekt, um freigesetzte funktionale Gene wie Antibiotikaresistenzen oder mobile genetische Elemente zu inaktivieren (Rieder et al., 2008).

Neben der Anwendung in der Trinkwasseraufbereitung wurden Untersuchungen zur Ozonbehandlung von Kläranlagenausläufen bisher nur auf Basis chemischer Parameter durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben gezeigt, dass es zu keiner vollständigen Mineralisierung von chemischen Kontaminanten kommt, jedoch werden Transformationsprodukte generiert, deren biologische Aktivität weitaus geringer war, als die der Muttersubstanz (Dodd et al., 2009; Huber et al., 2004; Lee et al., 2008). Neben Transformationsprodukten können aber auch andere unerwünschte Produkte entstehen, wie beispielsweise Bromat, ein potentiell krebserregender Stoff, der während der Ozonung von bromidhaltigen Wasser generiert wird (von Gunten, 2003). Neben Bromat können auch andere toxische Transformationsprodukte entstehen, wie Aldehyde, Ketone und andere sauerstoffreiche Verbindungen, die jedoch durch eine Kombination aus Ozonung und anschließendem Sandfilter entfernt werden können (Hammes et al., 2006). Neben toxischen Transformationsprodukten ist die Überführung des im Abwasser befindlichen gelösten Kohlenstoffs (DOC) in assimilierbaren organischen Kohlenstoff (AOC) wichtig für die anschließende Wasserqualität des Gewässers (Hammes et al., 2006; von Gunten, 2003). Eine Erhöhung des AOC hat Auswirkung auf die biologische Stabilität eines Gewässers und führt zu einem gesteigerten Wiederverkeimungspotential.

### **1.3.7.2 Das Photo-Fenton Verfahren**

Ein weiteres oxidatives Abwasserbehandlungsverfahren zur Reduzierung von chemischen und mikrobiologischen Verunreinigungen ist die Photo-Fenton-Behandlung. Durch einen photokatalytischen Prozess wird  $\text{Fe}^{2+}$  in Verbindung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert. Dabei werden unter anderem hoch reaktive Hydroxylradikale generiert, die bevorzugt mit Kohlenstoffdoppelbindungen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen reagieren. Die katalytische Regeneration von  $\text{Fe}^{2+}$  muss während der Photo-Fenton Reaktion kontinuierlichen aufrechterhalten werden. Die generierten reaktiven Sauerstoffspezies reagieren zuerst mit der bakteriellen Zellmembran und können zum Verlust des selektiven Stofftransports durch die Bakterienmembran führen (Ortega-Gómez et al., 2012).

Auch Prozesskombinationen von Photo-Fenton mit anderen reaktiven Sauerstoffspezies, wie  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oder Kombinationen mit UV-A wurden untersucht und zeigten Inaktivierungsraten von *Enterococcus faecalis* um 2,5 Zehnerpotenzen. Eine Kombination aus  $\text{H}_2\text{O}_2$ , UV-A und Photo-Fenton Behandlung führte nach 80 Minuten zu Inaktivierungsraten von fast 5 Zehnerpotenzen (Ortega-Gomez 2012).

Weitere Studien zur Inaktivierung von Bakterien belegten die totale Inaktivierung von *E. coli* K12 durch Photo-Fenton nach 60 Minuten (Rincon und Pulgarin 2006). Untersuchungen zu antibiotikaresistenten *E. faecalis* zeigten ebenfalls eine starke Reduktion, jedoch gab es Unterschiede im Resistenzmuster nach der Behandlung gegenüber dem Zulauf des Photo-Fenton-Systems. So wurde im Auslauf des Systems Ofloxacin-resistenter *E. faecalis* wesentlich häufiger detektiert als Trimethoprim-resistenter *E. faecalis* (Michael et al., 2012).

### **1.3.7.3 Die $\text{TiO}_2$ -Photokatalyse**

Die heterogene  $\text{TiO}_2$ -Photokatalyse ist eine weitere technische Maßnahme zur Wasser- und Abwasserbehandlung. Dabei werden mit Hilfe eines Halbleiters und ultravioletter Strahlung in wässriger Umgebung freie Elektronen generiert, die mit Bestandteilen der Abwassermatrix reagieren. Dadurch wird eine Elektronenlücke generiert, welche über Redoxreaktionen zur Bildung von Hydroxyl- und Sauerstoffradikalen aus Wasser und gelöstem Sauerstoff führt (Kondrakov et al., 2016).

Kultivierungsexperimente zum Effekt von  $\text{TiO}_2$ -Photokatalyse in Kombination mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf multiresistenten *E. coli* aus biologisch gereinigtem Abwasser ergaben unterschiedliche Inaktivierungsraten basierend auf dem jeweiligen Resistenzmuster. So erwiesen sich Ciprofloxacin- und Cefuroxim-resistente *E. coli* als anfällig gegenüber  $\text{TiO}_2$ -Photokatalyse. Im

Gegensatz dazu zeigten Vancomycin- bzw. Tetracyclin-resistente *E. coli* eine deutlich reduzierte Anfälligkeit (Fiorentino et al., 2015).

### **1.3.8 Stressantworten von Bakterien auf oxidative Verfahren**

Oxidative Verfahren zeichnen sich durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies aus. Diesen Spezies gemein ist ihre Reaktivität gegenüber ungesättigten Verbindungen, wie sie in Zellmembranen (Glykolipide), Proteinen (Aminosäuren) oder in der DNA (Nukleotide) vorkommen. Aufgrund der entstehenden oxidativen Schäden an diesen unterschiedlichen Zellkompartimenten sind bakterielle Stressantworten mannigfaltig. Angefangen bei Reparaturenzymen wie beispielsweise Glutathion-S-Transferasen, die eine bestehende oxidative Schädigung durch Bildung von Konjugaten oder als Antioxidans beheben bzw. verhindern (Peters et al., 2014). Eine gesteigerte Expression von Superoxiddismutasen und Katalasen führen zu einem verstärkten Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies bevor letale Schäden entstehen können (Dourado et al., 2015). Eine spezifische bakterielle Antwort auf oxidative Schäden an der DNA, die Replikationsstörungen oder Strangbrüche verursacht, ist die *recA*-vermittelte Enzymkaskade. Ein Teil dieser Kaskade besteht aus der homologen Rekombination, um geschädigte DNA Abschnitte zu ersetzen und zu reparieren (Händel et al., 2015). Die benötigten DNA-Abschnitte können unter anderem durch die Aufnahme von extrazellulärer DNA aus anderen Bakterien erlangt werden. Untersuchungen zur *recA* Gen-Expression und induzierten subletalen DNA-Schäden durch diverse chemische sowie physikalische Verfahren wies auf eine Korrelation zwischen *recA* und horizontalem Gentransfer hin (Fall et al., 2007).

Stressantworten sind ebenfalls abhängig von der untersuchten Bakterienspezies. Untersuchungen zu unterschiedlichen Regenerationspotentialen nach subletalen DNA-Schäden wiesen auf eine konstitutive Expression von *recA* in *E. faecium* hin oder stimulierten den Übergang zum VBNC Stadium (lebend, aber nicht mehr kultivierbar; Jungfer, Schwartz, & Obst, 2007). Dieser Effekt ist besonders wichtig, da diese Bakterien dadurch über standardisierte Kulturverfahren nicht mehr detektiert werden können.

Neben diesen genetischen Stressantworten auf oxidative Schäden in Einzelzellen müssen auch Stressantworten von Bakterien in Biofilmen berücksichtigt werden, die eine deutlich höhere Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln aufweisen (Hota et al., 2009). Weiterhin ist bekannt, dass Bakterien in Biofilmen von einer erhöhten Nährstoff Verfügbarkeit profitieren und unter diesen Bedingungen ein erhöhtes Regenerations- und Proliferationspotential besitzen (Venkatesan, Perumal, & Doble, 2015).

### 1.3.9 Wissenslücken und Forschungsbedarf

Beim Nachweis von hygienisch relevanten Bakterien kommen derzeit häufig kulturbasierte Nachweismethoden zum Einsatz. Das liegt einerseits daran, dass moderne kulturunabhängige Methoden noch relativ neu sind, und zum anderen daran, dass relevante Regelwerke und Normen (z.B. TrinkwV, Badegewässerrichtlinie) mit ihren Richt- und Grenzwerten auf kulturellen Methoden beruhen. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Bakterien unter Stressbedingungen in der Lage sind, in den sogenannten VBNC-Zustand überzugehen, so dass sie bei den vorgeschriebenen Keimzählungen nicht erfasst werden können (Gruzdev, Pinto, & Sela Saldinger, 2012). Diese Bakterien lassen sich jedoch mit molekularbiologischen Methoden wie z.B. qPCR erfassen. Mit PMA- oder EMA-qPCR kann zudem unterschieden werden, ob es sich dabei um physiologisch intakte oder um geschädigte Bakterien (zellwandpermeabel) sowie freie DNA-Fragmente handelt (Bae and Wuertz, 2009). Zusätzlich zur Kultur erhält man mit diesen Methoden einen oft zahlenmäßig höheren Nachweis durch die Erfassung von nicht-kultivierbaren, aber lebenden Bakterien. Derzeit ist eine hygienische Bewertung dieser Befunde aber nicht zuverlässig möglich, da Kenntnisse zur Infektiosität dieser VBNC-Stadien oder gar Dosis-Wirkung-Beziehungen für die jeweiligen Bakterienarten fehlen. Zudem ist nicht vollständig bekannt, unter welchen Bedingungen ein Wechsel vom kultivierbaren in den nichtkultivierbaren Zustand oder umgekehrt erfolgt. Der Einsatz molekularbiologischer kultivierungsunabhängiger Methoden hat dennoch den Vorteil, dass: (1) die Ergebnisse teilweise deutlich schneller vorliegen und (2) die nichtkultivierbaren, aber dennoch relevanten Bakterien erfasst werden können.

Im Gegensatz zu höheren Lebewesen können Mikroorganismen Teile ihres genetischen Materials über HGT austauschen (Smalla, 2003). Die dadurch mögliche Resistenzübertragung kann über Konjugation, Transduktion oder Transformation erfolgen (siehe Kapitel 1.3.6, Abbildung 4). Der HGT ist für die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen besonders wichtig, da ein Austausch zwischen pathogenen und nichtpathogenen Organismen und vice versa erfolgen kann (Rieder et al., 2008). Generell ist das Risiko des Resistenzgentransfers schwer zu quantifizieren, weil nur wenige Daten zum Gentransfer in natürlichen Habitaten existieren. Es gibt einige wenige Studien zur Übertragungshäufigkeit von Antibiotikaresistenzgenen (Hunter, Wilkinson, Catling, & Barker, 2008). Aktuelle Erkenntnisse zeigen, dass Bakteriophagen sowohl als Reservoir für Antibiotikaresistenzgene dienen können, als auch eine wichtige Rolle bei deren Mobilisierung spielen (Utter et al., 2014). Um gezielt eine Reduktion der Ausbreitung von klinisch relevanten und antibiotikaresistenten Bakterien und deren Resistenzgenen zu kontrollieren und Ausbreitungswege zu überwachen, müssen molekularbiologische Nachweisverfahren für den Umweltbereich definiert werden (Berendonk et al., 2015).

Eine Ergänzung zu den konventionellen PCR und qPCR Untersuchungen stellt die Anwendung von „Next Generation Sequencing“-Technologien dar. Mit Hilfe dieser neuen Technologie ist es möglich, erweiterte Genomdatenbanken zu erstellen, um den Einfluss auf die Evolution und den Transfer von Antibiotikaresistenzen zu untersuchen. Hierbei können auch gezielt mobile genetische Resistenzelemente (z.B. Integrons, Transposons, Plasmide) betrachtet werden, um deren Verteilung und Einfluss auf die Resistenzentwicklung und Ausbreitung zu beschreiben (Schwartz et al., 2015). Weiterhin sollten Antibiotikaresistenzdeterminanten in kritischen wasserführenden Systemen wie Abwasser, Oberflächenwasser und Rohwasser gezielt untersucht werden, um mögliche Kontaminationsquellen für Trinkwasser zu identifizieren und um den Austausch genetischer Informationen von Pathogenen über Umweltbakterien, als Transfervehikel für Resistenz- und Virulenzfaktoren, zu erkennen.

Die aquatische Umwelt spielt zweifelsohne bei der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen eine wichtige Rolle. Dies bezieht sich auch auf die Entstehung von neuen klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen in der Umwelt. Daten belegen, dass der Ursprung von klinisch relevanten Resistenzgenen auch in der Umwelt und nicht nur im klinischen Bereich zu finden ist (Jacoby, 2009). Diese Erkenntnisse zeigen den Zusammenhang von Evolution und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in Kliniken und urbanen Umwelthabitaten. Für den Umweltbereich liegen jedoch bislang keine umfassenden Daten vor, die es erlauben würden, eine Bewertung eines bestehenden Risikos durch Antibiotikaresistenzen vorzunehmen.

## 2 Untersuchungsgebiete und Methoden

### 2.1 Beschreibung der aquatischen Habitate in der Modellregion

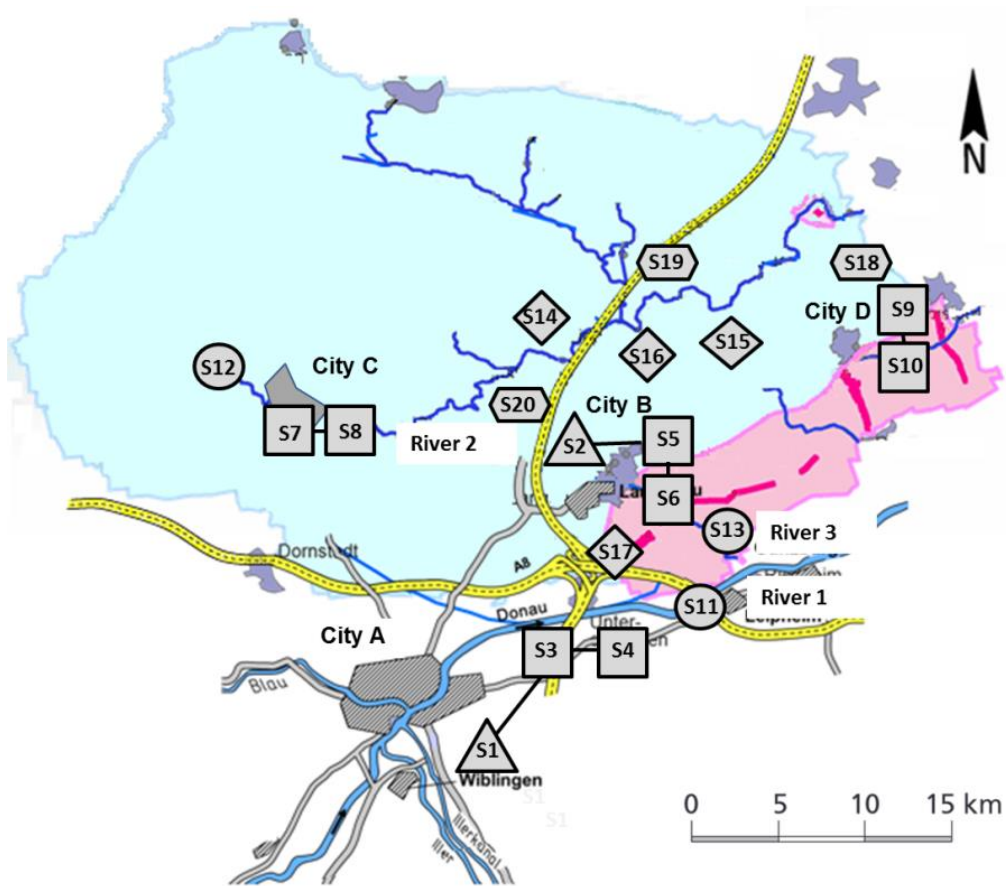
#### Donauried

Das Donauried ist hydrogeologisch geprägt durch einen stark verkarsteten Untergrund und einer daraus resultierenden hohen Fließgeschwindigkeit des Grundwassers. Dadurch besteht ein erhöhtes Risiko der Verbreitung von Mikroorganismen oder chemischen Schadstoffen, da eine verringerte Retentionszeit des Grundwassers auch die Selbstreinigung reduziert (Pronk, Goldscheider, Zopfi, & Zwahlen, 2009). Deshalb wurden mehrere Wasserschutzzonen (WSG Schutzzone I bis III) mit einer Fläche von insgesamt 517 km<sup>2</sup> (davon 52 km<sup>2</sup> Trinkwasser-Fassungszone) eingerichtet. Das Wasserschutzbereich „Donauried-Hürbe“ zählt damit zu einem der wichtigsten Trinkwasserspeicher für Baden-Württemberg. Eine Auswahl verschiedener Grund- und Oberflächenwässer, Abwässer und Regenüberlaufbecken (Mischwassersystem) geben einen Überblick über die Belastungssituation in Bezug auf ausgewählte opportunistische Bakterien und klinisch relevanter Antibiotikaresistenzen innerhalb des Donaurieds. Der Fokus lag dabei auf Wässern, die sowohl untereinander einen direkten Einfluss haben, als auch auf unabhängigen sich nicht direkt beeinflussenden Wassersystemen.

Über einen Zeitraum von 2 Jahren wurden 20 Probenahmestellen mikro- und molekularbiologisch auf klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene und opportunistische Bakterien untersucht, um mögliche Kontaminationspfade und Belastungssituationen zu identifizieren. Dafür wurden 24 h-Kompositenproben der Zu- und Abläufe von Kläranlagen, sowie Stichproben von Klinikabwässern, Regenüberlaufbecken, Vorflutern und Grundwässer gesammelt und untersucht. Klinikabwasser wurde vom nächstgelegenen städtischen Zugang zur Kanalisation genommen (Tabelle 4, Abbildung 6). Klinikum 1 (S1) besitzt 1.000 Betten und ist in einen Komplex zusammen mit einem Altersheim und einem Militärhospital organisiert. Die städtische Kläranlage reinigt Abwasser von 445.000 Einwohnern aus der Region (S3in und S3out) und ist ausgerüstet mit einer 3-stufigen Klärung. Die zweite untersuchte Kläranlage (S5in und S6out) reinigt Abwasser von ca. 16.600 Einwohnern sowie von einem kleineren Krankenhaus mit 80 Betten (S2). Zwei weitere Kläranlagen mit einem Ausbau für jeweils 16.000 (S7in und S8out) und 2.500 (S9in und S10out) Einwohnerwerten mit vornehmlich ländlichem/kommunalen Einfluss wurden ebenfalls über den gesamten Zeitraum untersucht.

**Tabelle 4** Übersicht der untersuchten Messstellen im Donauried

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Art der Probenahme</b>	
<b>Klinikabwasser</b>		
S1 Klinik Ulm	Stichprobe	
S2 Klinik Langenau		
<b>Kläranlagen</b>		
S3 (Kläranlage 1, Zulauf)	24 h-Kompositenprobe	
S4 (Kläranlage 1, Ablauf)		
S5 (Kläranlage 2, Zulauf)		
S6 (Kläranlage 2, Ablauf)		
S7 (Kläranlage 3, Zulauf)		
S8 (Kläranlage 3, Ablauf)		
S9 (Kläranlage 3, Zulauf)		
S10 (Kläranlage 4, Ablauf)		
<b>Oberflächenwasser</b>		
S11 (Donau)		Stichproben
S12 (Lone)		
S13 (Nau)		
<b>Regenüberlaufbecken</b>		
S14 (ROB1)	Stichproben	
S15 (ROB2)		
S16 (ROB3)		
S17 (ROB4)		
<b>Grundwasser</b>		
S18 (GW1, 7721)	Stichproben	
S19 (GW2, 7106)		
S20 (GW3, 7103)		



**Abbildung 6** Geografische Lage der untersuchten Messstellen im Donauried. Dreiecke entsprechen Klinikabwässer, Rechtecke entsprechen Kläranlagen Zu- und Abläufe, Kreise entsprechen Oberflächengewässern, Rauten stellen Regenüberlaufbecken und Hexagone Grundwassermessstellen dar (aus Alexander et al., 2015).

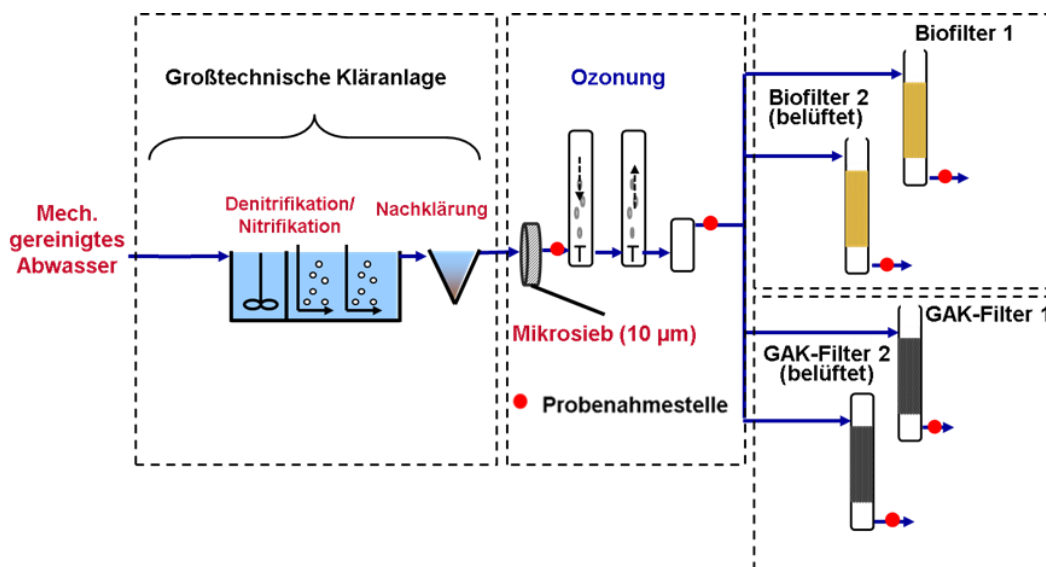
Probennahmestelle S11, S12 und S13 sind Oberflächengewässer, wobei S11 einer Messstelle an der Donau, nahe Leipheim (nordöstlich von Ulm) entspricht. S12 und S13 sind kleinere Flüsse, die in die Donau münden. Des Weiteren wurden vier Regenüberlaufbecken (S14, S15, S16, S17) untersucht, um den Einfluss von Abschwemmungen aus der umliegenden Landwirtschaft oder den Wohngebieten auf die Bakterien- und Antibiotikaresistenzlage zu überprüfen. Die untersuchten Grundwassermessstellen (S18 und S19) liegen in der Nähe von 2 Deponien. Hier sollte der Einfluss von Sickerwasser aus einer angrenzenden aktiven und einer oberflächlich versiegelten Deponie untersucht werden. Mit Grundwassermessstelle S20 wurde zusätzlich überprüft, ob im Sommer eine bakterielle Kontamination durch Versickerung des Gewässers S12 vorliegt.



## 2.2 Beschreibung der Ozon-Pilotanlage an der Kläranlage Südhessen

Über einen Zeitraum von 2 Jahren wurden alle 2 Wochen jeweils eine 24 h-Mischprobe aus Zu- und Ablauf der installierten Ozonanlage auf die Abundanz von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen und opportunistische Bakterien untersucht. Die Aufarbeitung und DNA-Extraktion erfolgten umgehend nach Erhalt der Wasserproben am gleichen Tag. Eine Reihe prozessrelevanter Probenahmestellen wurden ausgewählt, um den Effekt der Ozon Behandlung auf die Abundanz der Antibiotikaresistenzgene und opportunistischen Bakterien zu untersuchen (Abbildung 7).

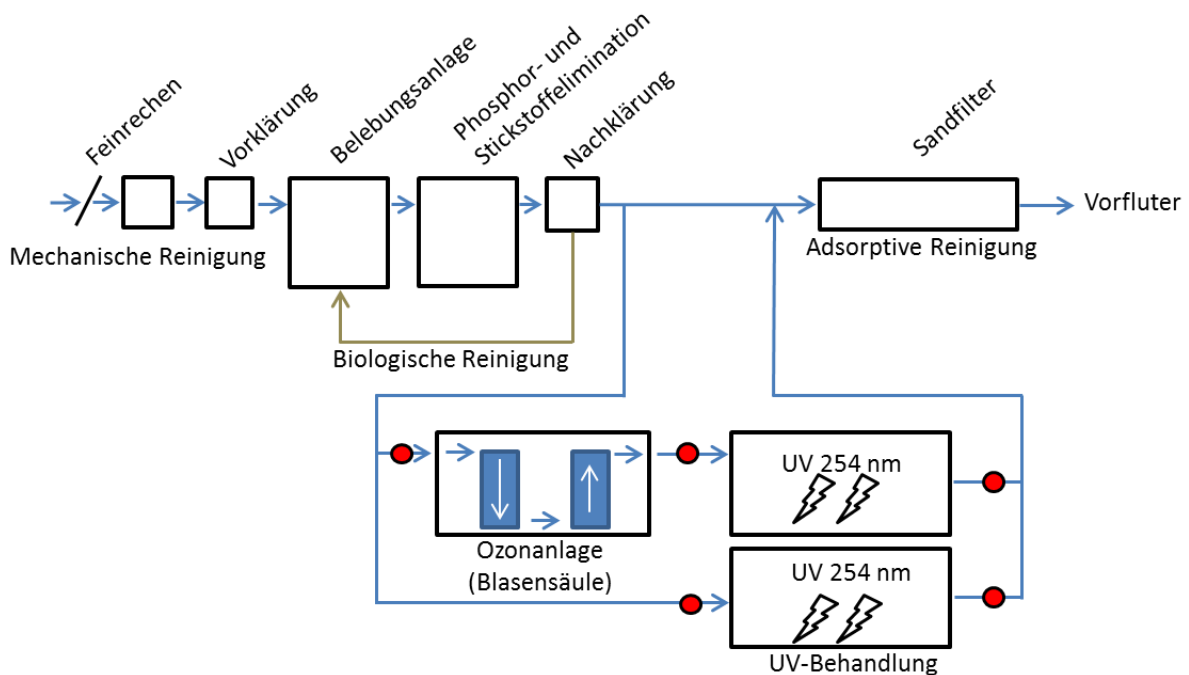
Das verwendete Ozonsystem wurde zur Behandlung eines Teilstroms des konventionell gereinigten Abwassers der Kläranlage Südhessen genutzt. Die Kläranlage Südhessen behandelt Abwasser von 43.000 Einwohnern, dies entspricht einer Durchschnittswassermenge von 6.400 m<sup>3</sup> pro Tag. Ein Mikrofilter (Porengröße 10 µm) wurde im Zulauf der Ozonanlage installiert, um größere partikuläre Feststoffe zurück zu halten. Das Ozonsystem A (WEDECO, Typ GSO) besteht aus 2 Blasensäulen, die im Paralleldurchfluss betrieben wurden. Ozon wurde in umgekehrter Strömungsrichtung über einen Keramikdiffusor in die erste Blasensäule eingeblasen. Die zweite Blasensäule wurde dabei als Reaktionsraum genutzt. Die hydraulische Verweilzeit betrug 18 ± 2 Minuten, abhängig von der Durchflussrate. Die Ozondosis wurde abhängig vom aktuellen gelösten organischen Kohlenstoff (DOC, Durchschnitt 10,0 ± 2,3 mg pro L) eingestellt, um die Zehrung des Ozons relativ zur Biomasse zu berücksichtigen und betrug 0,85 ± 0,15 g O<sub>3</sub> pro g DOC. Der Ozonzulauf wurde direkt nach dem Mikrofilter beprobt, um die mikrobiologische Ausgangssituation zu definieren.



**Abbildung 7** Das Behandlungssystem am Klärwerk Südhessen bestehend aus konventioneller Belebungsanlage (43.000 EW) mit anschließender Mikrosiebung, Ozonung im Pilotmaßstab, sowie Aktivkohle- und Biofiltration im halbertechnischen Maßstab. Probenahmestellen sind rot markiert

### 2.3 Beschreibung der Ozon-Pilotanlage mit nachgeschalteter UV-Anlage am Großklärwerk Neu Ulm-Steinhäule

Zum Abgleich der Ergebnisse aus der Ozon-Pilotanlage an der Kläranlage Südhessen wurde der Einfluss von zusätzlichen Verfahrenskombinationen und Parametern auf die Abundanz von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien am Großklärwerk Neu Ulm-Steinhäule untersucht, mit dem Ziel eine Verbesserung der mikrobiologischen Abwasserqualität zu erreichen. Die einzelne Versuchsreihe wurde mit konventionell gereinigtem Abwasser durchgeführt. Hierzu wurde eine Ozon-Pilotanlage auf der Groß-Kläranlage Neu Ulm-Steinhäule installiert (445.000 EW, 40 Millionen m<sup>3</sup> Abwasser pro Jahr). Die anschließende UV-Behandlung wurde mit Hilfe von CBD-Versuchen (CBD = Colimated Beam Device) durchgeführt, die aus der Trinkwasseranwendung bekannt sind. Diese Vorgehensweise ermöglichte es, dass mit relativ geringen und flexiblen Aufwand die notwendigen UV-Dosiswerte reproduzierbar ermittelt werden konnten. Das für die Aufarbeitung und DNA Extraktion erforderliche Labor wurde vom Klärwerk Neu Ulm-Steinhäule zur Verfügung gestellt, so dass die Probenbearbeitung am selben Tag erfolgen konnte. Im Fokus der Untersuchungen standen Ozondosen von 0,7, 1,0 und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC, bei einer hydraulischen Verweilzeit von 15 ± 2 min, UV-Intensitäten von 100, 200 und 300 J pro m<sup>2</sup> sowie verschiedene Kombinationen beider Verfahren (Abbildung 8).



**Abbildung 8** Das Behandlungssystem am Klärwerk Neu Ulm-Steinhäule bestehend aus mechanischer, konventioneller und adsorptiver Reinigung. Der Ablauf der biologischen Reinigung wurde für die Behandlung der weiterführenden Abwasserbehandlungsmaßnahmen verwendet. Probenahmestellen sind rot markiert.

## 2.4 Aufarbeitung der Wasser- und Abwasserproben

Wasserproben aus den Untersuchungsgebieten wurden in sterilen Glasflaschen als 24 h Kompositen- und Stichproben gesammelt und bei 4 °C im Dunkeln bis zur DNA-Extraktion aufbewahrt. Die DNA-Extraktion erfolgte innerhalb von 24 h nach der Probennahme. Abhängig vom Trübungsgrad der Wasserproben wurden diese entweder durch eine Polycarbonat Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm gefiltert (Whatman, Maidstone, England) oder durch Zentrifugation die Biomasse konzentriert.

Bis zu 6 L Grundwasser und 500 mL von Oberflächenwassern/ Regenüberlaufbecken wurden filtriert, um adäquate Mengen an Mikroorganismen bzw. DNA zu gewinnen. Für die DNA-Extraktion wurde das FastDNA Spin kit for soil (MP Biomedical, Illkrich, France) unter Verwendung der Lysingmatrix E und gemäß den Protokollvorgaben für Abwasser aber mit abschließender 2-facher Elution mit 50 µL sterilem Wasser verwendet. Für ungeklärtes sowie konventionell gereinigtes Abwasser und Krankenhausabwasser reichten 200 mL aus. Die durch Zentrifugation erhaltenen Mikroorganismen wurden nach dem Dekantieren des Überstandes erneut mit Abwasser resuspendiert. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt bis zum Erreichen der gewünschten Stärke. Die Pellets von ungeklärtem Abwasser sowie Klinikabwasser wurde mit 40 mg Polyvinylpyrrolidon (Sigma, Munich, Germany) in 1,6 mL ASL Stool Lysis Puffer (Bestandteil des Extraktionskits) resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend für 10 min bei 95 °C inkubiert und der Überstand mit einer PCR Inhibitor-Absorbent-Matrix (Inhibit-ex, QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) versehen. Für die anschließende DNA-Extraktion wurde das QiaAmp Mini Kit (Qiagen) und Arbeitsschritte entsprechend dem Protokoll durchgeführt. Für eine bessere DNA Ausbeute wurde auch hier das Elutionsvolumen auf 50 µL reduziert, aber ein weiteres Mal wiederholt. DNA Konzentration und Reinheit wurde spektrophotometrisch gemessen (NanoDrop ND-1000, Peqlab Biotechnology, Erlangen, Germany).

## 2.5 Ausgewählte mikrobiologische Parameter: opportunistische Bakterien

Die mikrobiologischen Parameter wurden aufgrund ihrer aktuellen Relevanz als Infektionserreger im Klinikbereich ausgewählt (Kapitel 1.3.1, Tabelle 1). Eine Liste der verwendeten Primersysteme zur Detektion und Quantifizierung dieser relevanten Parameter ist in Tabelle 5 dargestellt. Einer dieser mikrobiologischen Parameter ist *P. aeruginosa*, ein opportunistisches Bakterium, das häufig in aquatischen Habitaten gefunden wird. *P. aeruginosa* gehört zu den häufigsten nosokomialen Infektionserregern auf Intensivstationen (Obritsch, Fish,

Maclaren, & Jung, 2004). Daher wurde ein Primersystem verwendet, das das *P. aeruginosa* spezifische Gen für den Sigma-70 Faktor detektiert (*ecfX*). Dieses Primersystem weist eine höhere Spezifität auf, als die gängigen Primersysteme, die das 23S-Gen detektieren (Clifford et al., 2012).

**Tabelle 5** Primersysteme zur Detektion opportunistischer Bakterien

Mikroorganismus	Gen	Name	Sequenz
Enterococci	23S rDNA	ECST784F	AGAAATTCCAAACGAACTTG
		ENC854R	CAGTGCTCTACCTCCATCATT
Staphylococci	<i>mecA</i>	mecA1FP	CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTAA
		mecA1RP	TGGTCTTTCTGCATTCTGGA
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>ampC</i>	Lak2FP	GGGAATGCTGGATGCACAA
		Lak1RP	CATGACCCAGTTCGCCATATC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ecfX</i>	ecfXRT-F	AGCGTTCGTCCTGCACAAGT
		ecfXRT-R	TCCACCATGCTCAGGGAGAT

*Staphylococcus aureus* und Koagulase-negative Staphylokokken (CNS) gehören zu den am häufigsten aus hospitalisierten Patienten isolierten Pathogenen. Vor allem Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) -Infektionen besitzen eine erhöhte Sterblichkeitsrate unter Patienten im Vergleich zu anderen nosokomialen Infektionen, da sie häufig auch gegen eine Vielzahl anderer Antibiotika resistent sind (Naber, 2009). Die Detektion von MRSA und CNS wurde durch das chromosomale *mecA* Gen ermittelt (Volkman et al., 2004).

Enterokokken dienen als Indikatoren für eine fäkale Kontamination in wasserführenden Systemen und laut dem *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) sind Enterokokken die häufigste Ursache für Blutbahninfektionen auf Intensivstationen (Suetens et al., 2012). Zusätzlich sind Enterokokken dafür bekannt, eine Vielzahl an Antibiotikaresistenzen zu tragen, was die Behandlung in immungeschwächten Patienten erheblich verschlechtert. Daher wurde ein Primersystem verwendet, das das speziesspezifische 23S-Gen von Enterokokken (*E. faecium/faecalis/casseliflavus*) detektiert (Volkman et al., 2004).

Eine Vielzahl an Enterobakterien, vor allem *Klebsiella pneumoniae*, sind ein wachsendes Problem in Einrichtungen der Gesundheitspflege. Als beta-Lactam Antibiotikaresistenz wurde das Ampicillinresistenzgen *ampC* aufgrund seiner Sequenzhomologie in diversen Enterobakterien wie beispielsweise *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* und *Klebsiella pneumoniae* ausgewählt (Schwartz et al., 2003). Studien zeigten, dass das intrinsische *ampC* Resistenzgen aus *Enterobacteriaceae* auch auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert ist und

damit die Fähigkeit zur horizontalen Übertragung besitzt (Amador, Fernandes, Prudêncio, Barreto, & Duarte, 2015; Philippon, Arlet, & Jacoby, 2002).

## 2.6 Ausgewählte mikrobiologische Parameter: klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene

Vancomycin ist ein Reserveantibiotikum. Seine Verwendung ist bei ernsthaften Infektionen mit multiresistenten grampositiven Erregern angezeigt. Das Auftreten von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) und *S. aureus* (VRSA) repräsentiert ein ernsthaftes Problem in allen Einrichtungen der Gesundheitspflege. Aufgrund dieser Problematik ist das Vancomycin-resistenzgen *vanA* (Tabelle 6), das auf einer Vielzahl an mobilen genetischen Elementen lokalisiert sein kann (Tn-1546-like Transposons), ein wichtiger Parameter für die mikrobiologische Risikocharakterisierung (Gagnon et al., 2011; Starikova et al., 2013; Wardal et al., 2014). Das Unterbinden der Verbreitung des *vanA* Gens ist umso wichtiger, da frühere Arbeiten gezeigt haben, dass das *vanA* Gen auch unter Abwesenheit von Enterokokken in Biofilmen aus autochthonen Trinkwasserbakterien zu finden ist (Schwartz et al., 2003).

Carbapenem-resistente *K. pneumonia* und *P. aeruginosa* stellen ernsthafte Probleme im klinischen sowie im ambulanten Bereich dar. Das Imipenemresistenzgen *blaVIM*, das ebenfalls auf einem mobilen genetischen Element liegt (Tn402) ist mitverantwortlich für die derzeitige Resistenzlage in diesen Bakterienspezies (Kofteridis et al., 2014). Daher ist eine Reduktion des *blaVIM* Gens ein wichtiger Indikator für eine mikrobiologische Risikocharakterisierung aquatischer Systeme.

*Streptococcus pneumoniae* ist ein weiterer Vertreter fakultativ pathogener Bakterien und kann schwere Atemwegserkrankungen hervorrufen. Infektionen mit *S. pneumoniae* werden häufig mit Makrolidantibiotika behandelt. Eine Resistenzzunahme gegen Makrolidantibiotika führte zu einer Erhöhung der Sterblichkeitsrate in den letzten 10 Jahren (Wardal et al., 2014). Das Makrolidresistenzgen gegen Erythromycin (*ermB*) ist zudem häufig auf Transposons lokalisiert (Okitsu et al., 2005).

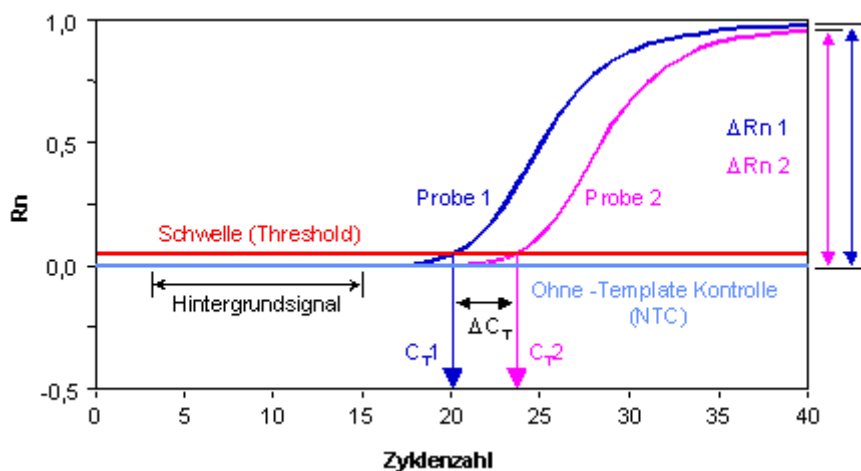
**Tabelle 6** Primersysteme zur Detektion von Antibiotikaresistenzgenen

Antibiotikaresistenzgen	Gen	Name	Sequenz
Vancomycin-resistenz	<i>vanA</i>	vana3FP	CTGTGAGGTCGGTTGTGCG
		vana3RP	TTGGTCCACCTCGCCA
Imipenem-resistenz	<i>blaVIM</i>	vim1FP	CCTCCATTGAGCGGATTCA
		vim1RP	GCCGTGCCCCGGAA
Erythromycin-resistenz	<i>ermB</i>	ermB-F	TGAATCGAGACTTGAGTGTGCAA
		ermB-R	GGATTCTACAAGCGTACCTT

## 2.7 Quantitative Real-Time PCR

Quantitative Real-Time PCR (qPCR) ermöglicht die Quantifizierung mikrobiologisch relevanter Parameter in einer Population aus unterschiedlichen aquatischen Habitaten. Spezifische Primer für klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene und opportunistische Bakterien sind in Tabelle 3 und 4 in den vorangegangenen Kapiteln (2.5 und 2.6) aufgeführt. Um das Detektionslimit und die Leistungsfähigkeit des qPCR-Systems zu ermitteln, wurden Standardverdünnungsreihen von Referenzbakterien (*E. faecium* B7641 (*vanA*), *Staphylococcus aureus* A1 (*mecA*), *P. aeruginosa* Pa49 (*blaVIM*) und *E. cloacae* NZ11 (*ampC*) erstellt und vermessen.

Für die Quantifizierung des jeweiligen Zielgens wurde für jede Probe ein 20  $\mu\text{L}$  qPCR Reaktionsansatz angesetzt. Jeder Reaktionsansatz enthält 10  $\mu\text{L}$  KAPA SYBR FAST Abi Prism 2x qPCR Master Mix (peqlab, Erlangen, Germany), 7  $\mu\text{L}$  nucleasefreies Wasser (Ambion, life technology, Frankfurt, Germany), 1  $\mu\text{L}$  Vorwärts- und Rückwärtsprimer (5  $\mu\text{M}$ ), und 1  $\mu\text{L}$  genomische DNA (Konzentration ca. 30 ng pro  $\mu\text{L}$ ). Das Temperaturprofil der qPCR startete mit der Polymeraseaktivierung und Denaturierung von komplexen Sekundärstrukturen genomischer DNA bei 95  $^{\circ}\text{C}$  für 3 Minuten. Anschließend erfolgte die Primeranlagerung/Amplifizierung (60  $^{\circ}\text{C}$  für 15 Sekunden) und die wiederholte Denaturierung bei 95  $^{\circ}\text{C}$  für 15 Sekunden. Dieser Zyklus wird insgesamt 40x wiederholt und der Fluoreszenzanstieg wurde nach jedem Zyklus gemessen (Abbildung 9). Die Spezifität der Amplifikation wurde mit Hilfe einer anschließenden Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde ein Temperaturgradient von 60 bis 95  $^{\circ}\text{C}$  verwendet (1  $^{\circ}\text{C}$  pro 10 Sekunden). Die Auswertung wurde mit der Bio-Rad CFX Manager Software durchgeführt.



**Abbildung 9** Prinzip der qPCR Quantifizierung. Die Fluoreszenzintensität ( $R_n$ ) nimmt auf Grund der PCR-Amplifizierung mit jedem Zyklus fortlaufend zu. Sobald der Schwellenwert (Threshold) überschritten und signifikant über dem Hintergrundsignal liegt, wird der  $C_t$ -Wert aufgezeichnet. Je größer der  $C_t$ -Wert, umso geringer die Anzahl der Genkopien.

Die Berechnung der Zellzahl des jeweiligen Antibiotikaresistenzgens und speziesspezifischen Bakterienmarkers in der Gesamtpopulation erfolgte über Kalibriergeraden von zuvor vermessenen Referenzbakterien. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) aus den Verdünnungsreihen der Referenzbakterien wurden mit der gemessenen Fluoreszenz (Ct-Werte) aus der qPCR korreliert (Kapitel 7, Anhang). Da genetische Transferereignisse dafür verantwortlich sind, dass Antibiotikaresistenzgene unabhängig von der Bakterienspezies in einer Population vorhanden sein können, wurden die ermittelten Zellzahlen als Referenzbakterien-Äquivalente bezeichnet, oder kurz Zelläquivalente.

## 2.8 Berechnung von Zelläquivalenten

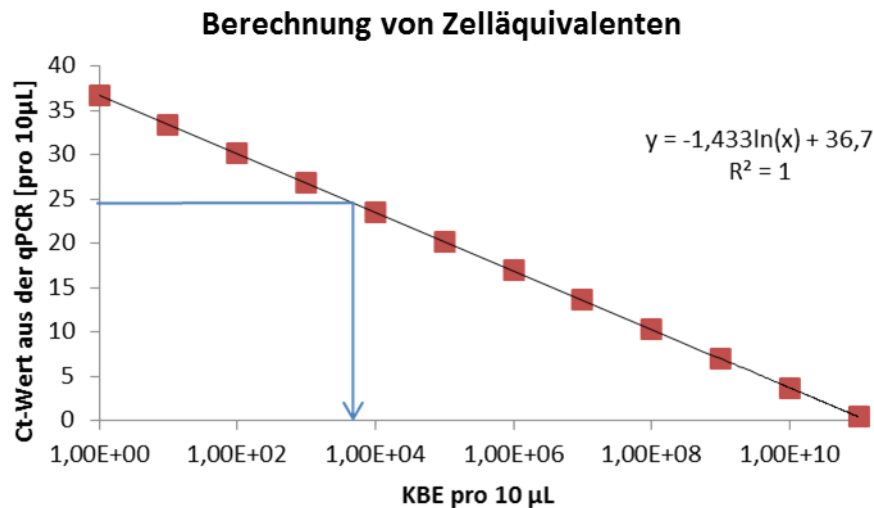
Die Berechnung der Zelläquivalente beruht auf einer absoluten Quantifizierung durch die qPCR. Die Normierung der untersuchten Antibiotikaresistenzgene und opportunistischen Bakterienparameter in der jeweiligen Mischpopulation erfolgte auf 100 ng DNA, extrahiert aus jeder Wasserprobe. Klinische Isolate, die das jeweilige Antibiotikaresistenzgen oder das speziesspezifische Markergen enthielten, dienten als Referenz zur Generierung einer Kalibriergerade. Jedes Referenzbakterium wurde in Flüssigmedium angezogen bis eine optische Dichte von 1,0 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht wurde. Dieser Wert korreliert mit einer Zelldichte von ca.  $5 \times 10^8$  Bakterien pro mL. Nach Anzucht der Referenzbakterien wurden Verdünnungsreihen in Schritten von 8 Zehnerpotenzen angelegt und von jeder Verdünnungsstufe 100  $\mu$ L auf ein adäquates Medium ausplattiert (Tabelle 7).

**Tabelle 7** Kultivierung von antibiotikaresistenten Bakterien nach CLSI Standards

Bakterium	Medium	Antibiotikum	Konzentration
<i>Enterobacteriaceae</i>	TTC Agar	Ampicillin	32 $\mu$ g pro mL
Pseudomonaden	Cetrimid Agar	Ciprofloxacin	4 $\mu$ g pro mL
		Imipenem	4 $\mu$ g pro mL
Enterokokken	Slanetz-Bartley Agar	Vancomycin	16 $\mu$ g pro mL
Staphylokokken	TSB Agar	Methicillin	4 $\mu$ g pro mL

Zeitgleich wurden 10  $\mu$ L aus jeder Verdünnungsstufe für qPCR-Analysen verwendet. Die angelegten Zellkulturen wurden für 44 h und 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die KBE bestimmt und mit den dazugehörigen Ct-Werten aus der qPCR korreliert. Aufgrund von Interferenzen bei der Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgene *vanA* und *blaVIM* in der qPCR-Analyse, wurde eine Standard PCR durchgeführt und die Amplifikation anschließend

densitometrischen quantifiziert (Light Units, LumiImager Working Station, Lumi Analyst Software) Die aus der Korrelation entstandene Eichgerade wurde zur Berechnung der Abundanzen von Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien aus einer Mischpopulation (Gesamt-DNA Extrakt aus einer Wasserprobe) verwendet. Das Prinzip einer Kalibriergerade zur Berechnung von Zelläquivalenten ist in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10** Berechnung von Zelläquivalenten durch die Korrelation von Kultivierung und qPCR Quantifizierung

Der Hauptanteil an Mikroorganismen in einer natürlichen Population besteht aus weitestgehend uncharakterisierten Bakterien mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund sowie autochthonen Bakterien, die ebenfalls Empfänger und als Überträger von Antibiotikaresistenzgenen fungieren können. Daher werden die Zellzahlen, die mit Hilfe der jeweiligen Kalibrierfunktion berechnet wurden, als Zelläquivalente aus einer Mischpopulation bezeichnet. Andere Methoden basierend auf der relativen Quantifizierung zur 16S rDNA Kopienanzahl sowie der absoluten Quantifizierungen durch Verwendung eines klonierten 16S Fragments in einem Plasmid Standard, standen ebenfalls zur Disposition (Jechalke et al., 2013; Stalder et al., 2014). Allerdings kann die 16S rDNA Anzahl abhängig vom jeweiligen Bakterium und dem physiologischen Zustand der Zelle stark schwanken, ebenso können Plasmidstrukturen (Supercoil) die Polymeraseeffizienz negativ beeinflussen, was zu einer Über- oder Unterschätzung der realen Abundanzen führen kann. Daher wurde eine Normierung der quantitativen Daten auf 100 ng DNA bevorzugt (Gleichung 1). Durch die Quantifizierung der gemessenen Werte, welche relativ zur eingesetzten DNA Menge erfolgte, hat den Vorteil, dass Selektionsereignisse der untersuchten mikrobiologischen Parameter innerhalb der Population



besser erkannt werden konnten. Dies ist ein Vorteil, da die absolute Quantifizierung, basierend auf dem untersuchten Wasservolumen, vom Verdünnungseffekt beeinflusst wird.

$$\text{Abundanz pro } 100 \text{ ng DNA} = 100 * \frac{\text{Zelläquivalente}}{\text{ng [qPCR]}} \quad (1)$$

## 2.9 Bakterielle Lebend/Tot-Differenzierung

Der Lebend/Tot-Differenzierung von Bakterien in einer Population kommt besondere Bedeutung zu, sobald ein Keim-eliminierender Prozess bewertet werden soll. Um die Effektivität der Ozonung zur Reduktion von opportunistischen Bakterien und Antibiotikaresistenzen zu bewerten, wurden inaktivierte Bakterien mit Hilfe des PhAST Blue Photo-Activation System (GenIUL, Barcelona, Spain) von biologisch intakten Bakterien für die nachfolgende PCR Reaktion separiert. Nach Filtration der nativen Wasserproben über eine Polykarbonat Membran wurde diese mit 300 µL Propidiummonoazid-Lösung (25 µM, PMA) in einem farblosen 1,5 mL Eppendorf-Tube (SafeSeal tubes, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) überschichtet. Nach anschließender Inkubation im Dunkeln bei 4 °C für 5 Minuten wurde die Membran mit Hilfe des Photo-Activation Systems bei 100% Intensität für 15 Minuten bestrahlt. Durch diese Bestrahlung verlinkt das PMA mit der DNA aus geschädigten Bakterien bzw. mit freier DNA irreversibel. Dadurch steht diese DNA in der nachfolgenden PCR Reaktion zur Amplifizierung nicht mehr zur Verfügung. Nach der Bestrahlung erfolgte die DNA-Extraktion nach den Vorgaben des Protokolls gemäß dem Fast DNA spin kit for soil (MP Biomedical, Illkrich, Frankreich).

## 2.10 Bestimmung der Nuklease-Aktivität

Die natürliche Nuklease Aktivität reduziert die im Wasser vorkommenden DNA Moleküle und ist ein willkommener Effekt, um freigesetzte funktionale Gene, wie Antibiotikaresistenzen oder mobile genetische Elemente zu inaktivieren. Daher wurde der Effekt der Ozonung auf die Nuklease Aktivität im Abwasser vor und nach Ozonbehandlung bestimmt. 2 µL eines 560 bp PCR Produkts (400 ng pro µL) wurden mit jeweils 248 µL ozoniertem und nicht ozoniertem Abwasser bei 22 °C inkubiert. Nach jeweils 0 und 30 Minuten, sowie 4 und 24 h wurden je 20 µL Abwasser mit 3 µL Loading Dye (Loading Dye, Thermo Scientific, Schwerte, Germany) versetzt. Die Visualisierung des DNA Abbaus durch natürliche Nukleasen in den Wasserproben erfolgte über die Agarose-Gelelektrophorese (1% Agarose, 1 µg pro mL Ethidiumbromid, Sigma, 100 V, 40 min). 20 µL einer jeden Wasserprobe wurden auf das Gel geladen und die Fluoreszenzstärke des 560 bp Fragments, abhängig vom Grad des Nukleaseverdaus, gemessen (Lumi-Imager F1, Lumi Analyst 3.1 Software, Boehringer Mannheim GmbH). Die Stärke der Fluoreszenz wurde in

Light Units (LU) angegeben. Die Höhe der LUs ist abhängig von der Menge an dsDNA und gibt dadurch umgekehrt proportional die Enzymaktivität wieder.

### **2.11 Erfassung von DNA-Schäden**

Der Wirkmechanismus von Ozon zur Inaktivierung von Bakterien beruht unter anderem auf der Reaktivität des Ozons gegenüber Nukleinsäuren. DNA-Schäden induzieren eine Reihe von relevanten Stressantworten in Bakterienzellen (SOS-Antwort, *recA*, HGT). Daher spielen DNA-Schäden in der überlebenden Population nach Ozonbehandlung eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung der Effektivität der Ozonung in der Abwasserbehandlung. Viele DNA-Schäden interferieren mit der Effizienz von DNA-Polymerasen, was zu einer Reduktion in DNA-Synthese oder zu einer komplette Inhibition der PCR Reaktion führen kann (Süss, Volz, Obst, & Schwartz, 2009; Jungfer et al., 2007; Kraft et al., 2011). Unterschiedliche Primersysteme, die zu unterschiedlich langen Amplicons führen, wurden verwendet, um den Grad der DNA-Schäden festzustellen. Das Prinzip beruht dabei auf der statistischen Wahrscheinlichkeit, dass sich mehr DNA-Schäden in längeren Amplicon Sequenzen ansammeln als in kurzen Sequenzen. Damit ist die PCR Reaktion umgekehrt proportional zur Anzahl der DNA-Schäden.

Zur Anreicherung der Biomasse für die anschließende PCR Reaktion wurden 1,5 mL natives Abwasser vom Zu- und Ablauf der Ozonanlage bei 3.000 g für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Prozedur noch 5 Mal wiederholt. Zur Diskriminierung zwischen intra- und extrazellulärer DNA wurde ein DNase I Verdau durchgeführt. Dazu wurden 200 µL der jeweiligen Bakteriensuspension mit 50 µL DNase I Puffer (50 mM MgCl<sub>2</sub>, 13 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM TrisHCl, pH 7.5) und 3 µL DNase I (10.000 U pro mL, Thermo Scientific, Waltham, USA) nach den Vorgaben gemäß dem Protokoll von Varela-Villareal et al. (2009) behandelt. Die anschließende Inaktivierung der DNase I erfolgte mit Proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany) und anschließende Erhitzung auf 90 °C für 10 Minuten. 10 µL dieser DNA Suspension wurde für die anschließende Standard PCR als Template verwendet. Das Temperaturprofil beinhaltete 3 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 25 Zyklen bestehend aus 95 °C für 30 Sekunden, 56 °C für 1 Minute, und 72 °C für 2 Minuten. Der Erfolg der Amplifikation wurde über Gelelektrophorese (1% Agarose Gel für 880 bp and 490 bp Amplicons and 2% Agarose Gel für das 175 bp Amplicon) mittels Lumi Imager F1 (Lumi Analyst 3.1 Software) zur Dokumentation bestimmt.

### **2.12 Populationsanalyse mittels reverser Transkription und PCR-DGGE**

Neben dem Einfluss der Ozonung auf klinisch relevante Parameter wurden auch Populationsanalysen durchgeführt. Nach der RNA-Extraktion aus Wasserproben vor und nach

Ozonung wurde eine reverse Transkription durchgeführt mit anschließender konventioneller PCR für die 16S Fragment-Amplifikation aus der lebenden Bakterien Population.

Die RNA-Extraktion erfolgte über das RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) und gemäß dem dazugehörigen Protokoll. Ein anschließender DNA Verdau verhindert die Kontamination der nachfolgenden reversen Transkription mit genomischer DNA (TURBO DNA-free™ Kit, Ambion, Life technologies, Carlsbad, Germany). Die reverse Transkription wurde mit dem TaqMan Gold RT-PCR Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Germany) nach den Vorgaben des dazu gehörigen Protokolls durchgeführt. Für die anschließende PCR-Amplifikation wurde das Primersystem GC27F/518R verwendet (Tabelle 8). Nach erfolgreicher PCR Reaktion wurden die PCR-Produkte in gleichen Mengen auf ein vertikales denaturierendes Acrylamid/Bis-Acrylamid-Gel geladen. Der Gradient betrug 40% bis 70% Urea. Der Laufpuffer (1x TAE) wurde auf 56 °C vorgewärmt. Nach dem Laden der Proben wurde eine Spannung von 65 V angelegt und für 16 h betrieben. Die nachfolgende Färbung des Gels erfolgte mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff GelRed (Biotium) und die anschließende Dokumentation am Lumi-Imager F1 (Lumi Analyst 3.1 Software). Mit Hilfe des Dice-Koeffizienten wurde anschließend die Ähnlichkeit der Proben untereinander bestimmt. Über die Anwesenheit oder Abwesenheit eines spezifischen 16S Amplificates im gefärbten Acrylamid-Gel wird ein Quotient (Gleichung 2) gebildet, der einen Wert zwischen 1 (komplette Übereinstimmung) und 0 (keine Gemeinsamkeiten) annehmen kann.

$$Q = \frac{2 |a \cap b|}{|a| + |b|} \quad (2)$$

**Tabelle 8** Primersystem zur Amplifikation eines 16S Fragments für PCR-DGGE Analysen

**PCR-DGGE**

Ziel	Gen	Name	Sequenz
Ribosomale DNA	16S rDNA	GC27F*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
		GC341F*	CTACGGGAGGCAGCAG
		517R	ATTACCGGGCTGCTGG
		907R	CCGTCAATTCNTTTGAGTTT

\*GC-clamp CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCG

### **2.13 Populationsanalyse mittels Illumina 16S Amplicon-Sequenzierung**

Zusätzlich zur Populationsanalyse über PCR-DGGE wurde eine Illumina 16S Amplicon paired-end Sequenzierung durchgeführt. Ähnlich der DGGE werden dabei für die Taxonomie relevanten Sequenzabschnitte der hypervariablen V1-V2 Region der ribosomalen 16S RNA (rRNA) aus der Bakterienpopulation vor und nach der Ozonbehandlung verwendet. Die dazu nötige Amplicon Bibliothek wurde nach dem Prinzip von Camarinha-Silva et al. (2014) durchgeführt. Anschließend wurde das Illumina MiSeq System (Genome Analytics, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany) für Sequenzierung genutzt. Jede ermittelte Sequenz wurde durch den USEARCH Algorithmus eine Operational Taxonomic Unit (OTU) zugeteilt. Eine Taxonomiezuordnung wurde über den RDP Classifier erstellt. Sequenzen mit einer sehr niedrigen Abundanz (< 0,005%) wurden aus der Populationsanalyse entfernt, um die Anzahl an störenden OTUs zu verringern.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 DNA als Maß für Biomasse und mikrobiologische Abundanzen in wasserführenden Systemen der Modellregion Donauried

Die Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien basiert auf der Abundanz spezifischer Genmarker in der Gesamt-DNA einer Wasserprobe, isoliert aus dem jeweiligen aquatischen Habitat. Für eine mikrobiologische Charakterisierung ist es nötig, sowohl nichtkultivierbare als auch geschädigte Bakterien mit einzubeziehen, da alle genetischen Komponenten zur Evolution und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen beitragen. Der Vorteil von molekularbiologischen Verfahren gegenüber Kultivierungsverfahren ist die Detektion genetischer Parameter ohne die taxonomische Diskriminierung von Teilen der Gesamtpopulation. Ein Schwachpunkt ist allerdings der Verlust von Biomasse während der DNA-Extraktion und die Anwesenheit möglicher PCR-Inhibitoren, die das Ergebnis verfälschen können. Dem gegenüber steht der geringe kultivierbare Anteil an Umweltbakterien von maximal 5% bis 10% (Cotta et al., 2003; Lebuhn et al., 2005).

Die Konzentration der isolierten Gesamt-DNA wurde auf 100 mL bezogen und ist für jedes untersuchte Habitat in Tabelle 9 dargestellt. Darüber hinaus sollte berücksichtigt werden, dass 100 bis 200 mL Abwasser ausreichen, um eine adäquate Menge an DNA zu extrahieren (0,8 – 38,3 µg pro 100 mL), im Gegensatz zu Oberflächen- oder Grundwässern. Für eine geeignete DNA-Menge wurden bei letzteren teilweise mehrere Liter benötigt (0,02 – 0,6 µg pro 100 mL). DNA-Konzentrationen variierten abhängig von der jeweiligen Jahreszeit und Biomasse, wobei höhere DNA-Ausbeuten während Warmperioden erzielt wurden. Der extrahierte Gesamt-DNA-Gehalt beinhaltet sowohl Bakterien als auch Algen und Pilzen, kann einen ersten Eindruck über die Höhe der vorhandenen Mikroorganismendichte geben und ist ein erster Indikator für die Gesamtbiomasse. Die spezifische Quantifizierung bakterieller Antibiotikaresistenzgene und der speziesspezifischen Genmarker erfolgte in der anschließenden qPCR-Reaktion. Abwasser aus Krankenhäusern, sowie Kläranlagenzu- und -abläufe wiesen naturgemäß eine höhere Biomassenkonzentration in ihrem Wasservolumen auf als Oberflächen- und Grundwässer. Eine Reduktion von bis zu 90% der Biomasse, gemessen an der extrahierten DNA Konzentration, wurde durch konventionelle Abwasserklärung erreicht (Tabelle 9, S5 und S6). Durch den Vergleich der extrahierten DNA Konzentrationen aus den einzelnen wasserführenden Systemen kann die Wahrscheinlichkeit einer mikrobiellen Belastung abgeleitet werden. Diese Beobachtung ist vor allem bei den Regenüberlaufbecken zu berücksichtigen, da deren DNA Gehalt ähnlich hoch konzentriert ist, wie die der Kläranlagenausläufe. Dies ist vor allem auf die erhöhten Wassertemperaturen aufgrund der Sonneneinstrahlung, geringe

Fließgeschwindigkeiten/Stagnation und Abschwemmungen aus der Umgebung zurück zu führen, die sich in den Becken sammeln und damit zum Anstieg der Bakterienkonzentration beitragen. Spezifische Untersuchungen bestätigen eine Korrelation zwischen hoher DNA Konzentration und dem vermehrten Auftreten von Antibiotikaresistenzen sowie von opportunistischen Bakterien in Mischwasser aus Regenüberlaufbecken (Kapitel 3.1.2).

**Tabelle 9** DNA-Konzentrationen pro 100 mL aus jeder der untersuchten Messstellen im Donauried. Der Durchschnittswert basiert auf 5 Probenahmen über einen Zeitraum von 12/2012 bis 02/2014.

<b>Klinikabwasser</b>	<b>ng DNA/100 mL</b>	<b>Standardabweichung</b>
S1 (Hospital 1)	38.299	± 15.393
S2 (Hospital 2)	8.989	± 1.828
<b>Kläranlagen</b>		
S3 (Kläranlage 1, Zulauf)	9.911	± 2.095
S4 (Kläranlage 1, Ablauf)	1.706	± 1.391
S5 (Kläranlage 2, Zulauf)	10.980	± 1.699
S6 (Kläranlage 2, Ablauf)	1.877	± 1.517
S7 (Kläranlage 3, Zulauf)	4.118	± 743
S8 (Kläranlage 3, Ablauf)	785	± 482
S9 (Kläranlage 4, Zulauf)	7.393	± 614
S10 (Kläranlage 4, Ablauf)	1.115	± 897
<b>Oberflächengewässer</b>		
S11 (Donau)	231	± 59
S12 (Lone)	181	± 118
S13 (Nau)	609	± 287
<b>Regenüberlaufbecken</b>		
S14 (ROB1)	1.786	± 553
S15 (ROB2)	875	± 315
S16 (ROB3)	1.460	± 840
S17 (ROB4)	1.094	± 679
<b>Grundwasser</b>		
S18 (GW1, 7721)	211	± 68
S19 (GW2, 7106)	228	± 59
S20 (GW3, 7103)	19	± 6

### 3.1.1 Charakterisierung der Bakterienpopulationen durch die Verwendung von Zelläquivalenten

Die Verbreitung und der Austausch von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen in einer bakteriellen Population über apathogene und/oder nicht kultivierbare Bakterien durch HGT wird oft unterschätzt, aber trägt dennoch erheblich zum mikrobiologischen Risikopotential bei (Davis et al., 2012; Fall et al., 2007; Marti, Variatza, & Balcazar, 2014).

Die Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen und spezifischen Bakterien oder Bakterienspezies aus einer Mischpopulation einer Umweltprobe erfolgte durch die Berechnung von Zelläquivalenten. Zelläquivalente beschreiben die Häufigkeit eines Parameters (z.B. Antibiotikaresistenzgen) gemessen an der Häufigkeit, wie sie im dazugehörigen Referenzbakterium vorkommt. Dadurch sind sie ein geeignetes Werkzeug, um sowohl die Abundanz von klinisch relevanten Parametern festzustellen, als auch genetische Dynamiken in Bakterienpopulationen aquatischer Systeme zu kontrollieren. Der gemessene Fluoreszenzanstieg (Ct-Werte) aus der qPCR für *ampC*, *ermB*, *ecfX*, Enterokokken-spezifische 23S rDNA und *mecA* sowie den densitometrisch gemessenen LUs (Light Units) zur Quantifizierung von *vanA* und *blaVIM*, konnte damit eine Zellzahl zugeordnet werden (Kapitel 2.7).

Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) für alle Kalibrierfunktionen lag über 0,979 (Tabelle 10). Dieser Wert weist auf eine geringe Variabilität im linearen Bereich der Funktion innerhalb der semi-logarithmischen Darstellung hin. Die absolute Quantifizierung der Zelläquivalente innerhalb der Population erfolgte durch die Kalibrierfunktionen des jeweilige Zielgens normalisiert auf 100 ng DNA aus isolierten Gesamt-DNA (Zelläquivalente pro 100 ng DNA).

**Tabelle 10** Gleichungen der Kalibriergeraden zur Berechnung der Zelläquivalente von Antibiotikaresistenzträgern und opportunistischen Bakterien

Gen	Gleichung	$R^2$	Referenzbakterium
<i>vanA</i>	$y = 235,47\ln(x) + 262,91$	0,9936	<i>E. faecium</i> B7641
<i>blaVIM</i>	$y = 211,74\ln(x) + 594,88$	0,9807	<i>P. aeruginosa</i> Pa49
<i>ampC</i>	$y = -1,387\ln(x) + 40,507$	0,9754	<i>E. cloacae</i> NZ11
<i>ermB</i>	$y = -1,383\ln(x) + 34,579$	0,9985	<i>Strep. hyointestins</i> DSM20770
<i>ecfX</i>	$y = -1,422\ln(x) + 33,037$	0,9972	<i>P. aeruginosa</i> Pa49
23S	$y = -1,454\ln(x) + 40,99$	0,9978	<i>E. faecium</i> B7641
<i>mecA</i>	$y = -1,291\ln(x) + 38,802$	0,9798	MRSA A1

### 3.1.2 Abundanzen von Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien in der Bakterienpopulation untersuchter wasserführender Systeme

Die Abundanzen opportunistischer Bakterien und Antibiotikaresistenzgene wurden basierend auf ihren Anteilen in der bakteriellen Population quantifiziert und zusätzlich unter Berücksichtigung des aufgearbeiteten Wasservolumens berechnet und sind in Tabelle 11, 12, 13 und 14 aufgelistet.

### 3.1.2.1 Klinikabwasser

Die höchsten Abundanzen an Antibiotikaresistenzen und opportunistischen Bakterien wurden im Abwasser der untersuchten Kliniken (S1 und S2) gefunden, sowohl im Bezug auf ihre Abundanz in der Bakterienpopulation (z.B.  $1,3 \times 10^5$  bis  $2,8 \times 10^5$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA für *vanA* und *blaVIM*,  $3,7 \times 10^4$  bis  $1,3 \times 10^5$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA für Enterokokken und *P. aeruginosa*, Tabelle 11 und 12), als auch auf ihre Konzentration im untersuchten Abwasser (z.B.  $1,7 \times 10^6$  bis  $5,5 \times 10^6$  Zelläquivalente pro 100 mL für *vanA* und *blaVIM*,  $1,1 \times 10^6$  bis  $6,6 \times 10^6$  Zelläquivalente pro 100 mL für Enterokokken und *P. aeruginosa*, Tabelle 13 und 14). Vor allem Methicillin-resistente Staphylokokken wurden im Klinikabwasser in deutlich höheren Konzentrationen gemessen als im kommunalen Abwasser ( $3,4 \times 10^4$  bis  $4,3 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA und  $1,2 \times 10^5$  bis  $1,7 \times 10^5$  Zelläquivalente pro 100 mL, Tabelle 12 und 14). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit früheren Studien, die sich mit Klinikabwässern beschäftigt haben (Oberlé et al., 2012; Schwartz et al., 2003). Basierend auf den Ergebnissen pro 100 ng DNA weisen Antibiotikaresistenzgene teilweise höhere Abundanzen auf als die taxonomischen Marker der ursprünglichen Antibiotikaresistenzträger (Tabelle 11 und 12). Beispielsweise ist im Klinikabwasser (S2) die Resistenz gegen das Antibiotikum Imipenem (*blaVIM*), ursprünglich assoziiert mit *P. aeruginosa*, um bis zu 3,5-fach höher als die Abundanz für *P. aeruginosa* (*ecfX*). Auch das *vanA* Gen, ursprünglich aus *E. faecium/faecalis* isoliert, wurde deutlich häufiger in der Abwasserpopulation von Kliniken (S1 und S2) detektiert (2,2-fach höher), als der 23S rDNA Marker für Enterokokken. Klinische Studien, die sich speziell mit dem genetischen Hintergrund der Vancomycinresistenz in Enterokokken auseinandergesetzt haben, dokumentieren die Lokalisation des *vanA* Gens auf einem mobilen genetischen Element, das auch in anderen opportunistischen Bakterien gefunden wurde (Forsberg et al., 2012; Pruden, Pei, Storteboom, & Carlson, 2006). Die erhöhte Abundanz des *vanA* Gens gegenüber dem zugehörigen bakteriellen Marker für Enterokokken weist auf eine hohe Mobilität dieses Resistenzgens in der Bakterienpopulation von Klinikabwässern hin.

Die hohe DNA-Konzentration im Klinikabwasser (Tabelle 9) legt ebenfalls eine hohe Bakteriendichte nahe, was ein wichtiger Parameter für HGT ist. Transferereignisse aufgrund des vorherrschenden Antibiotikastresses im Klinikabwasser könnte einer der Gründe für die erhöhte Abundanz der Antibiotikaresistenzgene sein (Alexander et al., 2015). Untersuchungen zu den Antibiotikakonzentrationen in den untersuchten Wasserproben sind in Tabelle 15 dargestellt (Kapitel 3.1.3.2). Diese Ergebnisse bestätigen eine erhöhte Gesamtkonzentration von Antibiotika ( $26,38 \mu\text{g pro L}$ ) im untersuchten Klinikabwasser gegenüber anderen untersuchten aquatischen Habitaten. Niedrig konzentrierte Antibiotika induzieren eine erhöhte Genaktivität und können dadurch zur Evolution antibiotikaresistenter Bakterien sowie zu HGT beitragen (Bruchmann, Kirchen, & Schwartz, 2013; Davies, Spiegelman, & Yim, 2006).



Es ist gemeinhin bekannt, dass unterschiedliche Mechanismen zur Antibiotika-resistenzentwicklung oder zur Akkumulation resistenter Bakterien beitragen. Zur Unterstützung der molekularbiologischen Ergebnisse wurden ebenfalls kulturbasierte Verfahren nach Schwartz et al. (2006) und CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) angewendet (Kapitel 2.8, Tabelle 7). Diese Verfahren bestätigten das Vorhandensein multiresistenter Pseudomonaden und Vancomycin-resistenter Enterokokken in beiden Klinikabwässern (S1 und S2) sowie in einigen Kläranlagen (S3, S5 und S6).

**Tabelle 11** Häufigkeiten der Antibiotikaresistenzgene in der Bakterienpopulation der untersuchten Messstellen. Mittelwerte aus 6 Probenahmen innerhalb des 2-jährigen Monitorings, dargestellt in Zelläquivalenten pro 100 ng Gesamt-DNA. Zusätzlich sind die Standardabweichungen aufgeführt (je Messstelle 6 Untersuchungen als Triplikate).

<b>Antibiotikaresistenzgen</b>	<i>blaVIM</i>	<i>vanA</i>	<i>ampC</i>	<i>ermB</i>
<b>Klinikabwasser</b>				
S1 Klinik Ulm	$2,7 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4 \pm 6,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$
S2 Klinik Langenau	$1,3 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^5 \pm 4,0 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4 \pm 9,3 \times 10^2$	$1,4 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^4$
<b>Kläranlagen</b>				
S3 (Kläranlage 1, Zulauf)	$1,1 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$	$4,5 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^4$
S4 (Kläranlage 1, Ablauf)	$2,2 \times 10^5 \pm 6,8 \times 10^3$	$7,4 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4 \pm 3,2 \times 10^3$	$8,1 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^2$
S5 (Kläranlage 2, Zulauf)	$2,7 \times 10^4 \pm 3,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$	$2,0 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^4$
S6 (Kläranlage 2, Ablauf)	$3,9 \times 10^5 \pm 3,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$	$7,4 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4 \pm 3,3 \times 10^3$
S7 (Kläranlage 3, Zulauf)	$4,2 \times 10^4 \pm 4,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4 \pm 3,6 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^3$	$8,9 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$
S8 (Kläranlage 3, Ablauf)	$6,9 \times 10^4 \pm 8,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4 \pm 6,6 \times 10^3$	$1,9 \times 10^2 \pm 6,8 \times 10^1$
S9 (Kläranlage 4, Zulauf)	$1,3 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4 \pm 7,8 \times 10^3$	$9,8 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^4$
S10 (Kläranlage 4, Ablauf)	$2,8 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^4$	$9,1 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$	$4,1 \times 10^2 \pm 1,3 \times 10^2$
<b>Oberflächenwasser</b>				
S11 (Donau)	$6,6 \times 10^4 \pm 7,5 \times 10^3$	$9,3 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4 \pm 8,5 \times 10^3$	$8,5 \times 10^4 \pm 6,6 \times 10^2$
S12 (Lone)	$3,4 \times 10^4 \pm 6,5 \times 10^3$	$4,7 \times 10^4 \pm 6,3 \times 10^3$	$5,2 \times 10^4 \pm 4,8 \times 10^3$	$8,5 \times 10^4 \pm 2,0 \times 10^3$
S13 (Nau)	$1,2 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4$	$7,8 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$	$8,3 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5 \pm 7,4 \times 10^3$
<b>Regenüberlaufbecken</b>				
S14 (ROB1)	$4,7 \times 10^3 \pm 3,0 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4 \pm 3,8 \times 10^4$	$5,6 \times 10^3 \pm 4,4 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$
S15 (ROB2)	$4,0 \times 10^3 \pm 3,3 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3 \pm 5,1 \times 10^2$	$4,9 \times 10^3 \pm 3,9 \times 10^3$	$9,5 \times 10^2 \pm 1,3 \times 10^2$
S16 (ROB3)	$6,8 \times 10^3 \pm 5,0 \times 10^3$	$7,4 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3 \pm 3,8 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3 \pm 8,7 \times 10^2$
S17 (ROB4)	$4,6 \times 10^3 \pm 6,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4 \pm 3,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4 \pm 2,9 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2 \pm 3,6 \times 10^1$
<b>Grundwasser</b>				
S18 (GW1, 7721)	$4,1 \times 10^4 \pm 1,9 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4 \pm 5,8 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2 \pm 1,1 \times 10^1$
S19 (GW2, 7106)	$1,7 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3 \pm 1,9 \times 10^2$	$5,1 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^3$	$5,6 \times 10^1 \pm 1,2 \times 10^1$
S20 (GW3, 7103)	$4,0 \times 10^3 \pm 8,7 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2 \pm 3,6 \times 10^2$	$5,6 \times 10^3 \pm 5,5 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2 \pm 4,0 \times 10^1$

**Tabelle 12** Häufigkeiten opportunistischer Mikroorganismen in der Bakterienpopulation der untersuchten Messstellen. Mittelwerte aus 6 Probenahmen innerhalb des 2-jährigen Monitorings, dargestellt in Zelläquivalenten pro 100 ng Gesamt-DNA. Zusätzlich sind die Standardabweichungen aufgeführt (je Messstelle 6 Untersuchungen als Triplikate).

<b>Opportunistische</b>	<b>Enterokokken</b>	<b>Staphylokokken</b>	<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>
<b>Klinikabwasser</b>				
S1 Klinik Ulm	5,9 x 10 <sup>4</sup> ±4,0 x 10 <sup>4</sup>	3,4 x 10 <sup>4</sup> ±2,5 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup> ±5,4 x 10 <sup>4</sup>	2,1 x 10 <sup>4</sup> ±6,0 x 10 <sup>3</sup>
S2 Klinik Langenau	1,3 x 10 <sup>5</sup> ±8,7 x 10 <sup>4</sup>	4,3 x 10 <sup>4</sup> ±4,0 x 10 <sup>3</sup>	3,7 x 10 <sup>4</sup> ±2,4 x 10 <sup>4</sup>	1,9 x 10 <sup>4</sup> ±9,3 x 10 <sup>2</sup>
<b>Kläranlagen</b>				
S3 (Kläranlage 1,	4,2 x 10 <sup>5</sup> ±6,8 x 10 <sup>4</sup>	3,7 x 10 <sup>1</sup> ±3,5 x 10 <sup>1</sup>	1,9 x 10 <sup>4</sup> ±1,1 x 10 <sup>3</sup>	1,3 x 10 <sup>4</sup> ±1,2 x 10 <sup>3</sup>
S4 (Kläranlage 1,	3,8 x 10 <sup>4</sup> ±6,9 x 10 <sup>3</sup>	1,2 x 10 <sup>2</sup> ±8,3 x 10 <sup>1</sup>	4,3 x 10 <sup>4</sup> ±2,5 x 10 <sup>3</sup>	3,1 x 10 <sup>4</sup> ±3,2 x 10 <sup>3</sup>
S5 (Kläranlage 2,	3,0 x 10 <sup>5</sup> ±4,8 x 10 <sup>4</sup>	2,8 x 10 <sup>2</sup> ±2,1 x 10 <sup>2</sup>	2,9 x 10 <sup>3</sup> ±2,1 x 10 <sup>3</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup> ±2,8 x 10 <sup>3</sup>
S6 (Kläranlage 2,	5,8 x 10 <sup>4</sup> ±1,9 x 10 <sup>4</sup>	3,8 x 10 <sup>1</sup> ±6,2 x 10 <sup>0</sup>	4,9 x 10 <sup>4</sup> ±4,4 x 10 <sup>4</sup>	7,4 x 10 <sup>4</sup> ±2,3 x 10 <sup>4</sup>
S7 (Kläranlage 3,	1,1 x 10 <sup>5</sup> ±6,6 x 10 <sup>4</sup>	3,9 x 10 <sup>3</sup> ±1,7 x 10 <sup>3</sup>	3,1 x 10 <sup>3</sup> ±1,5 x 10 <sup>3</sup>	4,8 x 10 <sup>3</sup> ±1,8 x 10 <sup>3</sup>
S8 (Kläranlage 3,	1,3 x 10 <sup>3</sup> ±1,1 x 10 <sup>3</sup>	4,9 x 10 <sup>1</sup> ±2,6 x 10 <sup>1</sup>	3,5 x 10 <sup>2</sup> ±1,0 x 10 <sup>2</sup>	4,3 x 10 <sup>4</sup> ±6,6 x 10 <sup>3</sup>
S9 (Kläranlage 4,	2,7 x 10 <sup>5</sup> ±1,4 x 10 <sup>5</sup>	7,6 x 10 <sup>1</sup> ±3,8 x 10 <sup>1</sup>	5,4 x 10 <sup>3</sup> ±3,0 x 10 <sup>3</sup>	9,8 x 10 <sup>3</sup> ±2,8 x 10 <sup>3</sup>
S10 (Kläranlage 4,	7,9 x 10 <sup>3</sup> ±3,2x10 <sup>3</sup>	2,2 x 10 <sup>1</sup> ±6,6 x 10 <sup>0</sup>	8,5 x 10 <sup>3</sup> ±2,2 x 10 <sup>3</sup>	9,1 x 10 <sup>3</sup> ±2,8 x 10 <sup>3</sup>
<b>Oberflächenwasser</b>				
S11 (Donau)	9,8 x 10 <sup>4</sup> ±7,2 x 10 <sup>3</sup>	2,7 x 10 <sup>0</sup> ±2,0 x 10 <sup>0</sup>	6,9 x 10 <sup>4</sup> ±4,7 x 10 <sup>3</sup>	6,5 x 10 <sup>4</sup> ±8,5 x 10 <sup>3</sup>
S12 (Lone)	1,1 x 10 <sup>5</sup> ±2,0 x 10 <sup>4</sup>	7,2 x 10 <sup>1</sup> ±8,5 x 10 <sup>0</sup>	4,2 x 10 <sup>4</sup> ±3,1 x 10 <sup>3</sup>	5,2 x 10 <sup>4</sup> ±4,8 x 10 <sup>3</sup>
S13 (Nau)	2,8 x 10 <sup>5</sup> ±8,3 x 10 <sup>4</sup>	1,9 x 10 <sup>1</sup> ±5,6 x 10 <sup>0</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup> ±1,3 x 10 <sup>4</sup>	8,3 x 10 <sup>4</sup> ±1,4 x 10 <sup>4</sup>
<b>Regenüberlaufbecken</b>				
S14 (ROB1)	2,3 x 10 <sup>4</sup> ±5,4 x 10 <sup>3</sup>	2,1 x 10 <sup>2</sup> ±9,8 x 10 <sup>1</sup>	7,1 x 10 <sup>3</sup> ±3,0 x 10 <sup>3</sup>	5,6 x 10 <sup>3</sup> ±4,4 x 10 <sup>3</sup>
S15 (ROB2)	6,9 x 10 <sup>3</sup> ±2,1 x 10 <sup>3</sup>	4,7 x 10 <sup>2</sup> ±2,3 x 10 <sup>2</sup>	3,1 x 10 <sup>3</sup> ±2,8 x 10 <sup>3</sup>	4,9 x 10 <sup>3</sup> ±3,9 x 10 <sup>3</sup>
S16 (ROB3)	6,8 x 10 <sup>4</sup> ±9,5 x 10 <sup>3</sup>	4,7 x 10 <sup>2</sup> ±2,9 x 10 <sup>2</sup>	5,4 x 10 <sup>3</sup> ±2,8 x 10 <sup>3</sup>	4,5 x 10 <sup>3</sup> ±3,8 x 10 <sup>3</sup>
S17 (ROB4)	1,1 x 10 <sup>3</sup> ±1,0 x 10 <sup>3</sup>	3,3 x 10 <sup>2</sup> ±2,3 x 10 <sup>2</sup>	1,7 x 10 <sup>3</sup> ±1,2 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>4</sup> ±2,9 x 10 <sup>3</sup>
<b>Grundwasser</b>				
S18 (GW1, 7721)	2,0 x 10 <sup>4</sup> ±1,6 x 10 <sup>4</sup>	1,3 x 10 <sup>3</sup> ±6,8 x 10 <sup>1</sup>	2,6 x 10 <sup>4</sup> ±1,5 x 10 <sup>3</sup>	3,5 x 10 <sup>4</sup> ±5,8 x 10 <sup>3</sup>
S19 (GW2, 7106)	1,1 x 10 <sup>4</sup> ±2,9 x 10 <sup>3</sup>	5,9 x 10 <sup>2</sup> ±3,0 x 10 <sup>1</sup>	7,2 x 10 <sup>2</sup> ±1,5 x 10 <sup>2</sup>	5,1 x 10 <sup>3</sup> ±1,7 x 10 <sup>3</sup>
S20 (GW3, 7103)	3,9 x 10 <sup>2</sup> ±1,8 x 10 <sup>2</sup>	1,7 x 10 <sup>2</sup> ±1,9 x 10 <sup>1</sup>	4,4 x 10 <sup>2</sup> ±4,8 x 10 <sup>1</sup>	5,6 x 10 <sup>3</sup> ±5,5 x 10 <sup>2</sup>

**Tabelle 13** Häufigkeiten der Antibiotikaresistenzgene in der Bakterienpopulation der untersuchten Messstellen. Mittelwerte aus 6 Probenahmen innerhalb des 2-jährigen Monitorings, dargestellt in Zelläquivalenten pro 100 mL Wasservolumen. Zusätzlich sind die Standardabweichungen aufgeführt (je Messstelle 6 Untersuchungen als Triplikate).

<b>Antibiotikaresistenzgen</b>	<i>blaVIM</i>	<i>vanA</i>	<i>ampC</i>	<i>ermB</i>
<b>Klinikabwasser</b>				
S1 Klinik Ulm	5,5 x 10 <sup>6</sup> ±3,6 x 10 <sup>6</sup>	3,3 x 10 <sup>6</sup> ±1,3 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup> ±5,0 x 10 <sup>5</sup>	5,5 x 10 <sup>5</sup> ±4,0 x 10 <sup>5</sup>
S2 Klinik Langenau	1,7 x 10 <sup>6</sup> ±3,5 x 10 <sup>5</sup>	2,7 x 10 <sup>6</sup> ±1,6 x 10 <sup>5</sup>	7,2 x 10 <sup>5</sup> ±9,5 x 10 <sup>4</sup>	2,7 x 10 <sup>5</sup> ±9,3 x 10 <sup>4</sup>
<b>Kläranlagen</b>				
S3 (Kläranlage 1, Zulauf)	7,4 x 10 <sup>5</sup> ±6,9 x 10 <sup>4</sup>	6,9 x 10 <sup>4</sup> ±2,2 x 10 <sup>4</sup>	7,8 x 10 <sup>4</sup> ±2,0 x 10 <sup>4</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup> ±2,1 x 10 <sup>4</sup>
S4 (Kläranlage 1, Ablauf)	1,3 x 10 <sup>5</sup> ±4,3 x 10 <sup>4</sup>	9,3 x 10 <sup>3</sup> ±5,2 x 10 <sup>3</sup>	2,9 x 10 <sup>3</sup> ±1,4 x 10 <sup>3</sup>	1,9 x 10 <sup>3</sup> ±6,2 x 10 <sup>2</sup>
S5 (Kläranlage 2, Zulauf)	6,0 x 10 <sup>5</sup> ±6,2 x 10 <sup>4</sup>	3,9 x 10 <sup>5</sup> ±2,8 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>6</sup> ±3,4 x 10 <sup>5</sup>	2,8 x 10 <sup>5</sup> ±3,0 x 10 <sup>4</sup>
S6 (Kläranlage 2, Ablauf)	7,6 x 10 <sup>5</sup> ±7,1 x 10 <sup>4</sup>	5,8 x 10 <sup>4</sup> ±2,9 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>2</sup> ±7,2 x 10 <sup>1</sup>	8,1 x 10 <sup>1</sup> ±3,1 x 10 <sup>1</sup>
S7 (Kläranlage 3, Zulauf)	9,5 x 10 <sup>4</sup> ±2,4 x 10 <sup>4</sup>	1,9 x 10 <sup>3</sup> ±8,5 x 10 <sup>2</sup>	1,8 x 10 <sup>4</sup> ±1,0 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup> ±3,5 x 10 <sup>4</sup>
S8 (Kläranlage 3, Ablauf)	3,2 x 10 <sup>3</sup> ±1,9 x 10 <sup>3</sup>	3,7 x 10 <sup>2</sup> ±2,6 x 10 <sup>2</sup>	1,4 x 10 <sup>2</sup> ±9,1 x 10 <sup>1</sup>	3,7 x 10 <sup>2</sup> ±2,9 x 10 <sup>2</sup>
S9 (Kläranlage 4, Zulauf)	5,1 x 10 <sup>4</sup> ±1,3 x 10 <sup>4</sup>	6,2 x 10 <sup>3</sup> ±2,5 x 10 <sup>3</sup>	4,6 x 10 <sup>4</sup> ±2,0 x 10 <sup>4</sup>	3,1 x 10 <sup>5</sup> ±9,1 x 10 <sup>4</sup>
S10 (Kläranlage 4, Ablauf)	3,8 x 10 <sup>3</sup> ±1,8 x 10 <sup>3</sup>	3,2 x 10 <sup>1</sup> ±2,1 x 10 <sup>1</sup>	8,7 x 10 <sup>2</sup> ±6,6 x 10 <sup>2</sup>	4,2 x 10 <sup>2</sup> ±3,2 x 10 <sup>2</sup>
<b>Oberflächenwasser</b>				
S11 (Donau)	1,5 x 10 <sup>2</sup> ±1,0 x 10 <sup>1</sup>	1,6 x 10 <sup>1</sup> ±1,1 x 10 <sup>1</sup>	8,7 x 10 <sup>1</sup> ±5,9 x 10 <sup>1</sup>	9,3 x 10 <sup>0</sup> ±3,6 x 10 <sup>0</sup>
S12 (Lone)	4,7 x 10 <sup>2</sup> ±3,9 x 10 <sup>1</sup>	4,9 x 10 <sup>0</sup> ±3,9 x 10 <sup>0</sup>	3,6 x 10 <sup>1</sup> ±2,8 x 10 <sup>1</sup>	3,8 x 10 <sup>0</sup> ±2,5 x 10 <sup>0</sup>
S13 (Nau)	1,3 x 10 <sup>3</sup> ±8,7 x 10 <sup>2</sup>	1,2 x 10 <sup>1</sup> ±9,3 x 10 <sup>0</sup>	7,4 x 10 <sup>1</sup> ±5,5 x 10 <sup>1</sup>	8,9 x 10 <sup>0</sup> ±4,8 x 10 <sup>0</sup>
<b>Regenüberlaufbecken</b>				
S14 (ROB1)	2,8 x 10 <sup>4</sup> ±2,2 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup> ±7,8 x 10 <sup>3</sup>	7,6 x 10 <sup>3</sup> ±6,6 x 10 <sup>3</sup>	4,6 x 10 <sup>3</sup> ±3,2 x 10 <sup>3</sup>
S15 (ROB2)	9,8 x 10 <sup>3</sup> ±9,1 x 10 <sup>3</sup>	8,9 x 10 <sup>2</sup> ±4,1 x 10 <sup>2</sup>	3,4 x 10 <sup>3</sup> ±3,1 x 10 <sup>3</sup>	1,7 x 10 <sup>3</sup> ±7,6 x 10 <sup>2</sup>
S16 (ROB3)	2,2 x 10 <sup>4</sup> ±1,8 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup> ±4,1 x 10 <sup>3</sup>	2,7 x 10 <sup>3</sup> ±2,4 x 10 <sup>3</sup>	1,3 x 10 <sup>4</sup> ±9,1 x 10 <sup>3</sup>
S17 (ROB4)	3,4 x 10 <sup>4</sup> ±8,3 x 10 <sup>3</sup>	8,5 x 10 <sup>3</sup> ±2,8 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>4</sup> ±3,3 x 10 <sup>3</sup>	4,1 x 10 <sup>3</sup> ±1,4 x 10 <sup>3</sup>
<b>Grundwasser</b>				
S18 (GW1, 7721)	2,1 x 10 <sup>0</sup> ±2,0 x 10 <sup>0</sup>	2,1 x 10 <sup>0</sup> ±1,8 x 10 <sup>0</sup>	1,8 x 10 <sup>0</sup> ±1,6 x 10 <sup>0</sup>	1,3 x 10 <sup>0</sup> ±1,1 x 10 <sup>0</sup>
S19 (GW2, 7106)	2,5 x 10 <sup>0</sup> ±2,4 x 10 <sup>0</sup>	2,2 x 10 <sup>0</sup> ±1,8 x 10 <sup>0</sup>	1,9 x 10 <sup>0</sup> ±1,7 x 10 <sup>0</sup>	1,3 x 10 <sup>0</sup> ±1,2 x 10 <sup>0</sup>
S20 (GW3, 7103)	1,5 x 10 <sup>0</sup> ±1,4 x 10 <sup>0</sup>	1,4 x 10 <sup>0</sup> ±1,4 x 10 <sup>0</sup>	1,4 x 10 <sup>0</sup> ±1,3 x 10 <sup>0</sup>	1,2 x 10 <sup>0</sup> ±1,1 x 10 <sup>0</sup>

**Tabelle 14** Häufigkeiten opportunistischer Mikroorganismen in der Bakterienpopulation der untersuchten Messstellen. Mittelwerte aus 6 Probenahmen innerhalb des 2-jährigen Monitorings, dargestellt in Zelläquivalenten pro 100 mL Wasservolumen. Zusätzlich sind die Standardabweichungen aufgeführt (je Messstelle 6 Untersuchungen als Triplikate).

<b>Opportunistische</b>	<i>Enterokokken</i>	<i>Staphylokokken</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Klinikabwasser</b>				
S1 Klinik Ulm	6,5 x 10 <sup>6</sup> ±4,9 x 10 <sup>6</sup>	1,7 x 10 <sup>5</sup> ±2,7 x 10 <sup>4</sup>	4,8 x 10 <sup>6</sup> ±2,4 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup> ±5,0 x 10 <sup>5</sup>
S2 Klinik Langenau	6,6 x 10 <sup>6</sup> ±4,9 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup> ±2,5 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup> ±8,3 x 10 <sup>5</sup>	7,2 x 10 <sup>5</sup> ±9,5 x 10 <sup>4</sup>
<b>Kläranlagen</b>				
S3 (Kläranlage 1, Zulauf)	5,2 x 10 <sup>6</sup> ±1,9 x 10 <sup>6</sup>	7,4 x 10 <sup>3</sup> ±4,7 x 10 <sup>3</sup>	2,4 x 10 <sup>5</sup> ±4,9 x 10 <sup>4</sup>	7,8 x 10 <sup>4</sup> ±2,0 x 10 <sup>4</sup>
S4 (Kläranlage 1, Ablauf)	3,1 x 10 <sup>3</sup> ±1,8 x 10 <sup>3</sup>	4,7 x 10 <sup>0</sup> ±4,2 x 10 <sup>0</sup>	3,2 x 10 <sup>3</sup> ±1,3 x 10 <sup>3</sup>	2,9 x 10 <sup>3</sup> ±1,4 x 10 <sup>3</sup>
S5 (Kläranlage 2, Zulauf)	8,3 x 10 <sup>5</sup> ±1,3 x 10 <sup>5</sup>	3,3 x 10 <sup>3</sup> ±2,5 x 10 <sup>3</sup>	3,5 x 10 <sup>5</sup> ±2,6 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>6</sup> ±3,4 x 10 <sup>5</sup>
S6 (Kläranlage 2, Ablauf)	1,0 x 10 <sup>2</sup> ±6,6 x 10 <sup>1</sup>	4,7 x 10 <sup>0</sup> ±4,2 x 10 <sup>0</sup>	9,8 x 10 <sup>3</sup> ±9,3 x 10 <sup>3</sup>	1,2 x 10 <sup>2</sup> ±7,2 x 10 <sup>1</sup>
S7 (Kläranlage 3, Zulauf)	6,5 x 10 <sup>6</sup> ±4,7 x 10 <sup>6</sup>	6,6 x 10 <sup>2</sup> ±9,5x10 <sup>1</sup>	1,4 x 10 <sup>4</sup> ±9,3 x 10 <sup>3</sup>	1,8 x 10 <sup>4</sup> ±1,0 x 10 <sup>4</sup>
S8 (Kläranlage 3, Ablauf)	5,4 x 10 <sup>3</sup> ±3,5 x 10 <sup>3</sup>	2,6x10 <sup>0</sup> ±2,2 x 10 <sup>0</sup>	4,4 x 10 <sup>2</sup> ±3,2 x 10 <sup>2</sup>	1,4 x 10 <sup>2</sup> ±9,1 x 10 <sup>1</sup>
S9 (Kläranlage 4, Zulauf)	4,2 x 10 <sup>5</sup> ±2,7 x 10 <sup>5</sup>	1,8 x 10 <sup>1</sup> ±1,1 x 10 <sup>1</sup>	3,1 x 10 <sup>3</sup> ±2,1 x 10 <sup>3</sup>	4,6 x 10 <sup>4</sup> ±2,0 x 10 <sup>4</sup>
S10 (Kläranlage 4, Ablauf)	9,5 x 10 <sup>2</sup> ±7,6 x 10 <sup>2</sup>	2,1 x 10 <sup>0</sup> ±1,5 x 10 <sup>0</sup>	8,7 x 10 <sup>1</sup> ±6,3 x 10 <sup>1</sup>	8,7 x 10 <sup>2</sup> ±6,6 x 10 <sup>2</sup>
<b>Oberflächenwasser</b>				
S11 (Donau)	9,5 x 10 <sup>1</sup> ±5,8 x 10 <sup>1</sup>	1,2 x 10 <sup>0</sup> ±1,1 x 10 <sup>0</sup>	8,9 x 10 <sup>1</sup> ±5,2 x10 <sup>1</sup>	8,7 x 10 <sup>1</sup> ±5,9 x 10 <sup>1</sup>
S12 (Lone)	3,9 x 10 <sup>1</sup> ±4,9 x 10 <sup>0</sup>	1,7 x 10 <sup>0</sup> ±1,3 x 10 <sup>0</sup>	3,5 x 10 <sup>1</sup> ±2,6 x 10 <sup>1</sup>	3,6 x 10 <sup>1</sup> ±2,8 x 10 <sup>1</sup>
S13 (Nau)	9,1 x 10 <sup>1</sup> ±1,1 x 10 <sup>1</sup>	1,7 x 10 <sup>0</sup> ±1,4 x 10 <sup>0</sup>	6,9 x 10 <sup>1</sup> ±5,4 x 10 <sup>1</sup>	7,4 x 10 <sup>1</sup> ±5,5 x 10 <sup>1</sup>
<b>Regenüberlaufbecken</b>				
S14 (ROB1)	1,5 x 10 <sup>3</sup> ±7,2 x 10 <sup>2</sup>	1,4 x 10 <sup>1</sup> ±9,8 x 10 <sup>0</sup>	8,5 x 10 <sup>2</sup> ±5,5 x 10 <sup>2</sup>	7,6 x 10 <sup>3</sup> ±6,6 x 10 <sup>3</sup>
S15 (ROB2)	3,9 x 10 <sup>2</sup> ±2,3 x 10 <sup>2</sup>	1,3 x 10 <sup>1</sup> ±9,5 x 10 <sup>0</sup>	2,8 x 10 <sup>4</sup> ±2,6 x 10 <sup>4</sup>	3,4 x 10 <sup>3</sup> ±3,1 x 10 <sup>3</sup>
S16 (ROB3)	1,7 x 10 <sup>4</sup> ±4,5 x 10 <sup>3</sup>	6,0 x 10 <sup>1</sup> ±4,4 x 10 <sup>1</sup>	3,1 x 10 <sup>3</sup> ±2,0 x 10 <sup>3</sup>	2,7 x 10 <sup>3</sup> ±2,4 x 10 <sup>3</sup>
S17 (ROB4)	1,7 x 10 <sup>3</sup> ±6,8 x 10 <sup>2</sup>	6,8 x 10 <sup>1</sup> ±5,1 x 10 <sup>1</sup>	2,3 x 10 <sup>3</sup> ±1,8 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>4</sup> ±3,3 x 10 <sup>3</sup>
<b>Grundwasser</b>				
S18 (GW1, 7721)	1,7 x 10 <sup>0</sup> ±1,4 x 10 <sup>0</sup>	1,5 x 10 <sup>0</sup> ±1,3 x 10 <sup>0</sup>	1,7 x 10 <sup>0</sup> ±1,5 x 10 <sup>0</sup>	1,8 x10 <sup>0</sup> ±1,6 x 10 <sup>0</sup>
S19 (GW2, 7106)	1,9 x 10 <sup>0</sup> ±1,5 x 10 <sup>0</sup>	1,5 x 10 <sup>0</sup> ±1,3 x 10 <sup>0</sup>	1,6 x 10 <sup>0</sup> ±1,4 x 10 <sup>0</sup>	1,9 x10 <sup>0</sup> ±1,7 x 10 <sup>0</sup>
S20 (GW3, 7103)	1,3 x 10 <sup>0</sup> ±1,0 x 10 <sup>0</sup>	1,2 x 10 <sup>0</sup> ±1,1 x 10 <sup>0</sup>	1,3 x 10 <sup>0</sup> ±1,1 x 10 <sup>0</sup>	1,4 x 10 <sup>0</sup> ±1,3 x 10 <sup>0</sup>

### 3.1.2.2 Kommunale Kläranlagen

#### Kläranlage 1 (S3, S4)

Kläranlage 1 ist die größte der untersuchten Kläranlagen und behandelt Abwasser von ca. 445.000 Einwohnern. Nach konventioneller Aufbereitung weist der Kläranlagenauslauf eine Zunahme von 3 der 4 untersuchten Antibiotikaresistenzgene (*blaVIM*, *vanA*, *ampC*) in der Bakterienpopulation auf (Tabelle 11). Die Höhe der Zunahme der Resistenzgene *vanA*, *blaVIM* und *ampC* zeigt einen bis zu 7-fachen Anstieg. Im Gegensatz dazu nimmt der Antibiotikaresistenzmarker für die Erythromycinresistenz (*ermB*) durch die Abwasserklärung um bis zu 98% ab. Die Abundanz des Enterokokken Genmarkers nimmt vom Zulauf zum Ablauf ebenfalls ab. Trotz seiner Dominanz gegenüber den anderen taxonomischen Markern reduziert sich der Anteil an Enterokokken in der Bakterienpopulation im Auslauf (S4) um ca. 90%. Wird

das Abwasservolumen mitberücksichtigt, erhöht sich die Reduktion auf ca. 99,5% (Tabelle 14). Im Gegensatz dazu waren die Abundanzen für *P. aeruginosa*, Enterobakterien und auch MRSA sowie CNS in der Bakterienpopulation (pro 100 ng DNA) des Auslaufs um das bis zu 3-fache erhöht. Unter Berücksichtigung des aufgearbeiteten Volumens (pro 100 mL) nehmen die Abundanzen aller untersuchten opportunistischen Bakterien ab, wobei die Reduktion von *P. aeruginosa* am geringsten ausfällt (Tabelle 14).

#### Kläranlage 2 (S5, S6)

Im Vergleich zur kommunalen Großkläranlage 1 behandelt die kommunale Kläranlage 2 ein weitaus geringeres Abwasservolumen von ca. 16.600 Einwohnernwerten. In Übereinstimmung mit den Tendenzen zur Antibiotikaresistenzzunahme im Ablauf der Kläranlage 1 nehmen auch die Abundanzen für *vanA*, *blaVIM* und *ampC* um das bis zu 12-fache im Ablauf der Kläranlage 2 (Tabelle 11, S6) zu. Das Erythromycinresistenzgen *ermB* nimmt, ähnlich der Kläranlage 1, durch die konventionelle Klärung sowohl in der Population pro 100 ng DNA (Reduktion 84%), als auch im untersuchten Abwasservolumen pro 100 mL ab (>99%, Tabelle 11 und 13). Bei den untersuchten taxonomischen Parametern reduziert Kläranlage 2 sowohl Enterokokken als auch Staphylokokken (MRSA und CNS) in 100 ng DNA zwischen 80 und 87%. Im Gegensatz dazu erhöht sich die Abundanz an *P. aeruginosa* im Ablauf von Kläranlage 2 in 100 ng DNA um mehr als das 10-fache (Tabelle 12). Volumenbezogene Reduktionen pro 100 mL liegen für alle taxonomischen Gen-Marker zwischen 90% und 99,9%, wobei auch hier für *P. aeruginosa* die geringste Reduktion nachgewiesen wurde.

#### Kläranlage 3 (S7, S8)

Kläranlage 3 behandelt Abwasser von ca. 16.000 Einwohnerwerten und weist damit eine ähnlich große Dimensionierung wie Kläranlage 2 auf. Im Unterschied zu Kläranlage 1 und 2 befindet sich kein Krankenhaus im Einzugsgebiet dieser Kläranlage. Dies könnte der Grund dafür sein, dass die Abundanzen der Antibiotikaresistenzgene *vanA*, *ampC* und *ermB* bis zu 2,4-fachen geringer im Kläranlagenzulauf (S7) ausfallen als in Kläranlage 2 (S5, Tabelle 11). Nur die Imipenemresistenz *blaVIM* weist eine höhere Konzentration pro 100 ng DNA im Kläranlagenzulauf (S7) auf, als im Zulauf der Kläranlage 2 (S5, Tabelle 11). Trotz der geringeren Ausgangskonzentration steigen die Abndanzen für *vanA*, *blaVIM* und *ampC* im Kläranlagenauslauf (S8) analog zu den Kläranlagen 1 und 2 relativ zur Population pro 100 ng DNA an. Auch Kläranlage 3 reduziert *ermB* um bis zu 99,7% in der Population des Kläranlagenauslaufs. Die taxonomischen Abundanzen pro 100 ng DNA für Enterokokken, *P.*

*aeruginosa*, MRSA und CNS wurden zwischen 87% und 99,8% reduziert (Tabelle 12). Die volumenbezogenen Abundanzen pro 100 mL zeigen ähnlich starke Reduktionen im Ablauf, wie die Populationsanteile pro 100 ng Gesamt-DNA (S8, Tabelle 14).

#### Kläranlage 4 (S9, S10)

Kläranlage 4 ist die kleinste der untersuchten Kläranlagen und besitzt ein Einzugsgebiet von 2.500 Einwohnern. Der Zulauf (S9) weist ähnliche Abundanzen aller 4 Antibiotikaresistenzgene auf, wie in den anderen untersuchten Kläranlagen ( $10^3$  bis  $10^5$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA, Tabelle 11). Im Unterschied dazu weist der Ablauf (S10) im Vergleich zu den Kläranlagenabläufen S4, S6 und S8 nur eine geringe Veränderung der Abundanzen pro 100 ng DNA auf. So ist der Anstieg der Antibiotikaresistenzgene *blaVIM*, *vanA* und *ampC* weitaus geringer (bis zu 4-fach) als im Ablauf S4 (bis zu 7-fach), S6 (bis zu 14-fach) und S8 (bis zu 9-fach). Wie auch in den Abläufen der anderen Kläranlagen wird das Erythromycinresistenzgen in der Bakterienpopulation um mehr als 2 Zehnerpotenzen reduziert (99,7%). Auch Staphylokokken (MRSA/CNS) und Enterokokken pro 100 ng DNA sind im Auslauf (S10) zwischen 68% bzw. 95% reduziert. Im Gegensatz dazu bleiben die Abundanzen von *P. aeruginosa* und *Enterobacteriaceae* in der Bakterienpopulation fast unverändert. Volumen bezogene Abundanzen pro 100 mL bestätigen dem Ablauf der Kläranlage 4 im Durchschnitt die geringste Belastung mit opportunistischen Bakterien aller untersuchten Kläranlagenabläufe (Tabelle 14).

Die Untersuchungen verschiedener Kläranlagen im Untersuchungsgebiet Donauried belegen einen generellen Anstieg von 3 der 4 untersuchten Antibiotikaresistenzen in der Abwasserpopulation nach konventioneller Klärung. Im Gegensatz dazu zeigt die Tendenz der untersuchten opportunistischen Bakterien fast immer eine Reduktion nach der konventionellen Abwasserreinigung. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Zusammensetzung der Abwasserpopulation im Zulauf der Kläranlagen eine andere ist als im jeweiligen Ablauf. Veränderungen in den Populationsanteilen haben einen Einfluss auf die Abundanzen von Antibiotikaresistenzgenen. Es ist bekannt, dass der Belebtschlamm in Kläranlagen Einfluss auf die mikrobielle Diversität hat und er aufgrund der partikelgebundenen Plasmide sowie der höheren Konzentrationen von adsorbierten Antibiotika gegenüber der Wasserphase zur Induktion von Gentransferereignissen kommen kann (Zhang et al., 2013; Biswal et al., 2014; Hong et al., 2014).

Weiterhin zeigte jede der untersuchten Kläranlagen Unterschiede in der anfänglichen Antibiotikaresistenzgenkonzentration, sowie unterschiedlicher Reduktionen und Akkumulationen opportunistischer Bakterien. Chemische Analysen der untersuchten

Kläranlagen zeigten ebenfalls unterschiedliche Konzentrationen an Antibiotika und Antibiotikametaboliten, sowie verschiedene Zusammensetzungen dieser Substanzen in jedem Abwasser (Kapitel 3.1.3.2, Tabelle 15). Doch auch niedrig konzentrierte Antibiotika induzieren eine Vielfalt an genetischen Reaktionen, was zu Adaptation, Mutation und HGT führen kann (Davies et al., 2006; Kohanski, DePristo, & Collins, 2010). Diese Vorgänge sind mitverantwortlich für die Anreicherung von antibiotikaresistenten Bakterien in der Population während der Abwasserbehandlung.

### 3.1.2.3 Oberflächengewässer

Donau, Nau und Lone (S11, S12, S13)

Die gemessenen DNA-Konzentrationen in der Donau (S11, 231 ng DNA pro 100 mL) und in der Nau (S13, 609 ng DNA pro 100 mL) liegen teilweise um ein vielfaches höher als die DNA-Konzentrationen in der Lone (181 ng pro 100 mL, Tabelle 9). Dies ist ein Hinweis auf den anthropogenen Einfluss der lokalen Kläranlagen, die die beiden erst genannten Gewässer als Vorfluter nutzen. Wasserproben wurden jeweils flussabwärts vom Kläranlagenauslauf genommen. Wasserproben der Lone (S12) wurden am Quelltopf genommen ohne direkten anthropogenen Einfluss durch Abwasser. Bis zu 2 L waren hier nötig, um genügend DNA für alle molekularbiologischen Untersuchungen extrahieren zu können. In allen 3 Oberflächengewässern wurden Resistenzgene gegen Vancomycin, Imipenem, Erythromycin und Ampicillin gefunden (Tabelle 11). Die höchsten Abundanzen pro 100 ng DNA wurden in der Donau (S11) und in der Nau (S13) gemessen (bis zu  $1,2 \times 10^5$ ,  $8,3 \times 10^4$  und  $2,5 \times 10^5$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA für *blaVIM*, *ampC* und *ermB* in der Nau und bis zu  $9,3 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA für *vanA* in der Donau, Tabelle 11). In der Lone wurden bis zu 71% geringere Abundanzen gemessen (Tabelle 11), was auf den fehlenden Abwasseranteil aus Kläranlagen zurückgeführt werden könnte.

Alle untersuchten opportunistischen Bakterien wurden in jedem Oberflächengewässer nachgewiesen. Die Abundanzen der Antibiotikaresistenzgene waren bis zu einer Zehnerpotenz höher als die taxonomischen Marker für opportunistische Bakterien. Dabei liegen die gefundenen Resistenzkonzentrationen in der Bakterienpopulation in den Oberflächengewässern teilweise auf einem ähnlich hohen Niveau wie die der Kläranlagenausläufe (Tabelle 11). Diese Befunde belegen einen starken Einfluss der Kläranlagen auf die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen in der Bakterienpopulation lokaler Gewässer. Dieser Effekt wird nur sichtbar, wenn der Verdünnungseffekt der Gewässer und Kläranlagenabläufe vernachlässigt wird (Vergleich Tabelle 11 und 13, sowie 12 und 14). Mit Berücksichtigung des Gewässervolumens werden in der Lone weniger als 50 Zelläquivalente pro 100 mL für alle

Resistenzgene, und weniger als 100 Zelläquivalente pro 100 mL in den Gewässern Donau und Nau detektiert.

Die mikrobiologischen Untersuchungen zeigen im Vergleich zu deren Anteilen in der Population nur geringe Abundanzen an opportunistischen Bakterien und klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen im untersuchten Volumen von Oberflächen- und Grundwässern an. So zeigen die Zelläquivalente für *P. aeruginosa*  $6,9 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA in der Donau an, während unter der Berücksichtigung des Volumens nur noch  $8,9 \times 10^1$  Zelläquivalente pro 100 mL errechnet wurden. Dieser Vergleich zeigt das Problem von Volumen basierten Konzentrationsangaben in der Mikrobiologie auf. Während populationsbezogene Abundanzen eine klare Belastungssituation beschreiben, indem der quantifizierte Anteil innerhalb einer vorhandenen Biomasse dargestellt ist, verschleiert der Verdünnungseffekt des Volumens das vorherrschende Risikopotential. Diese Problematik wird umso wichtiger, wenn das durch die Wassermatrix beeinflusste Proliferationspotential der Mikroorganismen berücksichtigt wird. D. h. durch den vorherrschenden Nährstoffgehalt im Gewässer und den angereicherten Antibiotikaresistenzgenen in den Bakterien nach der Abwasserklärung wird das Potential der Antibiotikaresistenzausbreitung durch das Bakterienwachstum im Gewässer in volumenbezogenen Konzentrationsangaben nicht erfasst. Durch die Beschreibung mikrobiologischer Parameter basierend auf der Gesamtpopulation können Persistenz, Proliferationspotential sowie daraus resultierende Risikopotentiale besser erkannt werden.

#### **3.1.2.4 Regenüberlaufbecken**

ROB1, ROB2, ROB3, ROB4 (S14, S15, S16, S17)

Nach schweren Regenfällen wurden auch Mischwasser aus 4 Regenüberlaufbecken auf Antibiotikaresistenzen und opportunistische Bakterien untersucht. Die gemessenen DNA-Konzentrationen lagen teilweise um das 10-fache über den Konzentrationen der Oberflächengewässer und erreichten fast das Niveau der Kläranlagenausläufe (875 – 1.785 ng DNA pro 100 mL). Die gefundenen Abundanzen an opportunistischen Bakterien zeigten nur geringe Dynamiken in allen Regenüberlaufbecken und lagen zwischen  $2,1 \times 10^2$  Zelläquivalenten für Staphylokokken (MRSA/CNS) und  $6,8 \times 10^4$  Zelläquivalenten pro 100 ng DNA für Enterokokken. Die Abundanzen für *blaVIM* lagen zwischen  $4,0 \times 10^3$  und  $6,8 \times 10^3$  Zelläquivalenten pro 100 ng DNA in allen untersuchten Regenüberlaufbecken. Neben *blaVIM* war *vanA* das am häufigsten detektierte Resistenzgen in den Bakterienpopulationen der Regenüberlaufbecken ROB1, ROB3 sowie ROB4 und lag zwischen  $1,6 \times 10^4$  und  $7,4 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA. Im Gegensatz dazu wurden im Regenüberlaufbecken ROB2 nur  $3,3 \times 10^3$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA für *vanA* gemessen. Die Abundanzen der



Antibiotikaresistenzgene *ampC* und *ermB* lagen mit Ausnahme des ROB4 zwischen  $4,5 \times 10^3$  und  $5,6 \times 10^3$  (*ampC*) und zwischen  $9,5 \times 10^2$  und  $2,1 \times 10^3$  (*ermB*) Zelläquivalenten pro 100 ng DNA. Im Regenüberlaufbecken ROB4 wurden mit  $1,4 \times 10^4$  Zelläquivalenten pro 100 ng DNA eine mehr als doppelt so hohe Abundanz an *ampC* gemessen. Im Gegensatz zu den erhöhten Anteilen an *ampC* in der Bakterienpopulation des ROB4, wurde dort die geringste Abundanz an *ermB* aller Regenüberlaufbecken gemessen ( $1,6 \times 10^2$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA). Die geringen Dynamiken der untersuchten Parameter in den einzelnen Regenüberlaufbecken lassen auf ähnliche mikrobielle Kontaminationen in den Schmutz- und Niederschlagswässern sowie mitgeführten Partikel fracht während der Starkregenereignisse schließen und wären eine Erklärung für die hohen Anteile von Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien in den jeweiligen Bakterienpopulationen. Bei Einleitung von Wasser aus den Regenüberlaufbecken in lokale Gewässer würde diese Anzahl an Bakterien einen erheblichen Anteil zu der Antibiotikaresistenz- und opportunistischen Bakterienbelastungssituation der Oberflächengewässer beitragen.

#### **3.1.2.5 Grundwässer**

GW1, GW2, GW3 (S18, S19, S20)

Unter Zustimmung des lokalen Trinkwasserzweckverbandes wurden 3 Grundwassermessstellen (S18, S19 und S20) auf mögliche mikrobiologische Kontaminationen mit klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien durch Sickerwasser aus umliegenden Flächen, insbesondere aus Deponien und Oberflächengewässern untersucht. Bei einer Biomasse von teilweise nur 19,96 ng DNA pro 100 mL mussten bis zu 7 L aufbereitet werden, um genügend DNA für alle molekularbiologischen Untersuchungen zu extrahieren (Tabelle 9).

Alle drei untersuchten Grundwassermessstellen wiesen jahreszeitlich bedingte Schwankungen in den Abundanzen der untersuchten mikrobiologischen Parameter auf. Antibiotikaresistenzgene für Imipenem, Vancomycin und Ampicillin wurden bis zu 10-fach häufiger in Bakterienpopulationen der Grundwässern S18 und S19 detektiert als in S20 (Tabelle 11). Im Gegensatz dazu, wurde *ermB* in weitaus geringeren Abundanzen gemessen. Von allen untersuchten Grundwassermessstellen wies S18 die höchsten Belastungen auf. Ein Hinweis auf eine mikrobielle Kontamination durch Sickerwasser der nahegelegenen Deponie ist nicht auszuschließen. Die höchsten Abundanzen traten nach Starkregenereignissen auf, was weitere Kontamination durch andere Quellen wie Abschwemmungen aus Landwirtschaft, Gülle oder anderen anthropogenen Einflüssen nahelegt.

Taxonomische Abundanzen für Enterokokken, MRSA/CNS, *P. aeruginosa* und *Enterobacteriaceae* waren vor allem in S20 sehr gering (Tabelle 12). Diese korrelieren nicht mit den Abundanzen der gefundenen Antibiotikaresistenzgene (Tabelle 11) und sind ein Hinweis auf Transferereignisse klinisch relevanter Resistenzgene auf autochthone Umweltbakterien. Mit Berücksichtigung des aufgearbeiteten Wasservolumens (100 mL) reduzieren sich die mikrobiologischen Belastungen in allen Grundwassermessstellen auf weniger als 3 Zelläquivalente pro 100 mL (Tabelle 13 und 14).

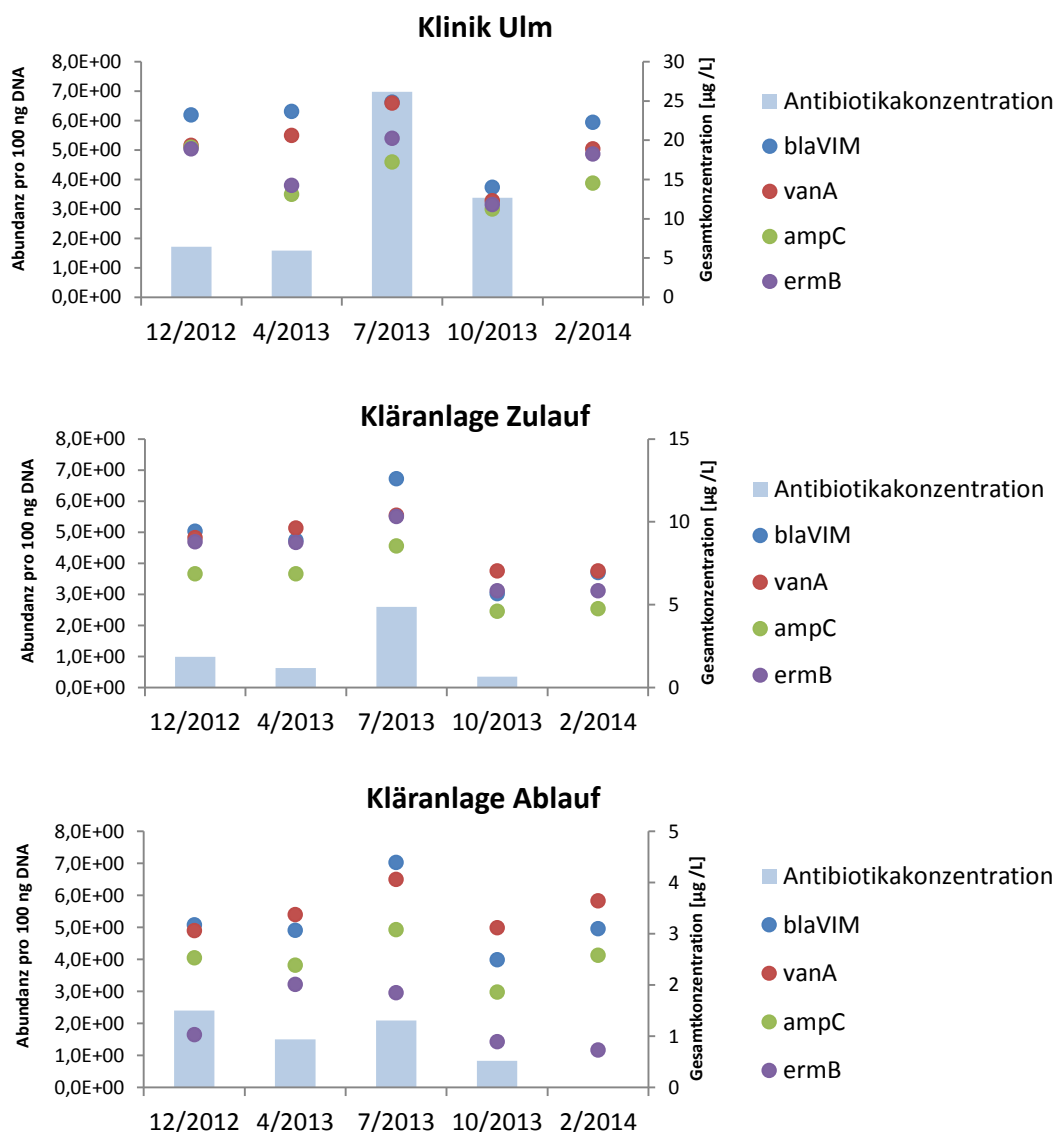
Jedoch zeigen die Ergebnisse der populationsbezogenen Analysen (pro 100 ng DNA), dass die Anteile an opportunistischen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in der Gesamtpopulation in 2 der 3 untersuchten Grundwassermessstelle im Vergleich zu den untersuchten Oberflächengewässern nur geringfügige Unterschiede aufweisen. Daher ist davon auszugehen, dass es sich lediglich um einen Verdünnungseffekt handelt, da die Probenahmestellen in einem Karstgebiet liegen und durch die Karsthydrogeologie das Grundwasser generell anfälliger für chemische und mikrobiologische Einflüsse ist (Pronk et al., 2009). Aufgrund der geringen Bodenretention und stärkeren Fließgeschwindigkeit des Grundwassers ist das Risiko einer mikrobiologischen Kontamination des Grundwasserleiters im Donauried erhöht.

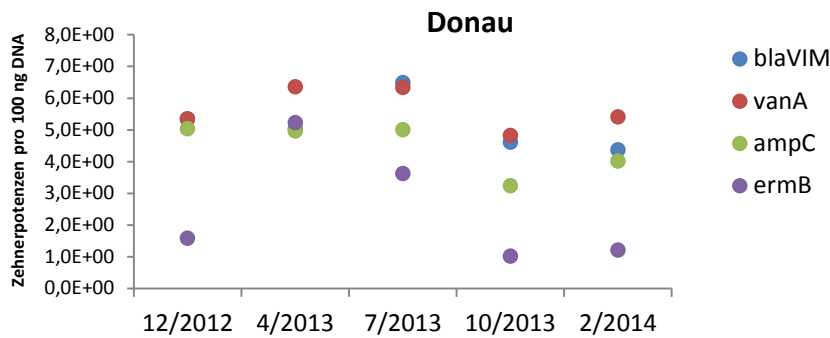
### **3.1.3 Jahreszeitliche Schwankungen von Antibiotikaresistenzen in Korrelation zur Antibiotikakonzentration**

#### **3.1.3.1 Abundanz der Antibiotikaresistenzen**

Niederschlagsereignisse, Kläranlagenabläufe, Regenwasserentlastungen und Abschwemmungen aus der Land- und Viehwirtschaft sind die Hauptfaktoren für den Eintrag von Antibiotikaresistenzgenen (ARG) und opportunistischen Bakterien in die angrenzenden Oberflächengewässer. Um den Einfluss von Krankenhausabwasser auf die ARG-Situation in einer lokalen Kläranlage und im nachfolgenden Gewässer zu untersuchen, wurden die ARG-Konzentrationen ausgehend vom Klinikum (S1) über die nachfolgende Großkläranlage (S3 und S4) sowie der angrenzende Vorfluter (Donau S11) in Zeitintervallen dargestellt (Abbildung 11). Die Antibiotikakonzentrationen wurden nur bis zum Ablauf der Kläranlage aufgezeichnet (Tabelle 15). Ausgehend vom Klinikabwasser zeigt das Muster der untersuchten ARG-Abundanzen einen ähnlichen zeitlich abhängigen Verlauf durch alle nachfolgenden wasserführenden Systeme. Der Verlauf der ARG-Abundanzen im Klinikabwasser vom Dezember 2012 ( $1,2 \times 10^5$  Zelläquivalente für *vanA*, *ampC* und *ermB*, sowie  $1,6 \times 10^6$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA für *blaVIM*), über April 2013, bis zum Juli 2013 ( $1,6 \times 10^6$  Zelläquivalente für *vanA* und *blaVIM* pro 100 ng DNA) findet sich auch in ähnlich starker Ausprägung im Zulauf der Kläranlage Steinhäule (S3) wieder, ebenso wie die Abnahme der ARG-Abundanzen im Oktober

2013 und erneutem Anstieg im Januar 2014 (Abbildung 11). Neben dem Antibiotikaresistenzmuster weist die Änderung in der Ausprägung der Antibiotikaresistenzgenabundanzen innerhalb eines Messzeitraumes der verschiedenen Messstellen jedoch auf unterschiedliche Selektionsdrücke innerhalb der jeweiligen Population hin. Der Kläranlagen Ablauf (S4) zeigt einen ähnlichen zeitlich bedingten Verlauf der ARG-Abundanz trotz Berücksichtigung der *ermB*-Reduktion und dem Anstieg der Antibiotikaresistenzgene *blaVIM*, *vanA* und *ampC*. Ein ähnliches zeitenabhängiges Muster der ARG-Abundanz wurde auch in der Donau nachgewiesen, allerdings weisen die stärker werdenden Abweichungen (z.B. *ermB* Abundanz im April 2013) auf weitere anthropogene Einflüsse hin.





**Abbildung 11** Muster der Antibiotikaresistenzgene in der bakteriellen Gesamtpopulation und gemessenen Gesamtantibiotikakonzentration, hier als Summenparameter dargestellt, ausgehend vom Klinikabwasser, über die lokale Kläranlage bis in die Donau aus 5 Probenkampagnen.

### 3.1.3.2 Abundanz der Antibiotika

Antibiotika in Abwässern besitzen aufgrund der starken Verdünnung kaum mehr bakterizide oder bakteriostatische Eigenschaften. Dennoch können sie Selektionsereignisse, Mutationen und andere Arten der Adaptation hervorrufen (Davies et al., 2006). Daher wurden chemische Analysen von der Landeswasserversorgung Langenau durchgeführt, um einerseits die tatsächliche Belastungssituation von Antibiotika im Abwasser festzustellen und andererseits auch mögliche Korrelationen mit Antibiotikaresistenzen zu untersuchen. Mehrere chemische Untersuchungen im Jahr 2013 belegen die höchste Antibiotikakonzentration im Abwasser während der Sommermonate (Juli, Tabelle 15). Diese Belastungssituation korreliert mit der höchsten Abundanz an Antibiotikaresistenzen in der nachfolgenden Kläranlage und Oberflächengewässer (Abbildung 11). Weiterhin ergaben die Messungen für einige der untersuchten Antibiotika eine höhere Konzentration im Ablauf der Kläranlage als im Zulauf des gleichen Messzeitraums (Tabelle 15). Dies weist auf eine schwache Depotwirkung und zeitversetzte Freisetzung innerhalb der Abwasserklärung hin. So zeigen die gemessenen Werte für Metronidazol generell höhere Konzentrationen im Kläranlagenauslauf von bis zu 0,04 µg pro L (Juli). Auch die Roxithromycin-Konzentration war mit 0,14 µg pro L im Auslauf der Kläranlage höher als im Zulauf innerhalb desselben Untersuchungszeitraums (0,07 µg pro L, April). Die höchste Depotwirkung/zeitversetzte Freisetzung wurde bei Trimethoprim festgestellt. Mit bis zu 0,1 µg pro L im Auslauf, während die Konzentration im Zulauf unterhalb der Nachweisgrenze lag (Tabelle 15, Oktober). Dieser Effekt ist ein Hinweis auf unterschiedliche Verweilzeiten von Antibiotika/Antibiotikametaboliten innerhalb des Klärprozesses. Durch die lokale Erhöhung der Antibiotikakonzentration innerhalb der Kläranlage steigt auch der Selektionsdruck auf die Mikroorganismen gegenüber diesem Antibiotikum. Auch wenn sich die Konzentration der akkumulierten Antibiotika weiterhin unterhalb der minimalen Hemmkonzentration befindet, die abhängig vom Bakterium und verwendeten Antibiotikum bei bis zu mehreren mg pro L liegen kann, so erhöht sich dennoch die Wahrscheinlichkeit, dass durch einen Antibiotika-

konzentrationsgradienten im Abwasser eine Verbreitung von Antibiotikaresistenzen innerhalb der Abwasserpopulation induziert wird.

**Tabelle 15** Konzentrationen von Antibiotika und Antibiotikametaboliten in Klinikabwasser und in der nachfolgenden Kläranlage (LOD: Limit of Detection, NS: No Signal).

Substanz [ $\mu\text{g/L}$ ]	Klinik 1			Zulauf Kläranlage 1 (S3)			Ablauf Kläranlage 1 (S4)					
	Dez. 2012	April 2013	Juli 2013	Okt. 2013	Dez. 2012	April 2013	Juli 2013	Okt. 2013	Dez. 2012	April 2013	Juli 2013	Okt. 2013
(Dehy-)Erythromycin	NS	0,14	0,22	0,04	NS	0,03	0,04	0,08	NS	0,05	0,03	0,09
Acetyl-Sulfamethoxacol	1,80	2,30	14,00	3,10	0,32	0,43	0,73	0,32	0,03	0,14	0,10	0,04
Chloroamphenicol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Chlortetracyclin	<LOD	NS	<LOD	<LOD	<LOD	NS	<LOD	<LOD	<LOD	NS	<LOD	<LOD
Clarithromycin	1,00	NS	1,50	6,70	0,36	0,21	0,17	0,16	0,32	0,14	0,06	0,13
Doxicyclin	<LOD	NS	1,00	1,60	<LOD	NS	0,11	<LOD	<LOD	NS	0,03	<LOD
Erythromycin	NS	0,14	0,14	0,09	NS	0,06	0,07	0,13	NS	0,07	0,07	0,14
Metronidazol	1,40	1,80	2,50	<LOD	<LOD	0,05	<LOD	<LOD	0,03	0,07	0,04	0,04
Oxytetracyclin	NS	NS	<LOD	<LOD	NS	NS	<LOD	<LOD	NS	NS	<LOD	<LOD
Roxithromycin	0,06	<LOD	0,05	<LOD	0,91	0,07	0,05	0,06	0,93	0,14	<LOD	0,07
Sulfadiazin	0,58	<LOD	0,07	NS	<LOD	<LOD	0,10	NS	<LOD	<LOD	0,04	NS
Sulfadimidin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Sulfamerazin	<LOD	<LOD	<LOD	NS	<LOD	<LOD	<LOD	NS	<LOD	<LOD	<LOD	NS
Sulfamethoxacol	0,65	0,72	2,10	NS	0,15	0,26	2,80	NS	0,09	0,20	0,67	NS
Tetrycyclin	0,10	NS	1,00	<LOD	0,03	NS	0,11	<LOD	<LOD	NS	0,03	<LOD
Trimethoprim	0,86	1,00	3,80	1,20	0,08	0,11	0,73	<LOD	0,10	0,18	0,27	0,10
<b>Gesamtkonzentration</b>	<b>6,45</b>	<b>6,10</b>	<b>26,38</b>	<b>12,73</b>	<b>1,85</b>	<b>1,22</b>	<b>4,91</b>	<b>0,75</b>	<b>1,50</b>	<b>0,99</b>	<b>1,34</b>	<b>0,61</b>

### **3.1.4 Zusammenfassung der mikrobiologischen Charakterisierung in den untersuchten wasserführenden Systemen in der Modellregion Donauried**

Untersuchungen verschiedener aquatischer Habitate im Donauried bestätigen die Verbreitung von opportunistischen Bakterien und klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen in der Umwelt. Darüber hinaus wurde ein deutlicher Einfluss von Kläranlagen auf die Bakterienpopulationen in Vorflutern festgestellt. Allerdings zeigte sich auch, dass nicht nur Kläranlagen, sondern auch Regenüberlaufbecken und Sickerwasser aus Deponien und landwirtschaftlichen Einträgen zur mikrobiologischen Gesamtsituation in den Gewässern beitragen können. Populations-bezogene Analysen zeigen, dass die konventionelle Abwasseraufreinigung nicht dafür geeignet ist, Antibiotikaresistenzen und opportunistische Keime effektiv zu reduzieren. Im Gegenteil, die gefundenen Abundanzen bestätigen einen Anstieg von 3 der 4 untersuchten klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgene in der Bakterienpopulation von Kläranlagenausläufen. Diese Entwicklung wird meist durch den Verdünnungseffekt der untersuchten Wasservolumina maskiert. Aufgrund des Vermehrungspotentials von Mikroorganismen, im Gegensatz zu chemischen Kontaminanten, ist dieser Effekt jedoch kritisch zu bewerten.

Untersuchungen zum Verbreitungspotential von klinisch relevanten Mikroorganismen durch Kläranlagen in den letzten Jahren bestätigten ebenfalls eine Zunahme an multiresistenten Bakterien nach konventioneller Klärung (Czekalski et al., 2012). Jedoch ist zu berücksichtigen, dass klinisch relevante Antibiotikaresistenzen nicht an einzelne Mikroorganismen gebunden sind, sondern eine Vielzahl dieser Gene auf mobilen genetischen Elementen (Plasmide, Transposons, Integrons) lokalisiert wurden. Diese Elemente können zudem zusätzlich mit Schwermetallresistenzen oder Enzymen für biologische Abbauprozesse assoziiert sein (Dealtry et al., 2014; Seiler & Berendonk, 2012). Diese räumliche Assoziation kann zur Co-Selektion führen und unter geeigneten Stimuli, die unabhängig von Antibiotika sein können, zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzen beitragen.

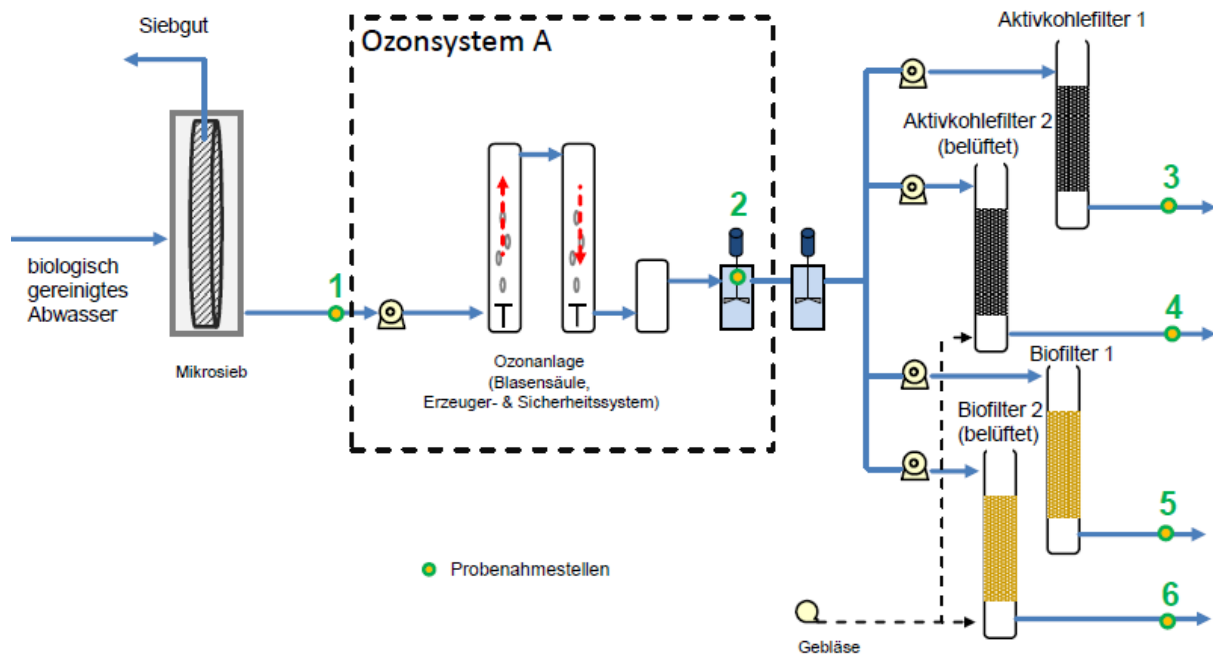
Die über den 2-jährigen Untersuchungszeitraum gefundenen Ergebnisse zum Vorkommen von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien innerhalb technischer Abwassersysteme weisen sowohl auf unterschiedliche Belastungssituationen, als auch auf unterschiedliche Entwicklungen dieser Parameter hin. Es ist nicht auszuschließen, dass die Anreicherung von Antibiotikaresistenzgenen zukünftig auch Einfluss auf die Trinkwasseraufbereitung haben könnte. Ältere Studien haben klinisch relevante Antibiotikaresistenzen schon in autochthonen Bakterien aus Biofilmen des Trinkwasserverteilungssystems in den USA (Armstrong et al., 1981; Xi et al., 2009), Griechenland (Papapetropoulou et al., 1994; Papandreou et al., 2000), Indien (Pathak et al., 1993), Libanon

(Tokajian und Hashwa 2004), Ägypten (El-zanfaly, 1991), Argentinien (Crdoba et al., 2001), und Deutschland (Schindler & Metz, 1991; Schwartz et al., 2003) nachgewiesen sowie die Transmission von Antibiotikaresistenzen aus dem Trinkwasser auf Bakterien des humanen Verdauungssystems (Lee et al., 2010). Allerdings ist der Einfluss von Antibiotikaresistenzen in Trinkwasserbakterien in Bezug auf die Gesundheitsfrage des Menschen noch nicht geklärt.

### **3.2 Mikrobiologische Charakterisierung einer Ozonbehandlung an der Kläranlage Südhessen**

Bisherige Untersuchungen von weiterführenden Abwasserbehandlungsmaßnahmen wie der Ozonung nutzten größtenteils nur kulturelle Verfahren mit Indikatorbakterien, um die Effizienz des Systems zu beschreiben (Lüddeke et al., 2015; Blatchley et al., 2012; Mezzanotte et al., 2007). Dadurch werden andere opportunistische Bakterien von hygienischer Relevanz wie *P. aeruginosa* sowie das Risiko der Antibiotikaresistenzsituation und -verbreitung nicht ausreichend erfasst. Im Gegensatz dazu geben DNA-bezogene Untersuchungen die Verteilung von Antibiotikaresistenzen und opportunistischen Bakterien in der Gesamtpopulation wieder, können zwischen lebenden und toten Populationsanteilen unterscheiden und sind nicht limitiert auf die Kultivierbarkeit von Bakterien (Alexander et al., 2016). Dadurch werden auch geschädigte Bakterien sowie lebende, aber sich nicht vermehrende Mikroorganismen (VBNC) erfasst.

Als weiterführender Abwasserreinigungsprozess wurde an der kommunalen Kläranlage Südhessen der Einfluss der Ozonbehandlung auf ausgewählte opportunistische Bakterien und die Antibiotikaresistenzlage im behandelten Abwasser untersucht. Dem Ozonsystem vorgeschaltet war ein Mikrofilter mit einer Porengröße von 10 µm, um größere partikuläre Bestandteile zurück zu halten. Während des Untersuchungszeitraumes wurde die Effektivität der Ozonung zur Inaktivierung der Bakterienfracht bei einer Konzentration von  $0,85 \pm 0,15$  g Ozon pro 1 g DOC sowie Kontaktzeiten von 10 - 15 Minuten untersucht (Abbildung 12). Die Einstellungen an der Ozonanlage wurden vom Betreiber der Anlage vorgegeben. Nachgeschaltet waren in paralleler Anordnung Filtereinheiten mit granulierter Aktivkohle (GAC) und Biofilter, jeweils als belüftete und unbelüftete Version (Durchflussraten von 4 bis 5 m pro h, Leerbettverweilzeit 25 bis 30 Minuten).



**Abbildung 12** Ozonbehandlung im Pilotmaßstab mit nachgeschalteten Filtersystemen

Um die Abundanzen der Antibiotikaresistenzgene und opportunistischen Bakterien in der Bakterienpopulation vor und nach Ozonbehandlung zu vergleichen, wurde vor der DNA-Extraktion eine Lebend/Tot-Diskriminierung mittels PMA (Kapitel 2.9) durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt. Diese Methode der Gesamt-DNA-Messung unterscheidet jedoch nicht zwischen PMA-inaktivierter DNA aus toten und geschädigten Bakterienzellen und intakten Bakterien. Erst die nachfolgende PCR-Reaktion diskriminiert zwischen DNA aus zuvor lebenden bzw. toten Bakterienzellen. DNA-Konzentrationen variierten zwischen 0,5 bis 5,5  $\mu\text{g}$  pro 100 mL im Zulauf des Ozonsystems und zwischen 0,4 bis 1,7  $\mu\text{g}$  pro 100 mL im Auslauf abhängig von der vorherrschenden Jahreszeit. Die niedrigeren DNA-Konzentrationen nach Ozonbehandlung resultierten neben den Ozon-induzierten DNA-Strangbrüchen auch noch vom Abbau durch die im Abwasser natürlich vorhandene DNasen (Rieder et al., 2008). Dieser Effekt verstärkt sich zusätzlich durch das Freisetzen intrazellulärer Nukleasen aus ozongeschädigten Bakterien.

### 3.2.1 Molekularbiologische Untersuchungen zur Antibiotikaresistenz-Abundanz

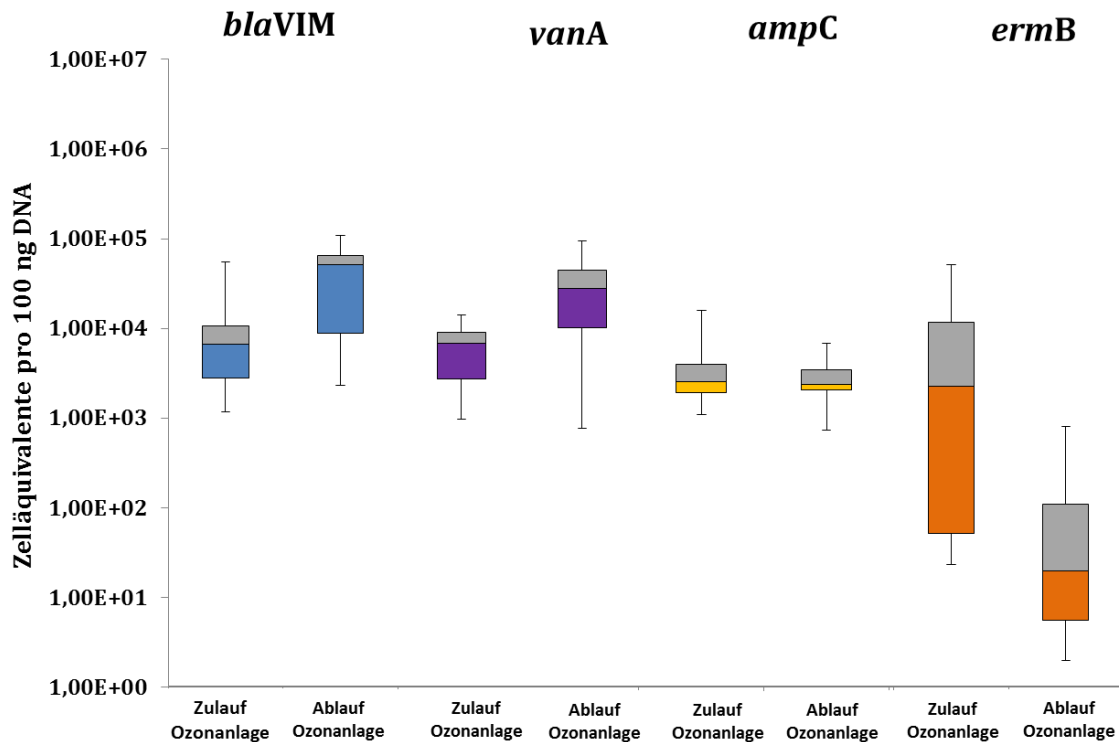
Als erweitertes Abwasserbehandlungsverfahren wurde der Effekt der Ozonung auf die Reduktion von ausgewählten klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien untersucht. Dazu wurden 24 h-Mischproben aus dem Zulauf und dem Ablauf der Ozonanlage untersucht und miteinander verglichen. Mit Bezug auf die Nachhaltigkeit eines Abwasserprozesses wurden alle klinisch relevanten mikrobiologischen



Abundanzen als Zelläquivalente in 100 ng DNA berechnet, um mögliche Selektionsereignisse zu erfassen. Über einen Zeitraum von 2 Jahren wurden 48 Wassermischproben untersucht, um den Einfluss der Ozonbehandlung auf die Abwasserpopulation zu charakterisieren.

Es wurden im Abwasser allgemeine Inaktivierungen der Bakterienfracht von bis zu 1,5 Zehnerpotenzen festgestellt. Bei der verwendeten Ozondosis kam es dabei zu einem Anstieg von 2 der 4 untersuchten Antibiotikaresistenzgene in der lebenden Bakterienpopulation des Ozonablaufs. Durch jahreszeitlich bedingte Schwankungen lagen die Abundanzen des Vancomycinresistenzgens (*vanA*) im Zulauf des Ozonsystems zwischen  $3,2 \times 10^3$  und  $1,0 \times 10^4$  Zelläquivalenten pro 100 ng DNA (Median:  $7,9 \times 10^3$  Zelläquivalente, Abbildung 13). Die Abundanzen im Ablauf des Ozonsystems betrugen zwischen  $1,3 \times 10^4$  und  $5 \times 10^4$  Zehnerpotenzen pro 100 ng DNA (Median:  $3,2 \times 10^4$ ), was einem 4-fachen Anstieg entspricht. Das 2. untersuchte Antibiotikaresistenzgen, das nach der Ozonbehandlung einen Anstieg in der Häufigkeit in der überlebenden Bakterienpopulation aufwies, war das Imipenemresistenzgen *blaVIM*. Dessen Abundanz schwankte während des Untersuchungszeitraums im Zulauf des Ozonsystems zwischen  $2,5 \times 10^3$  und  $1,0 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA (Median:  $6,3 \times 10^3$ ) und stieg nach Ozonbehandlung auf  $5,0 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA an (8-facher Anstieg). Im Gegensatz zum Vancomycinresistenzgen fielen die statistischen Schwankungen der Messwerte im Ablauf der Ozonanlage stärker aus. Die Abundanzen für *blaVIM* lagen dort zwischen  $7,9 \times 10^3$  und  $6,3 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA (Abbildung 13). Der Anstieg der Antibiotikaresistenzgene *vanA* und *blaVIM* in der überlebenden Bakterienpopulation nach Ozonbehandlung könnte an einer Selektion bakterieller *vanA*- und *blaVIM*-Genträger liegen, die offensichtlich eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Ozon zu besitzen scheinen. Da das Vancomycinresistenzgen *vanA* mit klinischen Isolaten von Enterokokken assoziiert wird, aber deren Abundanz nach Ozonbehandlung weitaus geringer ausfällt, ist eine positive Korrelation dieser Organismen mit der Abundanz für *vanA* im untersuchten Abwasser unwahrscheinlich. Jedoch konnten Untersuchungen zur genetischen Mobilität des *vanA*-Gens zeigen, dass es sowohl mit verschiedenen Transposons und unterschiedlichen Antibiotikaresistenzgenkassetten assoziiert sein kann, als auch auf andere Bakterienspezies übertragbar ist und dadurch in unterschiedlichen Umwelthabitaten vorkommen kann (Guardabassi and Dalsgaard 2004; Okitsu et al., 2005; Ramos et al., 2012). Im Gegensatz zu *vanA* korreliert der Anstieg des Antibiotikaresistenzgens *blaVIM* positiv mit der Abundanz von *P. aeruginosa*. Allerdings weist die Diskrepanz in der Abundanz zwischen *P. aeruginosa* und *blaVIM*-Zelläquivalenten auf zusätzliche Resistenzgenträger hin. Zur Identifizierung der am häufigsten vorkommenden Bakterienspezies wurde eine 16S Amplicon-Sequenzierung durchgeführt (Kapitel 3.2.3.2).

Aufgrund der Sequenzhomologie des Ampicillinresistenzgens (*ampC*) in verschiedenen *Enterobacteriaceae* und der Lokalisation dieser Resistenz auf verschiedenen mobilen genetischen Elementen wurde dieser Marker sowohl als Resistenzgen, als auch als taxonomischer Marker verwendet. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Resistenzgenen zeigte die Abundanz des *ampC*-Gens über den gesamten Untersuchungszeitraum eine gleichbleibende Verteilung in der lebenden Bakterienpopulation. Sowohl vor als auch nach Ozonung betrug die *ampC*-Abundanz  $2,5 \times 10^3$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA. Dieses Ergebnis bedeutet, dass *ampC*-tragende Bakterien weder einen Selektionsvorteil haben noch besonders anfällig gegenüber der Ozonbehandlung sind. Im Gegensatz zu den *ampC*-Untersuchungen weisen die gemessenen Werte für die *ermB*-Abundanzen sowohl auf hohe Schwankungen in der Bakterienpopulation als auch auf eine Sensitivität dieser Bakterien gegenüber Ozonung hin. Im Ozonzulauf betrugen die Abundanzen zwischen  $3,9 \times 10^1$  und  $1 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA und wurden auf  $1,2 \times 10^1$  Zelläquivalente im Ablauf reduziert. Dies entspricht einer Reduktion von bis zu 99,9%. Ein Hinweis auf die unterschiedliche Anfälligkeit von Bakterien gegenüber der Ozonbehandlung aufgrund bestimmter Antibiotikaresistenzen geben einige Untersuchungen zum Wirkverhalten von bakteriziden Antibiotika. Dort wurde gezeigt, dass bakterizide Antibiotika ( $\beta$ -Laktame oder Chinolon-Antibiotika), zu denen auch Vancomycin (Glykopeptid-Antibiotika) und Imipenem (Carbapenem) gehören, neben ihrem substanzspezifischen Wirkort in der Bakterienzelle einen zweiten komplementären Effekt aufweisen.



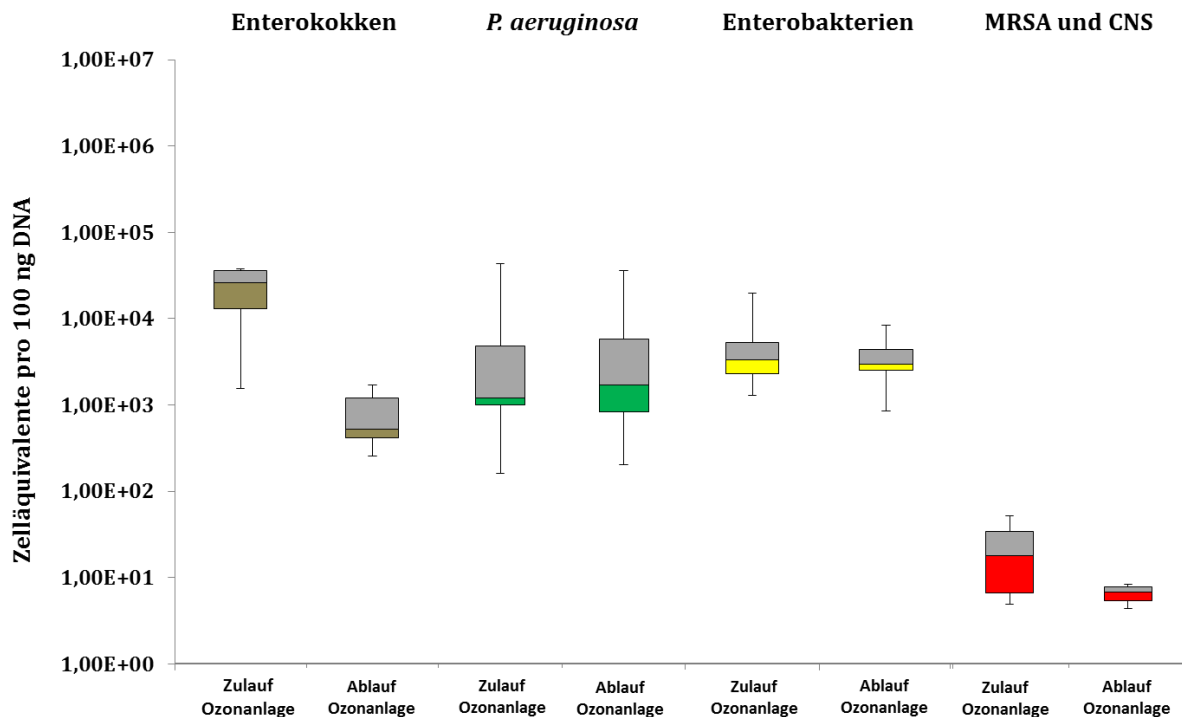
**Abbildung 13** Abundanzen der Untersuchten Antibiotikaresistenzgene in Zelläquivalenten pro 100 ng Gesamt-DNA. Analysiert wurden nur die lebenden Anteile der Bakterienpopulationen aus insgesamt 48 Probenahmen. Dargestellt sind die Abundanzen im Zulauf der Ozonbehandlung und im Ablauf.

Diese Klasse an Antibiotika induzierte die Bildung von Hydroxylradikalen, die durch oxidative Schäden an den Zellkompartimenten zum Bakterientod beitragen (Kohanski et al., 2007). Dieser Effekt, der nur bei bakteriziden Antibiotika beobachtet wurde, ist dabei mitverantwortlich für den Erfolg der Antibiotikabehandlung (Kohanski et al., 2010). Die Induktion von oxidativem Stress durch bakterizide Antibiotika in der Bakterienzelle würde Selektionsmechanismen induzieren, die nicht nur gegen das Antibiotikum gerichtet sind, sondern auch antioxidative Maßnahmen und Reparaturmechanismen aktivieren (z.B. *recA*). Bakterien, die dieser Art von Stress ausgesetzt wurden, darauf reagieren und überleben konnten, hätten aufgrund dieser Prädisposition einen erheblichen Vorteil bei oxidativen Verfahren gegenüber anderen nichtadaptierten Bakterien. Vancomycin, Imipenem und auch Ampicillin sind bakterizide Antibiotika. Doch nur Bakterien mit *vanA* und *blaVIM* Genen zeigen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Ozonung. Während Ampicillin-resistente Bakterien weder eine erhöhte Sensibilität noch Widerstandsfähigkeit gezeigt haben. Erythromycin ist ein bakteriostatisches Antibiotikum und induziert keine reaktiven Sauerstoff-spezies innerhalb der Zelle. Daher würde der Effekt der Ozonanfälligkeit von Erythromycin-resistenten Bakterien zu dieser Theorie passen. Die im Abwasser gemessenen Antibiotikakonzentrationen liegen weit unterhalb des klinischen Wirkungsbereichs, aber immer noch hoch genug, um einen derartigen Effekt zu stimulieren (Hirsch et al., 1999; Michael et al., 2013).

### 3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen zur Abundanz opportunistischer Bakterien

Auch bei den Untersuchungen zu opportunistischen Bakterien wurde durch die PMA-Behandlung zwischen lebenden und toten Anteilen diskriminiert. Da Enterokokken bekannt dafür sind eine Vielfalt an klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen zu erwerben, sind sie daher nicht nur als fäkaler Indikator zu betrachten (Otter, Yezli, & French, 2011; Oskoui & Farrokh, 2010). Von allen untersuchten opportunistischen Bakterien wies der Enterokokken-Marker die größte Abundanz im Zulauf des Ozonsystems auf (Median:  $2,4 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA, Abbildung 14). Nach Ozonbehandlung reduzierte sich die Abundanz deutlich auf  $5,0 \times 10^2$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA, was einer Reduktion von 95% entspricht. Die maximal erreichte Reduktion von Enterokokken durch Ozonung während des Untersuchungszeitraums betrug 99%. Trotz dieser Reduktion wurde keine vollständige Elimination von Enterokokken im Auslauf der Ozonanlage erreicht (Minimum:  $1,9 \times 10^2$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA).

*P. aeruginosa* ist ein wichtiger Erreger nosokomialer Infektionen, kann eine Vielzahl an Antibiotikaresistenzgenen tragen und ist ein weit verbreiteter Wasserkeim (Schwartz et al., 2015; Klockgether et al., 2007). Die Abundanz des *P. aeruginosa* Marker-Gens *ecfX* im Zulauf des Ozonsystems betrug zwischen  $1,0 \times 10^3$  und  $3,9 \times 10^3$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA (Median:  $1,3 \times 10^3$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA). Der Effekt der Ozonbehandlung auf die Abundanz von *P. aeruginosa* in der Bakterienpopulation war deutlich geringer als der Effekt auf Enterokokken. Die Abundanz für *P. aeruginosa* im Auslauf des Ozonsystems erhöhte sich sogar auf  $1,9 \times 10^3$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA. Dies entspricht fast einer Verdopplung der *P. aeruginosa*-spezifischen Gen-Abundanz in der überlebenden Bakterienpopulation und weist auf eine erhöhte Widerstandsfähigkeit dieser Bakterien gegenüber Ozonung hin.



**Abbildung 14** Abundanzen der untersuchten opportunistischen Bakterien in Zelläquivalenten pro 100 ng Gesamt-DNA. Analysiert wurden nur die lebenden Anteile der Bakterienpopulationen aus insgesamt 48 Probenahmen. Dargestellt sind die Abundanzen im Zulauf der Ozonanlage und im Ablauf.

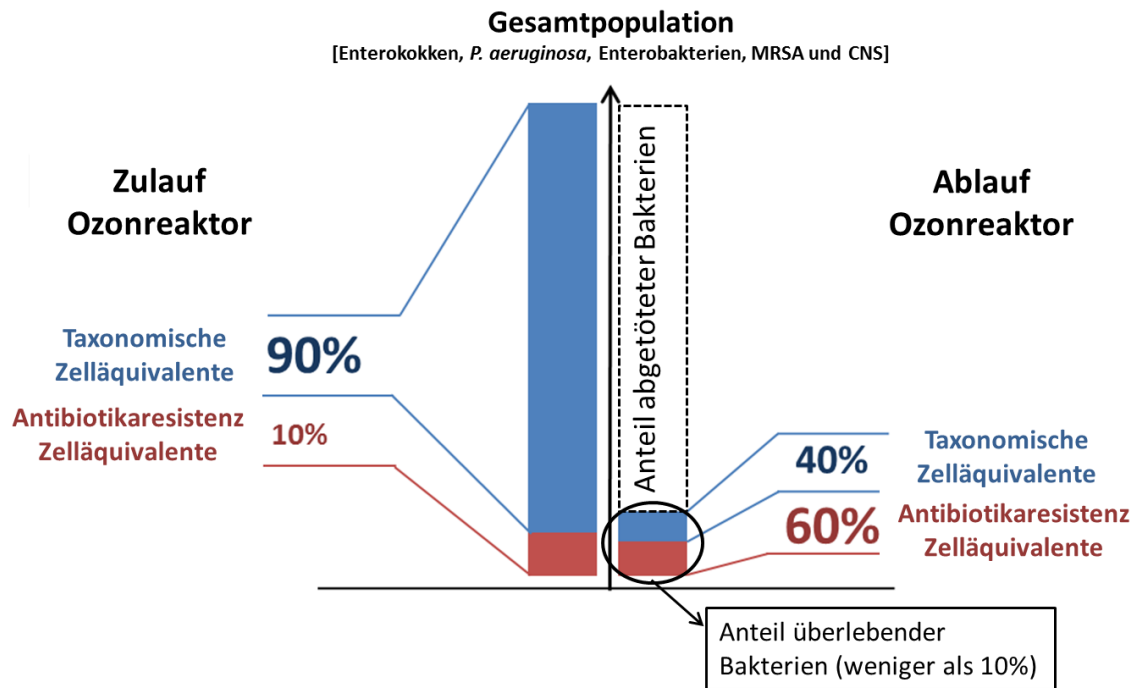
Krankenhauspatienten mit einer nosokomialen Infektionen ausgelöst durch Staphylokokken (MRSA/CNS) bewirken immer noch die höchste Sterblichkeitsrate und stellen damit ein großes Behandlungsproblem im klinischen Gesundheitswesen dar. Vorangegangene Studien wiesen MRSA/CNS im Abwasser von Krankenhäusern und Intensivstationen nach (Ashbolt et al., 2013; Cornejo-Juárez et al., 2014; Clifford et al., 2012). Während der Warmperioden im Untersuchungszeitraum wurde kein MRSA/CNS im Zulauf der Ozonanlage detektiert. Erst in den beginnenden Wintermonaten wurden niedrige Abundanzen zwischen  $6,3 \times 10^0$  und  $3,1 \times 10^1$  Zelläquivalenten pro 100 ng DNA an MRSA/CNS gemessen (Median:  $1,2 \times 10^1$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA). Nach der Ozonbehandlung lagen die Abundanzen von MRSA/CNS an bzw. unter der Nachweisgrenze des Detektionssystems, was einer fast vollständigen Elimination von MRSA/CNS durch die Ozonbehandlung entspricht.

Die Verteilung der Antibiotikaresistenzgene und opportunistischen Bakterien in der Bakterienpopulation des Abwassers vor und nach Ozonbehandlung zeigen Unterschiede in der Anfälligkeit und Widerstandsfähigkeit der Mikroorganismen gegenüber diesem Verfahren, abhängig von der Bakterienspezies und/oder des Antibiotikaresistenzgens. Bakterien, die das *vanA*- oder *blaVIM*-Resistenzgen tragen, scheinen einen Selektionsvorteil zu haben und sind widerstandsfähiger gegenüber der Ozonbehandlung. Auf der anderen Seite weisen die taxonomischen Abundanzen von Enterokokken (hohe Anfälligkeit gegenüber Ozonbehandlung)

und *P. aeruginosa* (geringe Anfälligkeit gegenüber Ozonbehandlung) auf unterschiedliche Anpassungsweisen dieser Bakterien gegenüber oxidativen Stress hin.

Neben der Widerstandsfähigkeit gegenüber Ozon können auch andere Faktoren einen Einfluss auf die Antibiotikaresistenzabundanz in der überlebenden Bakterienpopulation haben. Einer der Wirkmechanismen von Ozon zur Hygienisierung von Wassersystemen beinhaltet die Inaktivierung von Bakterien durch DNA-Schäden (Dodd, 2012). Eine Antwort auf DNA-Schäden ist die Induktion von horizontalem Gentransfer (HGT) über das *recA*-System (Fall et al., 2007). Die beiden Antibiotikaresistenzgene *vanA* und *blaVIM* sind auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert und ihre Transferierbarkeit auf andere Spezies wurde ebenfalls untersucht (Tato et al., 2010; Oskoui & Farrokh, 2010). Das Transposon Tn1546 assoziiert mit *vanA* und anderen Resistenzgenen wurde nicht nur in Klinikisolaten, sondern auch in Umweltisolaten entdeckt (Guardabassi & Dalsgaard, 2004). Dabei unterschied sich die Struktur des Tn1546 nicht von dem aus Enterokokkeninfektionen im Human- und Veterinärbereich. Dies spricht darüber hinaus für ein *vanA*-Gen Reservoir in der Umwelt. Das *blaVIM*-Gen ist ebenfalls mit unterschiedlichen Varianten des mobilen genetischen Elementes Tn402 assoziiert, welches überwiegend in Enterobakterien und speziell in *P. aeruginosa* vorkommt. Diese Varianten sind oft mit Schwermetallresistenzen und in konjugativen Plasmiden organisiert. Rekombinationsereignisse, bei denen das Tn402 involviert ist, wurden daher auch in anderen Bakterien nachgewiesen (Tato et al., 2010; Seiler & Berendonk, 2012).

Durch molekularbiologische Methoden wurde ein selektiver Effekt der Ozonung auf einen Teil der Abwasserpopulation festgestellt. Die deutliche Häufung von Antibiotikaresistenzgenen in der überlebenden Bakterienfraktion trotz Reduzierung der Gesamtbakterienfracht nach Ozonung ist ein Hinweis auf eine Selektion von antibiotikaresistenten und ozonrobusten Bakterien, die durch Prädisposition mit bakteriziden Antibiotika einen Vorteil gegenüber dieser oxidativen Behandlungen haben. Dadurch würden diese Bakterien, die durch Ozon hervorgerufenen subletalen Schäden auch effektiver reparieren können. Eine Kombination der Ergebnisse mit den Abundanzen der untersuchten opportunistischen Bakterien und klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen ist in Abbildung 15 dargestellt und verdeutlicht diesen beobachteten Effekt der Ozonbehandlung zur Selektion von antibiotikaresistenten Bakterien bei gleichzeitiger Reduktion der Gesamtbiomasse. Die Berücksichtigung dieses Effekts ist wichtig bei der Entwicklung zukünftiger Abwasserbehandlungsverfahren, wenn es darum geht, klinisch relevante Antibiotikaresistenzen und opportunistische Bakterien zu reduzieren.



**Abbildung 15** Effekt der Ozonung auf die bakterielle Population im Abwasser.

Die durchgeführten Untersuchungen an der Pilotanlage am Klärwerk Südhessen haben gezeigt, dass im Bereich der Umwelthygiene die Verwendung von molekularbiologischen Methoden mit Berücksichtigung der Gesamtpopulation dabei helfen können, geeignete Parameter zu finden, um einen Abwasserprozess adäquat bewerten zu können. Die bakterielle Zelldichte sowie die Zusammensetzung der Bakterienpopulation mit Antibiotikaresistenzen und opportunistischen Bakterien sind wichtige Parameter für eine mikrobiologische Risikocharakterisierung. Diese Daten können dabei helfen, kritische Wassersysteme zu überwachen, Risiken einzustufen oder Anpassungen an bestehenden Prozessen vorzunehmen.

### 3.2.3 Molekularbiologische Populationsanalyse

#### 3.2.3.1 PCR-DGGE

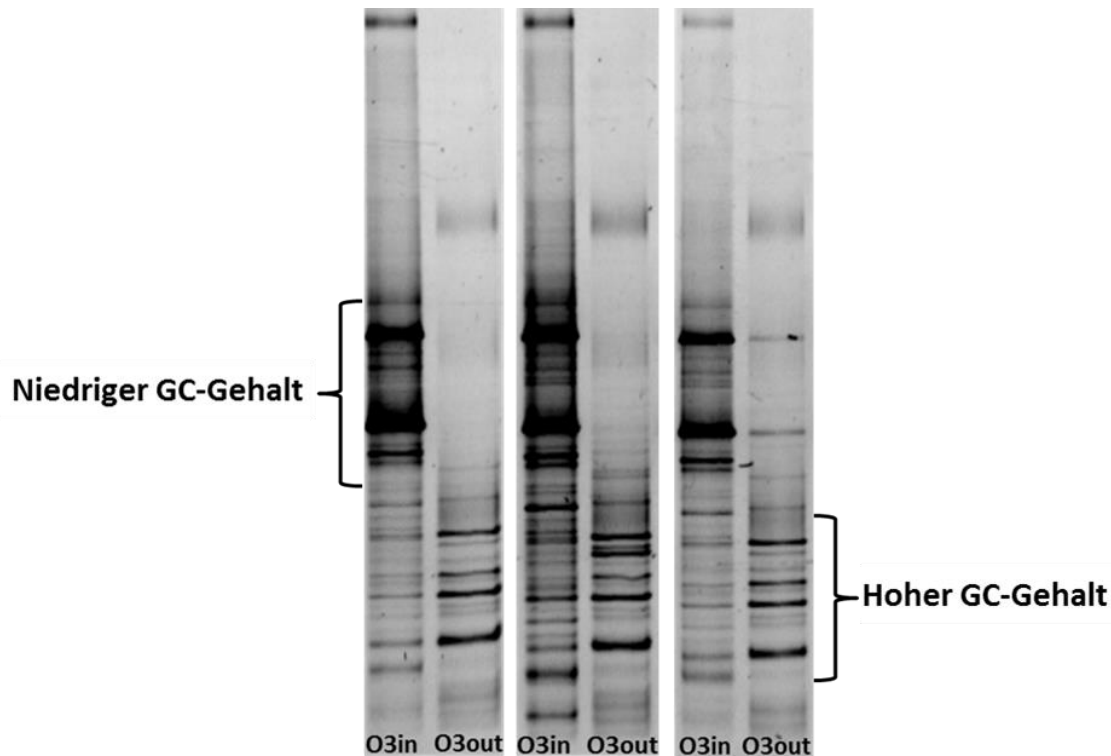
Um den Effekt der Ozonung auf die bakterielle Diversität in der Abwasserpopulation zu untersuchen, wurden Populationsanalysen über PCR-DGGE und Illumina 16S Amplicon-Sequenzierung durchgeführt (Abbildung 16 und 17). Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Anteilen erfolgte hier über die Isolierung der Gesamt-RNA, die nur aus der lebenden Fraktion der Bakterienpopulation stammt. Die nachfolgende reverse Transkription und anschließende konventionelle PCR amplifizierte das für die Speziesbestimmung relevante 16S rDNA Fragment aus Eubakterien.

Durch die DGGE wurden die DNA-Banden aus den Proben des Ozonzu- und -ablaufs separiert und die Ähnlichkeit der beiden Populationen über den Dice-Koeffizienten durch paarweise Gruppierung bestimmt (Kapitel 2.12). Neben der generellen Inaktivierung einer Vielzahl an Bakterienspezies durch die Ozonung wurden Selektionsereignisse und Populations-Shifts erkennbar (Abbildung 16). Ein Ähnlichkeitsindex von nur 0,39 bzw. 39% Ähnlichkeit zwischen der Population vor und nach Ozonbehandlung zeigt eine erhebliche Veränderung in der Populationszusammensetzung an. Je weiter das 16S DNA-Fragment im Gel wandert, umso höher ist sein GC-Nukleotid Gehalt im Amplicon. Neben dem Verschwinden einiger Bakterienspezies ist ein Populations-Shift zu Gunsten von Bakterien mit einem höheren GC-Nukleotid Gehalt nach der Ozonbehandlung zu beobachten, während Bakterien mit niedrigem GC-Nukleotid Gehalt eher durch die Ozonung reduziert werden.

Diese Unterschiede in der Anfälligkeit von Bakterien mit niedrigem GC-Nukleotid-Gehalt ist auch ein Hinweis auf unterschiedliche Reaktivitäten des Ozons mit den DNA-Basen. Von allen vier DNA-Nukleotiden weist Thymin die höchste Reaktivität gegenüber Ozon auf (Geschwindigkeitskonstante  $4,2 \times 10^4$  L pro Mol und Sekunde, siehe Tabelle 3, Kapitel 1.3.7), gefolgt von Guanin mit  $1,6 \times 10^4$  L pro Mol und Sekunde, Cytosin mit  $1,4 \times 10^3$  L pro Mol und Sekunde und Adenin mit  $1,2 \times 10^1$  L pro Mol und Sekunde. Dies bedeutet, dass AT-reiche DNA-Abschnitte 61% schneller durch Ozon degradieren als GC-reiche Abschnitte.

Da für einen Doppelstrangbruch nur 2 der nicht komplementären DNA-Nukleotide nötig sind, ist der reaktionsbestimmende Schritt der DNA-Degeneration durch Ozon der Gehalt an Guanin/Cytosin-Nukleotiden in der DNA. Denn zum Zeitpunkt der Guaninoxidation sind schon mehr als 50% aller Thymin-Nucleotide oxidiert, so dass eine vollständige Reaktion von Guanin mit Ozon immer auch von einer vollständigen Thyminoxidation begleitet ist (höhere Geschwindigkeitskonstante). Neben den Nukleotiden spielen auch die Wasserstoffbrückenbindungen ( $G/C = 3$ ;  $A/T = 2$ ), sowie die Doppel-Helix-Struktur der DNA indirekt eine Rolle, da sie die Reaktion des Ozons mit den Nukleotiden sterisch behindern (Cataldo, 2006; Dodd, 2012). Diese Umstände tragen zu einer Selektion Ozon-robuster Bakterien bei und sollten bei der Auswahl geeigneter mikrobiologischer Indikatorsysteme berücksichtigt werden, wenn es um die Bewertung der Effizienz einer 4. Reinigungsstufe geht.





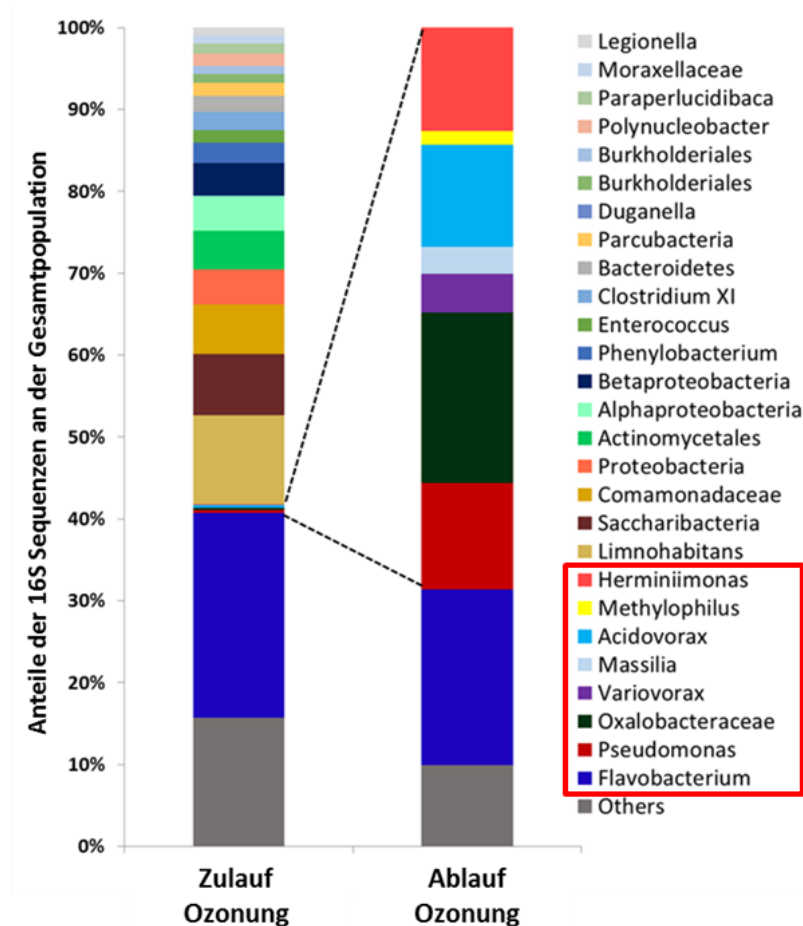
**Abbildung 16** Standard PCR-DGGE Populationsanalyse. 3 unabhängige Abwasserproben vor und nach Ozonbehandlung sind dargestellt. Intensität der Banden ist auf die Häufigkeit der jeweiligen Bakterienspezies innerhalb der Gesamtpopulation zurück zu führen. Dadurch sind Reduktions- und Selektionsprozesse durch die Ozonbehandlung zu erkennen. Analysiert wurden nur die lebenden Anteile der Bakterienpopulationen. O3in: Zulauf der Ozonanlage; O3 out: Ablauf des Ozonanlage

### 3.2.3.2 Illumina 16S Amplicon-Sequenzierung

Um genauere Informationen über die Zusammensetzung der Bakterienpopulationen im Abwasser vor und nach Ozonbehandlung zu erhalten, wurden die für alle Bakterienspezies individuellen 16S RNA-Fragmente in cDNA umgeschrieben, anschließend sequenziert und ihre prozentualen Anteile quantifiziert (Abbildung 17). Zum Einsatz kam dabei die *Next Generation Illumina MiSeq*-Sequenzierungstechnologie. Bei diesem Verfahren wird ein 16S DNA-Fragment von 300 bp Länge genutzt, um im *High Throughput*-Verfahren alle Eubakterien bis zum Gattungsnamen genau zu bestimmen.

Nach Qualitätsbestimmung (>95% Sequenzidentität) und Entfernen von Sequenzen mit Abundanzen geringer <0,005% an der Gesamtpopulation, konnten im Zulauf der Ozonung 1.021 Sequenzen und im Ozonablauf noch 482 Sequenzen einer spezifischen Gattung zugeordnet werden (Anhang Kapitel 7). Dies entspricht einem Diversitätsverlust von mehr als 50% durch die Ozonbehandlung. Von den verbliebenden 50% ist eine Vielzahl an Bakterienspezies mit einer Häufigkeit von unter 1% vertreten. Neben dem allgemeinen Diversitätsverlust wird allerdings auch deutlich, dass die Ozonbehandlung eine Selektion robuster Spezies bewirkt. Dieses Phänomen wird bei einer Gruppe von Bakterien deutlich, zu denen auch *Pseudomonas spp.*

gehört. Diese Gruppe (*Pseudomonas*, *Oxalobacteriaceae*, *Variovorax*, *Massilia*, *Acidovorax*, *Methylophilus* und *Herminiimonas*) macht vor der Ozonbehandlung ca. 1% an der Gesamtpopulation aus und steigt nach der Ozonung auf einen Anteil von ca. 62%. In Übereinstimmung mit den DGGE-Analysen weist diese Gruppe an ozonrobusten Bakterienspezies einen hohen GC Nucleotid-Anteil von bis zu 72% in ihrem Genom auf (Tabelle 17).



**Abbildung 17** Die IlluminaMiSeq 16S Populationsanalyse vom Zu- und Ablaufs des Ozonsystems. Nur Gattungen mit mehr als 1% Abundanz sind dargestellt. Hervorgehoben sind die dominanten Gattungen nach der Ozonbehandlung.

**Tabelle 16** Nukleotid-Anteil der identifizierten dominanten Bakterienspezies (nach *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2001)

Bakterien-Spezies	GC-Gehalt
<i>Pseudomonas</i>	
<i>Oxalobacteriaceae</i>	61 – 72%
<i>Varivorax</i>	
<i>Massilia</i>	
<i>Acidovorax</i>	62%
<i>Methylophilus</i>	60 – 70%
<i>Herminiimonas</i>	51 – 52%

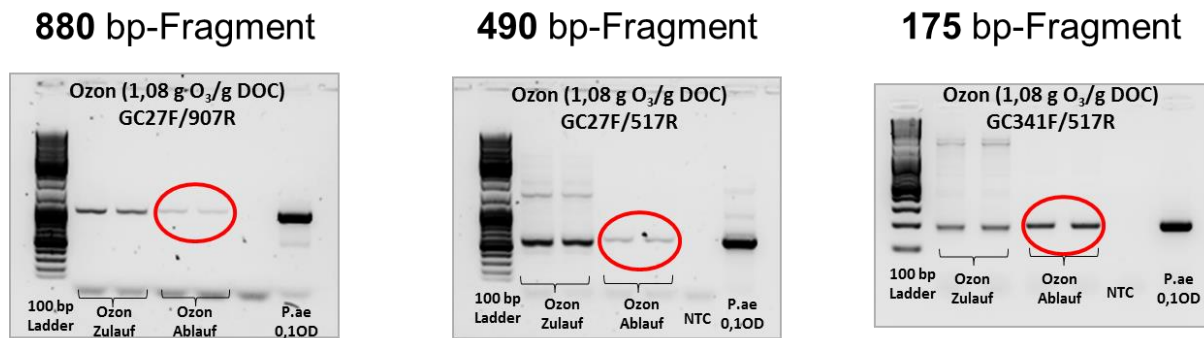
### 3.3.4 Nuklease-Aktivität in mit Ozon behandeltem Abwasser

Extrazelluläre Nukleasen bauen Nukleinsäuren ab und tragen zur natürlichen Degeneration von DNA-Fragmenten im Abwasser bei (Rieder et al., 2008). Dieser Effekt reduziert den DNA-Gehalt in der freien Wasserphase und ist ein Vorteil, um die Häufigkeit von genetischen Transferereignissen zu reduzieren. Daher wurde der Einfluss der Ozonung auf die Enzymaktivität nativer Nukleasen untersucht. Aufgrund der Reaktivität des Ozons mit Aminosäuren und Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen wurde vermutet, dass die Enzymaktivität im Abwasser nach der Ozonbehandlung deutlich reduziert ist. Untersuchungen mit Abwasser aus dem Zu- und Ablauf der Ozonung weisen jedoch auf eine Zunahme der Nukleaseaktivität hin. Ein 16S-rDNA PCR-Fragment definierter Länge (560 bp) wurde zu gleichen Konzentrationen mit Abwasser aus dem Zu- und Ablauf des Ozon-Systems inkubiert. Das PCR-Fragment, das mit dem Abwasser des Ozonzulaufs inkubiert wurde, zeigte einen geringeren DNA-Abbau als das Fragment, das mit Abwasser aus dem Ablauf des Ozonsystems inkubiert wurde. Dieser Effekt ist unter anderem der Freisetzung bakterieller Nukleasen durch die Ozonbehandlung beschädigte Zellmembranen geschuldet. Eine effiziente Reduktion von genetischem Material durch einen gesteigerten Abbau freier DNA-Fragmente mit Hilfe der erhöhten Nuklease-Aktivität nach Ozonbehandlung ist dennoch nicht gegeben, da der gesteigerte DNA-Abbau erst nach mehreren Stunden Inkubation beobachtet wurde.

### 3.2.5 DNA Schäden in der überlebenden Bakterienpopulation im Abwasser nach Ozonung

Ozon wird derzeit als Oxidationsmittel in der Trinkwasseraufbereitung sowie zur Desinfektion und Zerstörung von Viren eingesetzt. Dabei reagiert das Ozon neben bakteriellen Strukturen wie Zellwand und Enzymen auch mit den Nukleinsäuren der DNA. Dabei werden DNA-Mutationen induziert, welche abhängig von der Ozondosis sowie Kontaktzeit und der DNA-Zusammensetzung sind (basierend auf dem Guanin-Nukleotid Gehalt; Cataldo, 2006).

Die Bestimmung der DNA-Schäden in den nativen Abwasserproben vor und nach Ozonbehandlung wurde über einen Standard-PCR Ansatz ermittelt (Kapitel 2.11). Dabei wurde sich die Tatsache zu Nutze gemacht, dass mehr DNA-Schäden in längeren DNA-Abschnitten akkumulieren als in kürzeren (Süss et al., 2009). Drei eubakterielle Primersysteme wurden verwendet, um Amplicons der Größen 880 bp, 490 bp und 176 bp aus der 16S rDNA von Bakterien des Ozonzu- und Ablaufes zu amplifizieren. Mehr DNA-Schäden in einem Fragment führen zu einer verringerten Amplifikation in der PCR-Reaktion. Das Ergebnis bestätigte eine reduzierte Amplifikation des 490 und 880 bp Amplicons im Vergleich zum 175 bp Amplicons von Bakterien aus dem Ablauf des Ozonsystems (Abbildung 18).



**Abbildung 18** DNA-Schäden in der Bakterienpopulation induziert durch die Ozonbehandlung

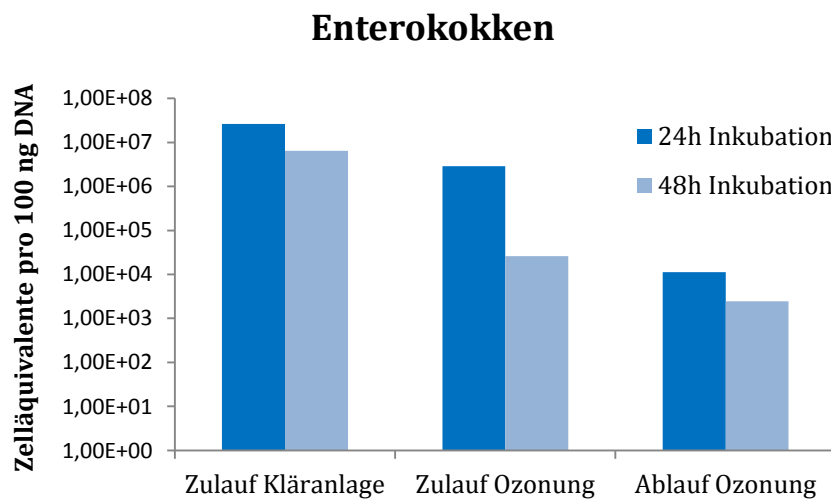
Um ein mögliches bakterielles Regenerationspotential zu untersuchen, wurden die nativen Abwasserproben bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert und 4 Wochen später erneut vermessen. Standard-PCR Analysen ergaben keinen signifikanten Unterschied in den DNA-Schäden, basierend auf der Amplicon Länge gegenüber den vorherigen Untersuchungen. Durch die Lebend/Tot-Differenzierung und nach einem Zeitraum von 4 Wochen zeigen die Ergebnisse eine geschädigte (subletale DNA-Schäden), aber dennoch lebende Population nach Ozonbehandlung. Abhängig vom Ausmaß der DNA-Schäden und dem Grad anderer vom Ozon beschädigter Zellkompartimenten, ist eine Induktion von Reparaturmechanismen in diesen Bakterien zu erwarten (z.B. *recA*). Diese Mechanismen, zu denen auch die Induktion von HGT gehört, sichern der Bakterienzelle das Überleben, aber verzögern dadurch das Proliferationsvermögen. Dieser Effekt ist zu berücksichtigen, wenn bakterielle Inaktivierungsraten über Kultivierungsexperimente bestimmt werden sollen. Abhängig von der Bakterienspezies und der Menge an subletalen Schäden aufgrund der Ozonbehandlung, kann bei der Verwendung von Indikatorbakterien die Kultivierung zu falschnegativen Ergebnisse führen, was zu einer Überschätzung der Inaktivierungseffizienz von Ozonverfahren führen würde.

### 3.2.6 Mikrobiologisches Regenerationspotential

Die PCR-DGGE und Illumina 16S Sequenzierungsergebnisse weisen auf eine Veränderung in der Zusammensetzung der Bakterienpopulation nach Ozonung hin. Zusätzlich wurde ein Anstieg an antibiotikaresistenten Bakterien in den überlebenden Populationsanteilen festgestellt. Um den langzeitlichen Effekt dieser Selektion beurteilen zu können, wurden ozonbehandelte Abwasserproben sofort vor Ort, nach 24 h und zusätzlich nach 48 h mittels qPCR untersucht. Vor allem der Vergleich zwischen Bakterienpopulationen mit 24 h und 48 h Inkubationszeit nach einer Ozonbehandlung gibt einen Hinweis auf das mikrobiologische Regenerationspotential klinisch relevanter Parameter in den nachfolgenden wasserführenden Systemen wieder und

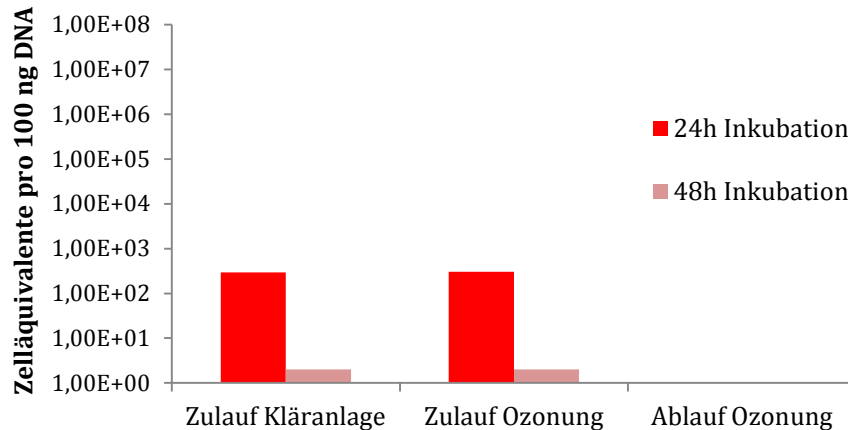
lässt auf ein mögliches Restrisikopotential beim Einsatz eines solchen Verfahrens in der Abwasserbehandlung schließen.

Die Quantifizierung von Enterokokken nach konventioneller Klärung weist eine Reduktion von einer Zehnerpotenz und von weiteren 2 Zehnerpotenzen nach Ozonung auf. Auch die Untersuchungen mit den 48 h Proben weisen auf keine Selektion oder erneutes Wachstum hin (Abbildung 19). Staphylokokken (MRSA + CNS) kommen nur in geringen Abundanzen im untersuchten Abwasser vor und sind nach der Ozonung sowie nach 48 h nicht mehr nachweisbar (Abbildung 20). *P. aeruginosa* weist keine Reduktion durch die Ozonbehandlung auf und zeigt sogar eine verbessertes Vermehrungspotential in der Abwasserpopulation nach Ozonung (Abbildung 21).



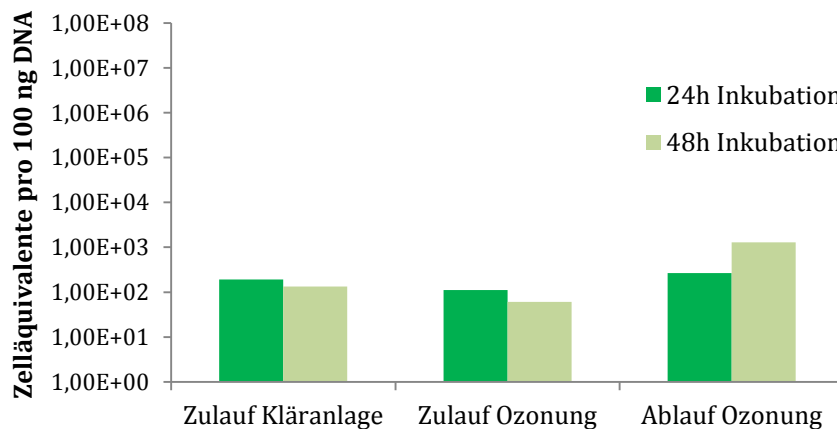
**Abbildung 19** Abundanz des Enterokokken 23S Markers in der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlage (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung

### Staphylokokken (MRSA + CNS)



**Abbildung 20** Geringe Abundanz von Staphylokokken (MRSA und CNS) im Zulauf der Kläranlage (nach Rechen) und nach konventioneller Klärung. Nach anschließender Ozonbehandlung ist der genetische Marker (*mecA*) nicht mehr nachweisbar

### *P. aeruginosa*

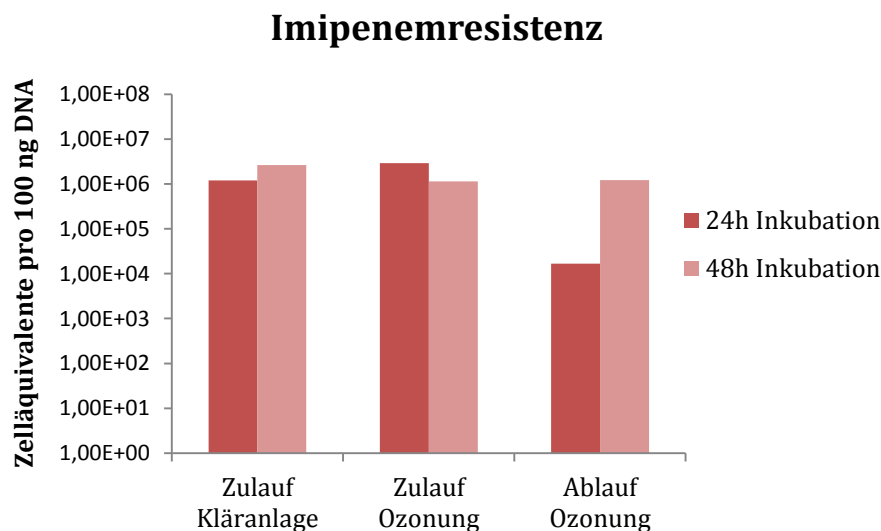


**Abbildung 21** Anteil an *P. aeruginosa* an der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlage (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung

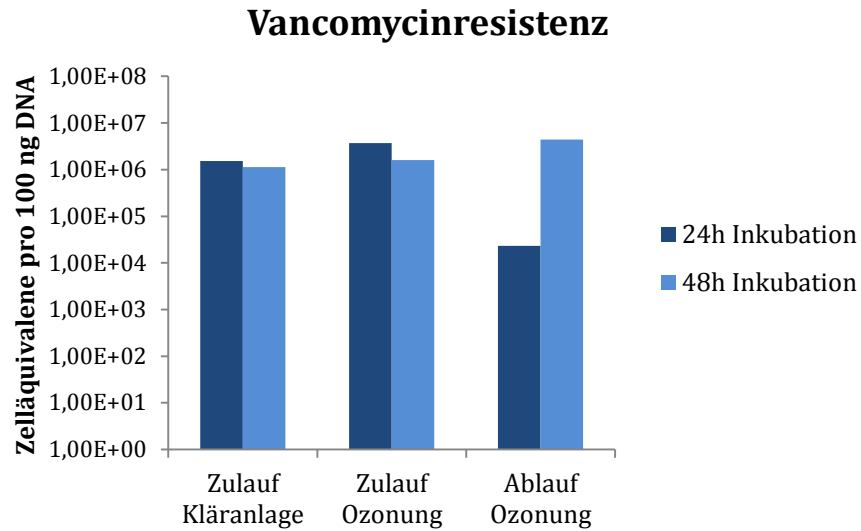
Die Abundanzen der klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgene für Imipenem und Vancomycin steigen durch die konventionelle Klärung innerhalb der Population leicht an. Direkt nach Ozonbehandlung zeigen beide Resistenzgene zunächst eine deutliche Reduktion, aber 48 h nach der Ozonung erreicht die Imipenemresistenz ihre ursprünglichen Anteile in der Bakterienpopulation (Regeneration, Abbildung 22).

Die Abundanz der Vancomycinresistenz wurde ebenfalls anfänglich durch die Ozonung vermindert. Nach 48 h Inkubation bei Raumtemperatur steigt jedoch die Abundanz des Vancomycinresistenzgens in der Bakterienpopulation des Ozonablaufs stärker an, als in der Population des Ozon- und Kläranlagenzulaufs. Dies entspricht einem höheren Regenerationspotential im Vergleich zur vorher beschriebenen Imipenem-Abundanz (Abbildung 23). Die Abundanz des Ampicillinresistenzgens nimmt nach der Ozonbehandlung um  $1,6 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA ab. Nach 48 h steigt die Abundanz des Ampicillinresistenzgens auf  $2,5 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA an und übersteigt damit die Abundanz im Ozonzulauf (Abbildung 24).

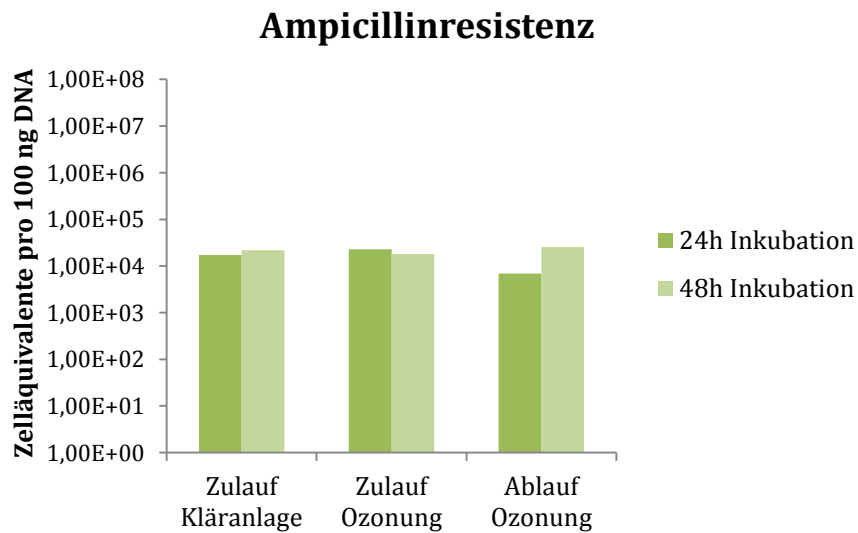
Die Erythromycinresistenz wird durch die konventionelle Klärung um mehr als eine Zehnerpotenz pro 100 ng DNA reduziert (Reduktion ca. 90%). Dieser Effekt verstärkt sich nach 48 h um eine weitere Zehnerpotenz (Reduktion ca. 99%). Diese Entwicklung weist auf eine reduzierte Fitness von Erythromycin-resistenten Bakterien innerhalb der Bakterienpopulation des Kläranlagenauslaufs hin. Nach Ozonung verringert sich die Abundanz der Erythromycinresistenz in der Bakterienpopulation um weitere 2 Zehnerpotenzen gegenüber der Population des Ozonzulaufs (von vorher ca. 90% auf ca. 99,9%). Nach 48 h wird eine Regeneration der *ermB* Resistenzanteile in der überlebenden Population sichtbar. Dennoch bleiben die Abundanzen in der Bakterienpopulation unter denen, die in der Population des Ozonzulaufs gemessen wurden (Abbildung 25).



**Abbildung 22** Abundanzen für das Antibiotikaresistenzgen *blaVIM* anteilig an der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlage (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung

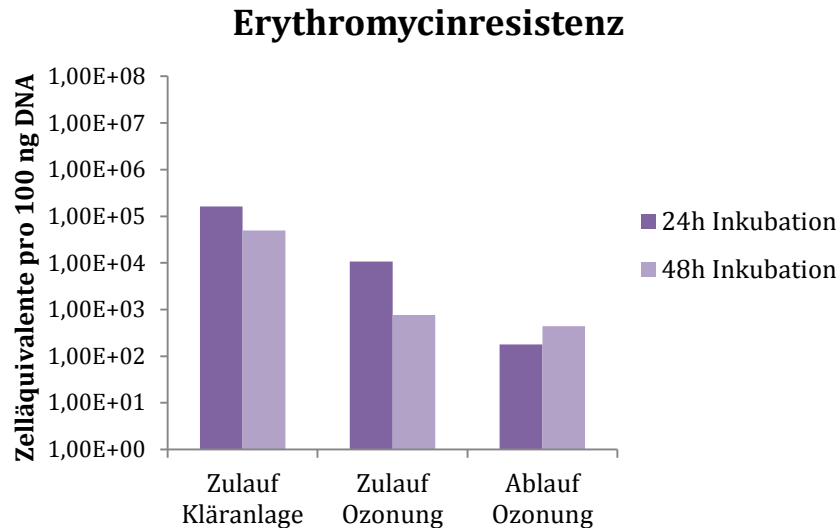


**Abbildung 23** Abundanzen für das Antibiotikaresistenzgen *vanA* anteilig an der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlagen (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung



**Abbildung 24** Abundanzen für das Antibiotikaresistenzgen *ampC* anteilig an der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlagen (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung





**Abbildung 25** Abundanzen für das Antibiotikaresistenzgen *ermB* anteilig an der Bakterienpopulation im Zulauf der Kläranlagen (nach Rechen), nach konventioneller Klärung und nach anschließender Ozonbehandlung

### 3.2.7 Verfahrenskombination aus Ozonbehandlung mit nachgeschalteten

#### Filtersystemen

Aufgrund der Anzahl an opportunistischen Bakterien und klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen, die nach der Ozonbehandlung immer noch im Abwasser vorhanden sind, wurde der Effekt der nachgeschalteten granulierten Aktivkohle- (GAC) und Bio-Filtersystemen auf die Antibiotikaresistenzlage und opportunistischen Bakterien untersucht (siehe Abbildung 12). Die Filtersysteme hatten ursprünglich die Aufgabe, einerseits den durch Ozon transformierten DOC über den Biofilter weiter abzubauen und andererseits die durch Ozon generierten unpolaren Substanzen an der Aktivkohle adsorbieren zu lassen.

Die der Ozonung nachgeschalteten Filtersystemen (granulierte Aktivkohle und Biofilter) zeigten zwar eine Reduktion der getesteten mikrobiologischen Parameter, diese Reduktion bewegte sich jedoch durchschnittlich in einem Bereich von 0,2 Zehnerpotenzen pro 100 ng DNA (max. 40 %). Weiterhin traten starke Schwankungen von bis zu 91% der gemessenen mikrobiologischen Parameter in den Abläufen der Filtersysteme über den gesamten Untersuchungszeitraum auf, was teilweise auf eine Verkeimung des Filtermaterials zurückzuführen war, so dass die Abundanzen einiger Antibiotikaresistenzen sowie Bakterien-Marker-Gene im Ablauf der Filter anstiegen. *P. aeruginosa* wurde in allen Filterabläufen mit einer erhöhten Abundanz gemessen, die teilweise um bis zu 485% (GAC 2) höher ausfielen als im Zulauf der Filtersysteme (Tabelle 18). Auch eine Verkeimung des Biofilters 2 mit Enterobakterien wurde beobachtet (Zunahme um 133%). Letztlich ist festzustellen, dass trotz weiterer Filterstufen antibiotikaresistente

Keime mit klinischer Relevanz nicht eliminiert werden und weiterhin in die aquatische Umwelt gelangen.

**Tabelle 17** Einfluss von nachgeschalteten Bio- und granulierter Aktivkohle Filter auf die Abundanz von Antibiotikaresistenzgenen und opportunistischen Bakterien. Alle Filter wurden als Parallelsystem anschließend an die Ozonbehandlung installiert. Abundanzen sind in Zelläquivalenten pro 100 ng DNA dargestellt.

Parameter	Ozon Auslauf/Zulauf Filter pro 100 ng DNA SD (%)	GAC 1 pro 100 ng DNA (Reduktion %) SD (%)	GAC 2 (belüftet) pro 100 ng DNA (Reduktion %) SD (%)	Biofilter 1 pro 100 ng DNA (Reduktion %) SD (%)	Biofilter 2 (belüftet) pro 100 ng DNA (Reduktion %) SD (%)
<i>blaVIM</i>	5,1 x 10 <sup>4</sup> ±8,9 x 10 <sup>3</sup> (17%)	3,3 x 10 <sup>4</sup> ±1,5 x 10 <sup>4</sup> (-35%) (47%)	3,8 x 10 <sup>4</sup> ±2,1 x 10 <sup>4</sup> (-26%) (56%)	3,2 x 10 <sup>4</sup> ±1,8 x 10 <sup>4</sup> (-38%) (57%)	4,8 x 10 <sup>4</sup> ±2,2 x 10 <sup>4</sup> (-7%) (45%)
<i>vanA</i>	3,4 x 10 <sup>4</sup> ±1,3 x 10 <sup>4</sup> (37%)	2,3 x 10 <sup>4</sup> ±1,9 x 10 <sup>4</sup> (-31%) (81%)	2,3 x 10 <sup>4</sup> ±1,6 x 10 <sup>4</sup> (-32%) (71%)	1,9 x 10 <sup>4</sup> ±7,2 x 10 <sup>3</sup> (-44%) (38%)	2,3 x 10 <sup>4</sup> ±1,5 x 10 <sup>4</sup> (-32%) (68%)
<i>ampC</i>	2,7 x 10 <sup>3</sup> ±2,7 x 10 <sup>2</sup> (13%)	1,6 x 10 <sup>3</sup> ±1,0 x 10 <sup>3</sup> (-41%) (62%)	2,6 x 10 <sup>3</sup> ±1,0 x 10 <sup>3</sup> (-5%) (39%)	1,9 x 10 <sup>3</sup> ±1,4 x 10 <sup>3</sup> (-28%) (72%)	4,2 x 10 <sup>3</sup> ±3,8 x 10 <sup>3</sup> (+51%) (91%)
<i>ermB</i>	2,1 x 10 <sup>1</sup> ±1,4 x 10 <sup>1</sup> (71%)	9,8 x 10 <sup>0</sup> ±1,7 x 10 <sup>0</sup> (-53%) (18%)	1,3 x 10 <sup>1</sup> ±3,0 x 10 <sup>0</sup> (-37%) (23%)	1,0 x 10 <sup>1</sup> ±2,8 x 10 <sup>0</sup> (-50%) (27%)	1,4 x 10 <sup>1</sup> ±3,2 x 10 <sup>0</sup> (-34%) (23%)
Enterokokken	5,2 x 10 <sup>2</sup> ±1,1 x 10 <sup>1</sup> (21%)	2,6 x 10 <sup>2</sup> ±2,2 x 10 <sup>2</sup> (-51%) (85%)	1,9 x 10 <sup>2</sup> ±9,1 x 10 <sup>1</sup> (-64%) (48%)	2,9 x 10 <sup>2</sup> ±1,0 x 10 <sup>2</sup> (-44%) (35%)	3,4 x 10 <sup>2</sup> ±1,8 x 10 <sup>2</sup> (-35%) (52%)
Staphylokokken	6,0 x 10 <sup>0</sup> ±1,0 x 10 <sup>0</sup> (16%)	7,1 x 10 <sup>0</sup> ±4,3 x 10 <sup>0</sup> (+18%) (62%)	2,1 x 10 <sup>1</sup> ±1,0 x 10 <sup>1</sup> (+265%) (47%)	4,9 x 10 <sup>0</sup> ±1,0 x 10 <sup>0</sup> (-18%) (21%)	8,5 x 10 <sup>0</sup> ±1,5 x 10 <sup>0</sup> (+42%) (18%)
<i>P. aeruginosa</i>	1,7 x 10 <sup>3</sup> ±8,5 x 10 <sup>2</sup> (51%)	1,9 x 10 <sup>3</sup> ±1,7 x 10 <sup>3</sup> (+17%) (87%)	9,8 x 10 <sup>3</sup> ±2,4 x 10 <sup>3</sup> (+485%) (25%)	8,3 x 10 <sup>3</sup> ±3,3 x 10 <sup>3</sup> (+398%) (40%)	3,9 x 10 <sup>3</sup> ±2,6 x 10 <sup>3</sup> (+133%) (66%)
Enterobakterien	2,7 x 10 <sup>3</sup> ±3,6 x 10 <sup>2</sup> (13%)	1,6 x 10 <sup>3</sup> ±1,0 x 10 <sup>3</sup> (-41%) (62%)	2,6 x 10 <sup>3</sup> ±1,0 x 10 <sup>3</sup> (-5%) (39%)	1,9 x 10 <sup>3</sup> ±1,4 x 10 <sup>3</sup> (-28%) (72%)	4,2 x 10 <sup>3</sup> ±3,8 x 10 <sup>3</sup> (+51%) (91%)

### 3.2.8 Zusammenfassung der mikrobiologischen Charakterisierung einer Ozonbehandlung an der Kläranlage Südhessen

Als weiterführender Abwassereinigungsprozess wurde an der Kläranlage Südhessen der Einfluss der Ozonbehandlung auf ausgewählte opportunistische Bakterien und die Antibiotikaresistenzlage im behandelten Abwasser untersucht. Das Ozonsystem wurde mit  $0,85 \pm 0,15 \text{ g O}_3 \text{ pro } 1 \text{ g DOC}$  sowie Kontaktzeiten von 10 - 15 Minuten betrieben.

Um die Abundanzen der Antibiotikaresistenzgene und opportunistischen Bakterien in der Bakterienpopulation vor und nach Ozonbehandlung zu vergleichen, wurde vor der DNA Extraktion eine Lebend/Tot-Diskriminierung mittels PMA durchgeführt.

Neben der allgemeinen Inaktivierung der Bakterienfracht von bis zu 1,5 Zehnerpotenzen (97%) wurde bei der verwendeten Ozondosis ein Anstieg in den Abundanzen von 2 der 4 untersuchten Antibiotikaresistenzgene (*vanA*, *blaVIM*) in der Bakterienpopulation des Ozonablaufs festgestellt. Im Vergleich dazu zeigte die Abundanz des *ampC*-Gens über den gesamten Untersuchungszeitraum eine gleichbleibende Verteilung in der Bakterienpopulation. Im Vergleich dazu wiesen *ermB*-Resistenzträger eine Sensitivität gegenüber Ozonung auf (Reduktion 99,9%). Ein Hinweis auf die unterschiedliche Anfälligkeit von Bakterien gegenüber der Ozonbehandlung aufgrund bestimmter Antibiotikaresistenzen geben Untersuchungen zum Wirkverhalten von bakteriziden Antibiotika. Diese zeigten, dass bakterizide Antibiotika neben ihrem substanzspezifischen Wirkort in der Bakterienzelle einen zweiten komplementären Effekt aufweisen. Diese Antibiotikaklassen induzieren die Bildung von Hydroxylradikalen, die durch oxidative Schäden an den Zellkompartimenten zum Bakterientod beitragen. Dieser Effekt wurde nur bei bakteriziden Antibiotika beobachtet. Vancomycin, Imipenem und auch Ampicillin sind bakterizide Antibiotika, während Erythromycin ein bakteriostatisches Antibiotikum ist und induziert dadurch keine reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der Zelle. Daher würde der Effekt der Ozonanfälligkeit von Erythromycin-resistenten Bakterien zu diesen Untersuchungen passen.

Der Enterokokken Marker wurde durch die Ozonung um bis zu 96% reduziert. *P. aeruginosa* demonstrierte eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Ozon und trat in der überlebenden Bakterienpopulation fast doppelt so häufig auf. Staphylokokken (MRSA/CNS) wurden nur während den Wintermonaten detektiert und fast vollständig durch die Ozonbehandlung eliminiert.

Populationsanalysen über PCR-DGGE zeigten neben Populations-Shifts auch eine Selektion von Bakterien mit einem höheren GC-Nukleotid Gehalt nach Ozonbehandlung auf. Ein Grund dafür sind die unterschiedlichen Reaktivitäten der DNA-Basen mit Ozon (Thymin  $4,2 \times 10^4 \text{ L pro Mol und Sekunde}$ ; Guanin 61% langsamer,  $1,6 \times 10^4 \text{ L pro Mol und Sekunde}$ , Tabelle 3). Weiterhin

bestätigte die Illumina 16S Amplicon-Sequenzierung einen Diversitätsverlust in der überlebenden Bakterienpopulation durch die Ozonbehandlung (um mehr als 50%) und eine Selektion robuster Spezies (z.B. *Pseudomonas spp.*). In Übereinstimmung mit den PCR-DGGE Analysen weist diese Gruppe an ozonrobusten Bakterienspezies einen höheren GC-Nucleotid-Anteil von bis zu 72% in ihrem Genom auf. Neben dem Effekt der bakteriziden Antibiotika könnte der erhöhte GC-Nukleotid-Gehalt im Genom eines Bakteriums für den Überlebensvorteil gegenüber der Ozonbehandlung verantwortlich sein.

Die der Ozonung nachgeschalteten Filtersysteme (granulierte Aktivkohle und Biofilter) zeigten zwar eine Reduktion der getesteten mikrobiologischen Parameter, diese Reduktion bewegte sich jedoch durchschnittlich in einem Bereich von 0,2 Zehnerpotenzen pro 100 ng DNA (max. 40 %). Weiterhin traten starke Schwankungen von bis zu 91% in den gemessenen Abundanzen auf, was teilweise auf eine Verkeimung des Filtermaterials zurückzuführen war.

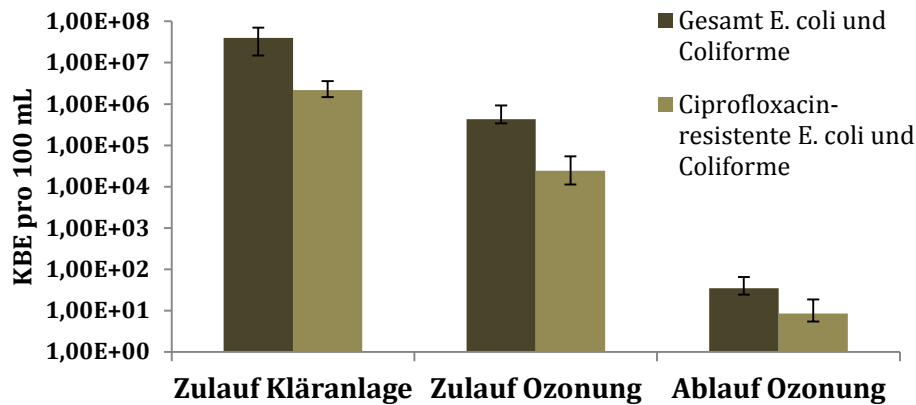
Untersuchungen zum bakteriellen Regenerationsvermögen zeigten, dass sich opportunistisch pathogene Bakterien wie *P. aeruginosa* und antibiotikaresistente Bakterien mit *blaVIM* und *vanA* Resistenzgenen unter günstigen Umweltbedingungen nach Ozonbehandlung wieder vermehren. Im Gegensatz zu chemischen Parametern, deren Risikopotential ausschließlich nach ihrer Konzentration bewerten wird, sollte bei einer zukünftigen mikrobiologischen Risikocharakterisierung auch das Regenerationspotential mit einbezogen werden.

### **3.3 Mikrobiologische Charakterisierung einer Ozonbehandlung an der Großkläranlage Neu Ulm-Steinhäule**

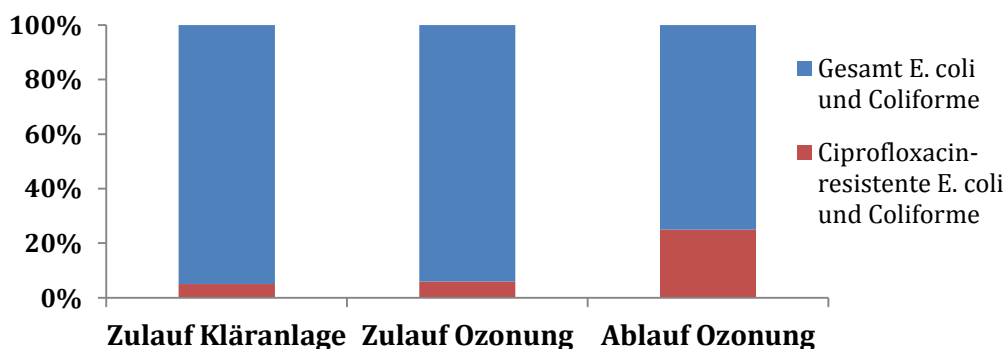
#### **3.3.1 Kulturbasierte Untersuchungen mit Indikatorbakterien**

Neben den molekularbiologischen Untersuchungen zum Effekt der Ozonung auf die bakterielle Population und Antibiotikaresistenzlage wurden ebenfalls Kultivierungsexperimente mit Indikatorbakterien durchgeführt, um das Phänomen der Antibiotikaresistenzselektion zu untersuchen (Abbildung 26). Für die Differenzierung zwischen antibiotikaresistenten *E. coli* und Coliforme und antibiotikasensiblen *E. coli* und Coliforme wurde Ciprofloxacin (1 µg/mL), ein Fluorchinolon ins Medium (mFC-Agar) gegeben. Durch die konventionelle Klärung reduzierte sich der Anteil an *E. coli* und Coliformen im Abwasser um fast zwei Zehnerpotenzen (99%), wobei der Anteil an Ciprofloxacin-resistenten Bakterien mit 5-6% im Vergleich zum Kläranlagenzulauf unverändert blieb. Durch die Ozonbehandlung wurden *E. coli* und coliforme Keime um 4 weitere Zehnerpotenzen reduziert, wobei der antibiotikaresistente Anteil auf 25% anstieg (Abbildung 27). Kultivierungsexperimente zur Detektion von *E. coli* und coliformen

Bakterien zeigten ebenfalls, dass durch die Ozonbehandlung der Anteil antibiotikaresistenter Bakterien in der ozonrobusten Population zunahm.



**Abbildung 26** Einfluss der konventionellen Klärung mit anschließender Ozonbehandlung auf die Konzentration der kultivierbaren *E. coli* und coliformen Keime



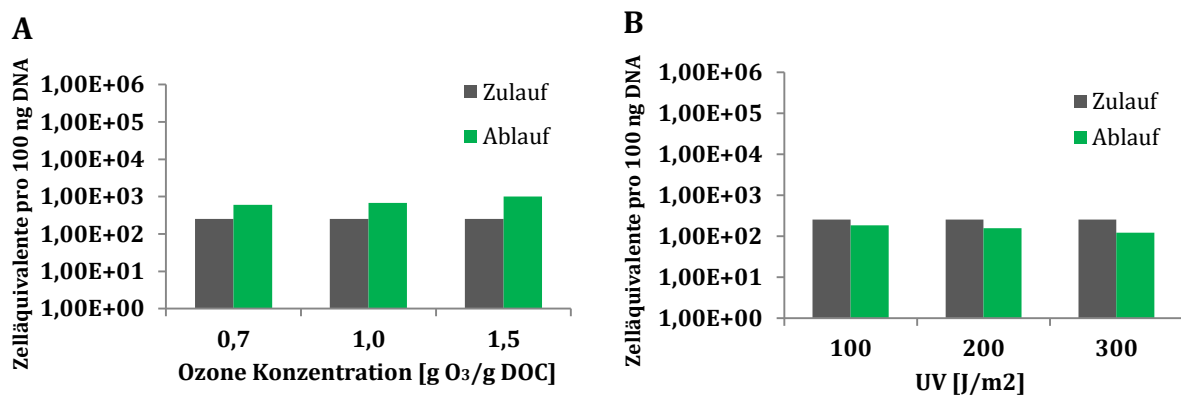
**Abbildung 27** Prozentualer Anteil der antibiotikaresistenten *E. coli* und coliformen Keime an der Gesamtkeimzahl

### 3.3.2 Verfahrenskombinationen von Ozon- und UV-Behandlung zur Reduktion des mikrobiellen Restrisikos an der Großkläranlage Neu Ulm-Steinhäule

Aufgrund der Anreicherung einiger klinisch relevanter Antibiotikaresistenzen und opportunistischen Bakterien in der Population nach der Ozonbehandlung wurde an der Großkläranlage Steinhäule eine Ozonanlage mit anschließender UV-Behandlung installiert mit dem Ziel, das entstandene Restrisiko aus der vorangegangenen Ozonbehandlung zu minimieren. Dazu wurde der Einfluss von 0,7, 1,0 und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC in Kombination mit UV-Intensitäten von 100, 200 und 300 J pro m<sup>2</sup> untersucht. Alle untersuchten genetischen Marker wurden durch

eine Lebend/Tot-Diskriminierung (PMA) nur innerhalb der überlebenden Restpopulation gemessen.

Die erhöhte Widerstandsfähigkeit von *P. aeruginosa* gegenüber Ozonbehandlung spiegelte sich auch in allen drei verwendeten Ozondosen an der Pilotanlage am Klärwerk Steinhäule wieder. Sowohl bei 0,7, 1,0 als auch 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC wurde über qPCR eine Anreicherung festgestellt. Bei einer Ozondosis von 0,7 g O<sub>3</sub> pro g DOC betrug der Anstieg der *P. aeruginosa* Anteile 235% bzw.  $5,9 \times 10^2$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA. Diese Erhöhung der *P. aeruginosa* Abundanz stieg mit der Erhöhung der Ozondosis auf 1,5 g O<sub>3</sub> um weitere 161% auf  $1 \times 10^3$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA an (Abbildung 28A).

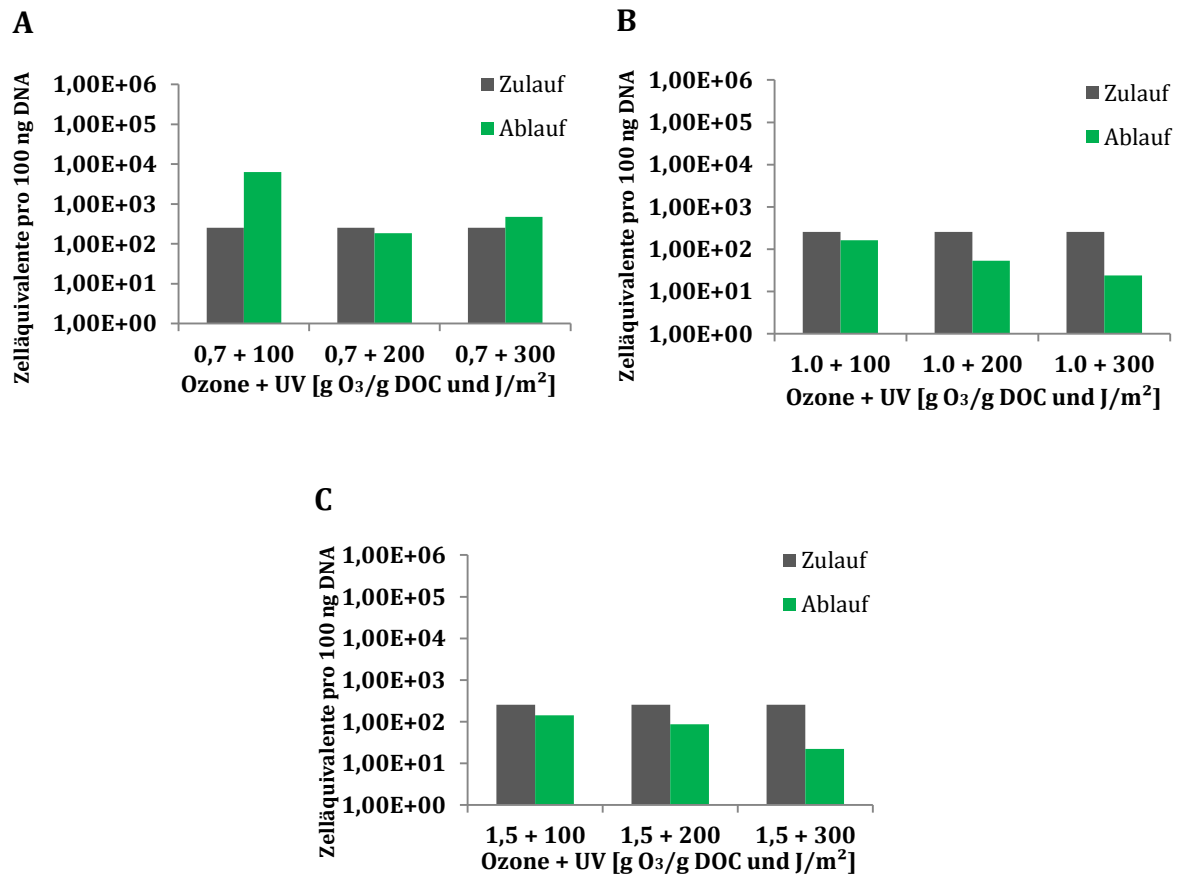


**Abbildung 28** Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf *P. aeruginosa* in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (grün) der jeweiligen Abwasserbehandlung

Im Vergleich zur Ozonung weist die UV-Behandlung von konventionell gereinigtem Abwasser keine Anreicherung von *P. aeruginosa* in der überlebenden Population auf, sondern eine minimale Reduktion von bis zu 53% bei 300 J pro m<sup>2</sup> auf  $1,2 \times 10^2$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA (Abbildung 28B). Die effektivste Verfahrenskombination wurde bei 1,5 g O<sub>3</sub> und 300 J pro m<sup>2</sup> erzielt, wobei *P. aeruginosa* in der überlebenden Population um 91% gegenüber dem Zulauf des Ozonsystems reduziert wurde ( $2,2 \times 10^1$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA, Abbildung 29C).

Die stärkere Reduktionsleistung bei Verwendung von Ozon mit nachfolgender UV-Behandlung ist unter Berücksichtigung der Effektivität der Einzelverfahren, der UV-Bestrahlung zuzukommen. Sowohl Süß et al., 2009 als auch McKinney and Pruden, 2012 belegen eine erhöhte UV-Anfälligkeit von *P. aeruginosa* (Gram-negativ) im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien. Dennoch ist ein Synergieeffekt beider Verfahren durch die gesteigerte Reduktionsleistung abzuleiten. Die durch Ozon induzierten Schäden an der äußeren Zellmembran und anderer zellulärer Strukturen könnte dafür verantwortlich sein, dass der Wirkungsgrad der DNA-Schäden induzierenden UV-Bestrahlung in *P. aeruginosa* erhöht ist.

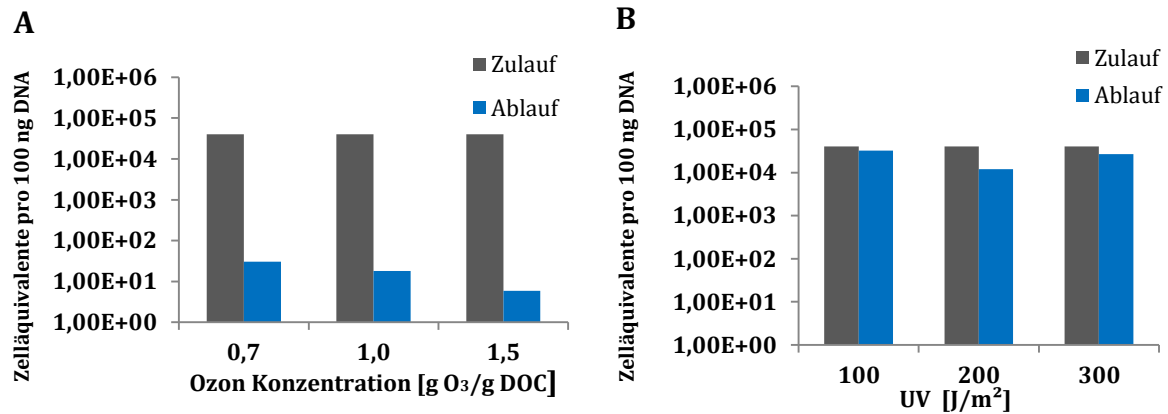
Allerdings zeigten Untersuchungen von Jungfer et al. (2006), dass die bakterienspezifische Regenerationsfähigkeit, unter anderem von *P. aeruginosa*, bei der Bewertung von Verfahren zu berücksichtigen ist. So konnte die Induktion von Reperaturmechanismen (*recA*) in überlebenden *P. aeruginosa* schon 2 h nach UV-Behandlung detektiert werden (100 – 600 J pro m<sup>2</sup>). Daher sind weitere Untersuchungen zur Nachhaltigkeit von Behandlungsverfahren nötig, da nicht auszuschließen ist, dass sich *P. aeruginosa* erneut in der Bakterienpopulation der nachfolgenden Wassersysteme vermehren könnte.



**Abbildung 29** Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf *P. aeruginosa* in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (grün) der jeweiligen Abwasserbehandlung

Die molekularbiologischen Untersuchungen zur weiteren Reduktion von Enterokokken (Grampositiv) im konventionell gereinigten Abwasser durch Ozonbehandlung, UV-Bestrahlung und die Kombination beider Verfahren zeigen Unterschiede gegenüber dem Verhalten von *P. aeruginosa* auf. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen an der Pilotanlage am Klärwerk Südhessen werden Enterokokken durch die Ozonbehandlung bei allen 3 Ozondosen deutlich reduziert, vor allem bei 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC (>99,9%, 6,0 x 10<sup>0</sup> Zelläquivalente pro 100 ng DNA Abbildung 30A). Im Gegenteil zur Ozonung hat die UV-Bestrahlung von konventionell gereinigtem Abwasser

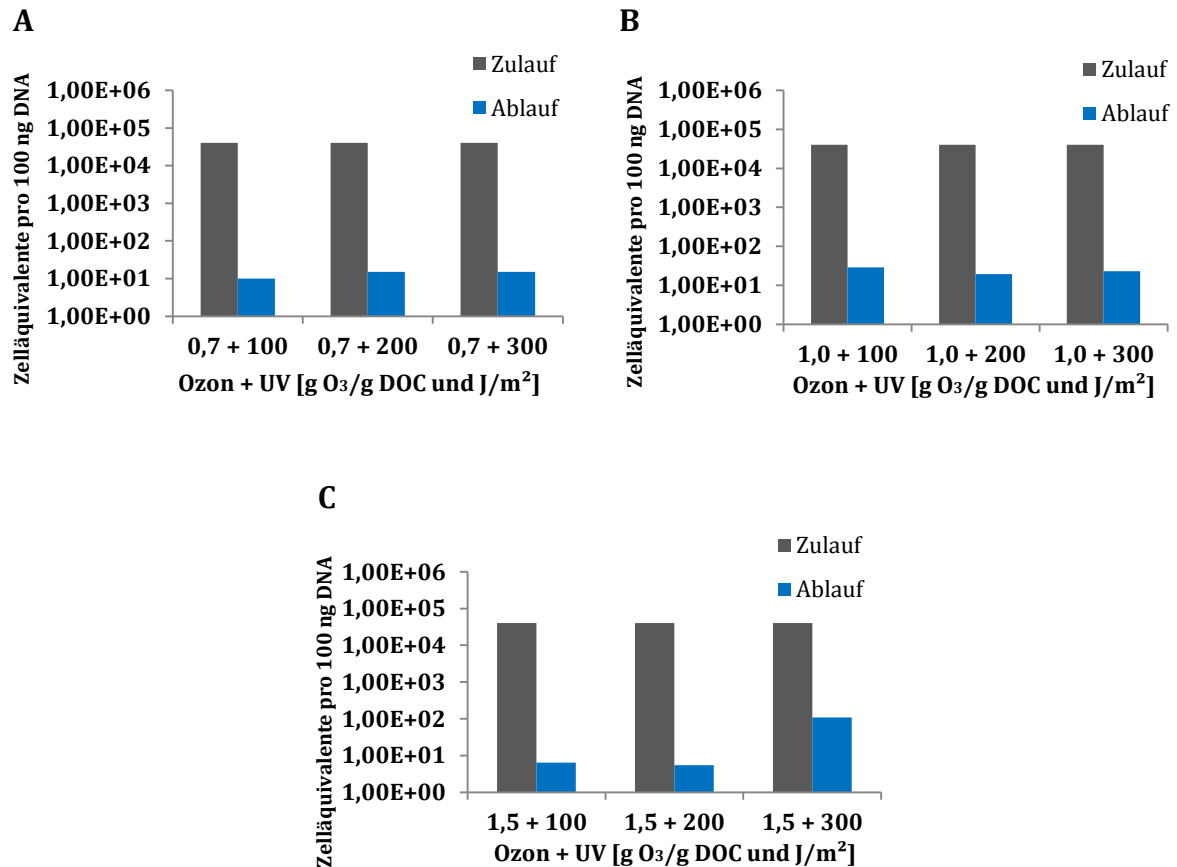
einen weitaus geringeren Effekt auf Enterokokken. Die Reduktions-leistung lag zwischen 20% ( $2,6 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA) und 71% ( $1,2 \times 10^4$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA) bei UV-Intensitäten von 100 bis 300 J pro  $m^2$  (Abbildung 30B).



**Abbildung 30** Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf Enterokokken in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (blau) der jeweiligen Abwasserbehandlung

Eine Kombination beider Verfahren brachte keine weitere Reduktion der Enterokokken und Betrag bei 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC und 100, sowie 200 J pro  $m^2$  99,9%. Diese Reduktion führt zu 5 Zelläquivalenten pro 100 ng DNA in der überlebenden Population (Abbildung 31C). Somit bringt die Kombination von Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung bei der Reduktion von Enterokokken gegenüber der Ozonung als Einzelverfahren keinen Mehrgewinn.



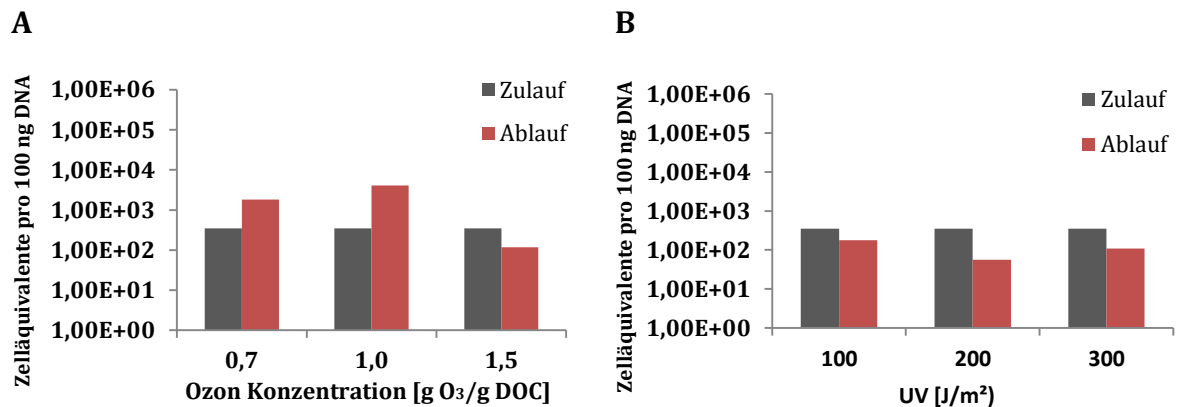


**Abbildung 31** Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf Enterokokken in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (blau) der jeweiligen Abwasserbehandlung

Frühere Arbeiten belegen eine verringerte Anfälligkeit Gram-positiver Bakterien (*Staphylococcus aureus* und Enterokokken) gegenüber UV-Behandlung aufgrund der aufgelagerten und dickeren Peptidoglycan-Schicht sowie einem kleineren Genom, so dass in diesen Bakterien weniger UV-induzierte Pyrimidindimere gebildet werden können (McKinney and Pruden, 2012; Kraft et al., 2011). Methicillin-resistente Staphylokokken wurden weder im Zulauf der Ozonbehandlung, noch im Ablauf während des Untersuchungszeitraums festgestellt.

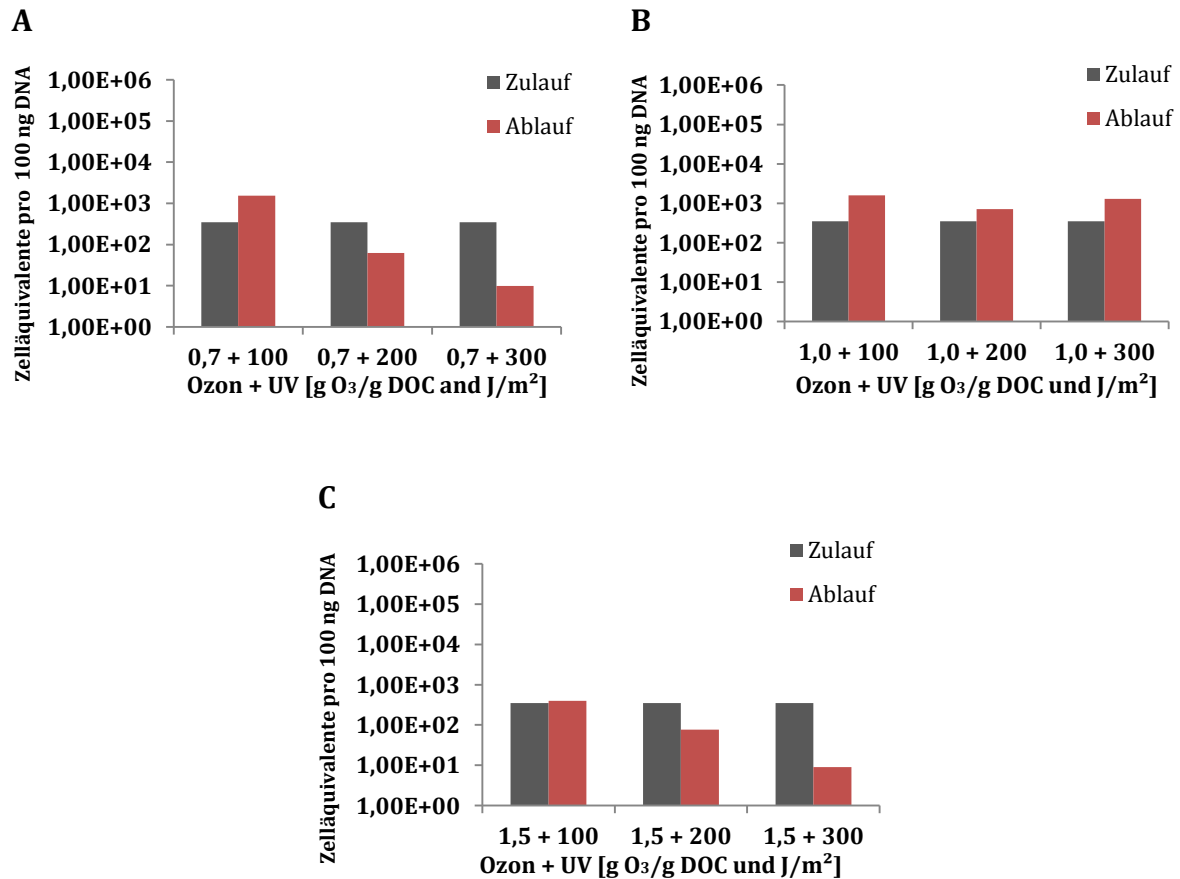
Die Anreicherung der Antibiotikaresistenzen gegen Imipenem (*blaVIM*) und Vancomycin (*vanA*) nach Ozonbehandlung in der überlebenden Population, die an der Pilotanlage am Klärwerk Südhessen festgestellt wurde, bestätigte sich auch an der Pilotanlage am Klärwerk Steinhäule für die Ozondosen 0,7 und 1,0 g O<sub>3</sub> pro g DOC. Bei Verwendung einer Ozondosis von 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC kam es zu einer Reduktion der Imipenemresistenz in der überlebenden Population um 66% auf  $1,2 \times 10^2$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA. Im Gegensatz zur Ozonbehandlung trat bei der UV-Bestrahlung keine Anreicherung des Imipenemresistenzgens in der überlebenden Population

auf (Abbildung 32B). Die Reduktionsleistung gegenüber der unbehandelten Probe lag für 100 J pro m<sup>2</sup> bei 48%, für 200 J pro m<sup>2</sup> bei 84% und für 300 J pro m<sup>2</sup> bei 69%.



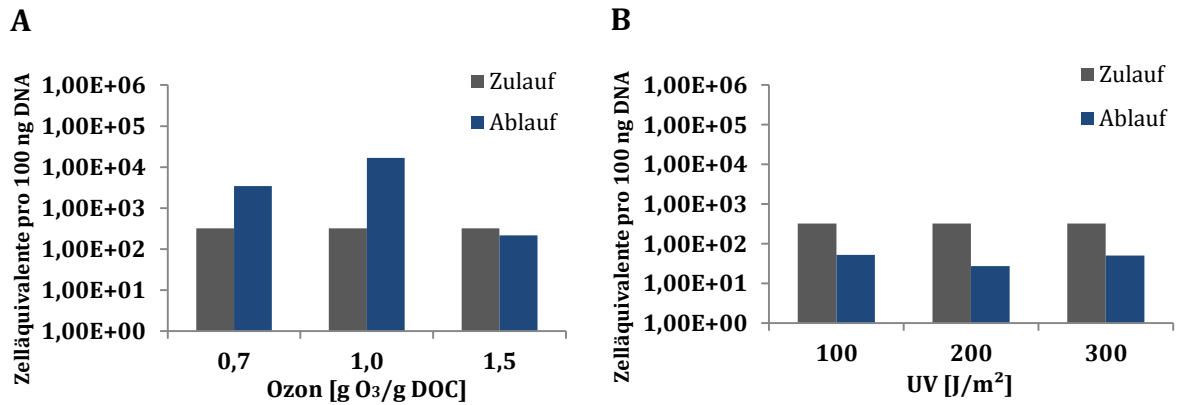
**Abbildung 32** Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf Imipenem-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (rot) der jeweiligen Abwasserbehandlung

Die Kombination aus Ozonbehandlung und nachfolgender UV-Bestrahlung ist besonders effektiv bei 300 J pro m<sup>2</sup>. Bei dieser UV-Intensität liegen die Reduktion für Imipenem-resistente Bakterien in Kombination mit 0,7 und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC bei 97% und entsprechen nur noch 9 bis 10 Zelläquivalenten pro 100 ng DNA (Abbildung 33A und 33C). Die Ergebnisse zur Kombination von 1 g O<sub>3</sub> pro g DOC mit den verschiedenen UV-Intensitäten zeigen aus ungeklärten Gründen jedoch nicht diesen beobachteten Effekt auf (Abbildung 33B).



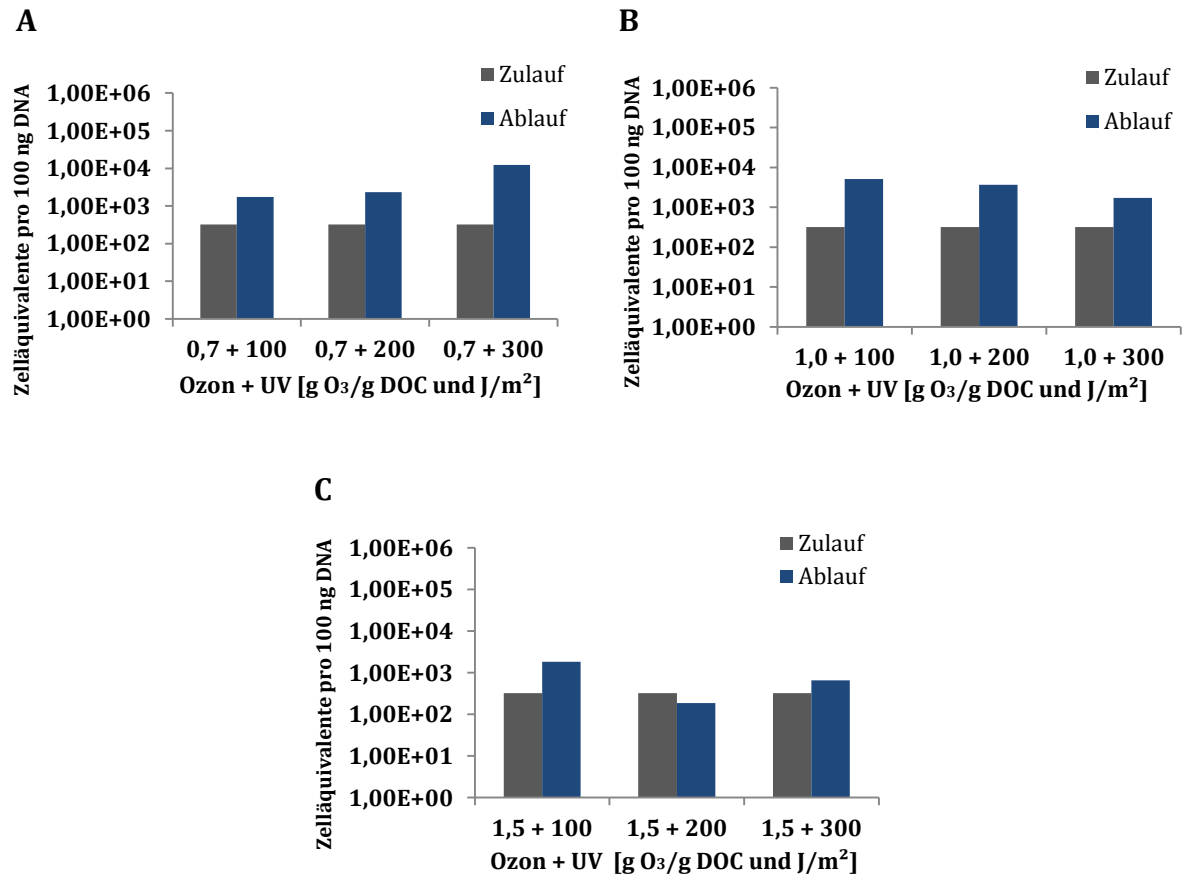
**Abbildung 33** Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf Imipenem-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (rot) der jeweiligen Abwasserbehandlung

Die voran gegangenen Untersuchungen am Klärwerk Südhessen zum Einfluss der Ozonbehandlung auf Vancomycin-resistente Bakterien im Abwasser zeigten eine Anreicherung dieser Bakterien in der überlebenden Population bei einer Konzentration von 0,85 g O<sub>3</sub> pro g DOC an. Dieser selektive Effekt wurde sowohl bei einer Konzentration von 0,7 g O<sub>3</sub> pro g DOC (5-facher Anstieg), als auch bei 1 g O<sub>3</sub> pro g DOC (10-facher Anstieg) am Klärwerk Steinhäule bestätigt (Abbildung 34A). Eine Erhöhung der Konzentration auf 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC führte dagegen zu keiner Anreicherung von Vancomycin-resistenten Bakterien in der überlebenden Population, sondern ihr Anteil verringerten sich um 33% auf  $2,2 \times 10^2$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA. Parallel dazu zeigt die Behandlung von konventionell gereinigtem Abwasser mit UV im Gegensatz zur Ozonbehandlung schon ab 100 J pro m<sup>2</sup> eine Reduktion der *vanA*-Anteile um 83% auf  $5,2 \times 10^1$  Zelläquivalente pro 100 ng DNA (Abbildung 34B). Eine Steigerung der UV-Intensität auf 200 bzw. 300 J pro m<sup>2</sup> erhöht die Reduktionsleistung nur noch geringfügig (84% bis 91%). Bei der Verfahrenskombination aus Ozon- und anschließender UV-Behandlung tritt erst ab einer Ozondosis von 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC und einer UV-Intensität von 200 J pro m<sup>2</sup> keine Anreicherung der *vanA*-Anteile in der Bakterienpopulation mehr auf.



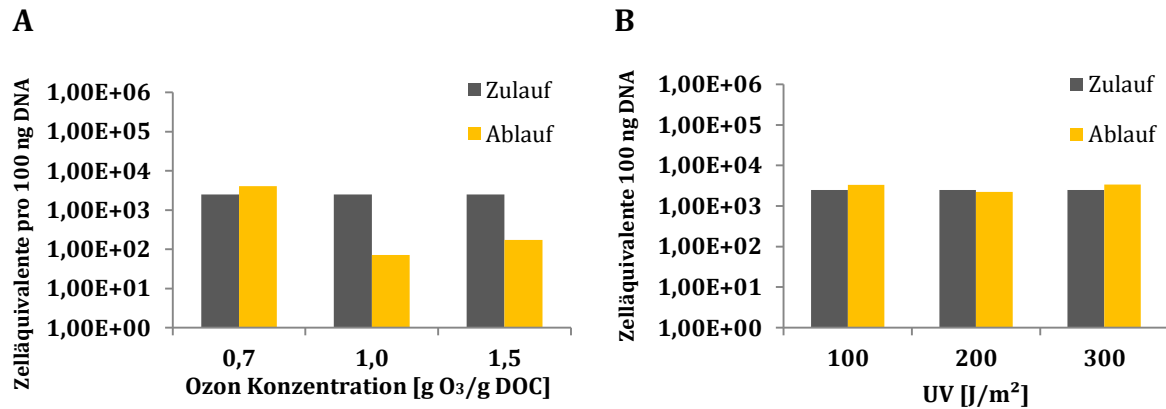
**Abbildung 34** Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf Vancomycin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (dunkelblau) der jeweiligen Abwasserbehandlung

Allerdings liegt die Reduktion der Vancomycin-resistenten Bakterien durch die Verfahrenskombinationen unterhalb der Reduktionsleistung der alleinigen UV-Behandlung (42%, Abbildung 35). Dieser Effekt ist eine Kombination aus ozonrobusteren Vancomycin-resistenten Bakterien die gleichzeitig anfällig gegenüber der UV-Behandlung sind und dem Großteil der Bakterienpopulation, die sowohl durch die Ozon- als auch durch die UV-Behandlung reduziert werden. Der Überlebensvorteil von ozonrobusteren Vancomycin-resistenten Bakterien kommt nur während der Verfahrenskombination zum Tragen, nicht aber bei der alleinigen UV-Behandlung. Daher erscheint die Reduktionsleistung in der Bakterienpopulation durch UV-Behandlung höher als bei der Verfahrenskombination.



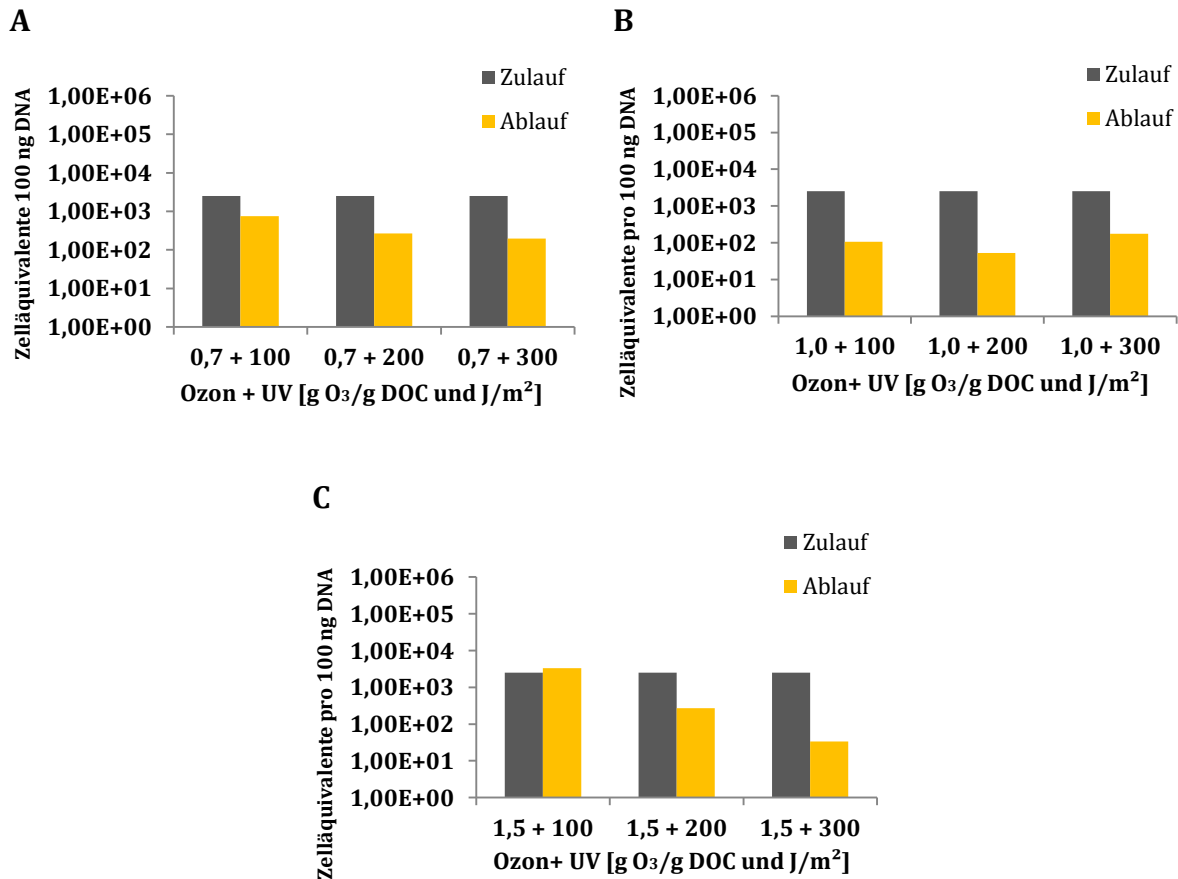
**Abbildung 35** Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf Vancomycin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (dunkelblau) der jeweiligen Abwasserbehandlung

Während an der Kläranlage Südhessen eine stabile Verteilung der Ampicillin-resistenten Bakterien nach Ozonbehandlung (0,85 g O<sub>3</sub> pro g DOC) in der überlebenden Population beobachtet wurde, wurden bei einer niedrigeren Ozondosis (0,7 g O<sub>3</sub> pro g DOC) eine Selektion von Ampicillin-resistenten Bakterien beobachtet (Abbildung 36A).



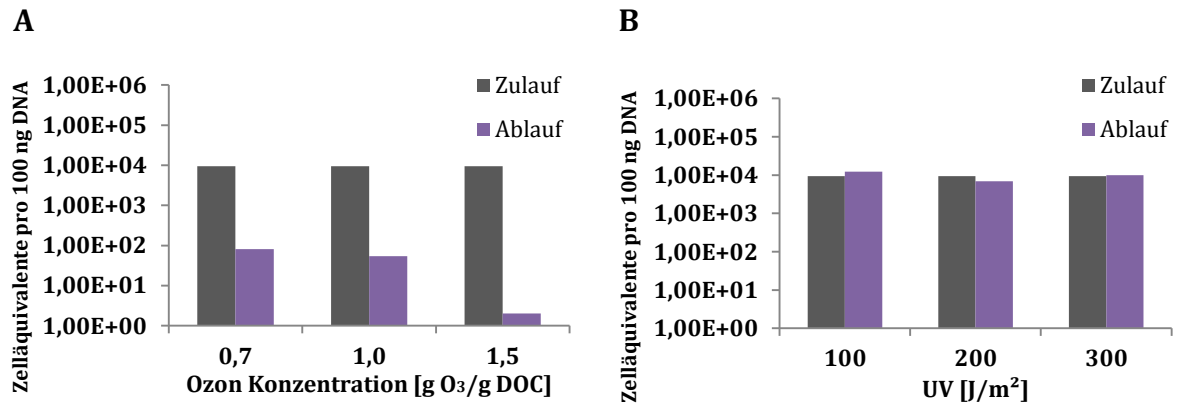
**Abbildung 36** Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf Ampicillin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (gelb) der jeweiligen Abwasserbehandlung.

Höhere Ozondosen führten dagegen zu einer Reduktion von bis zu 97% (1g O<sub>3</sub> pro g DOC), wobei die Reduktionsleistung bei 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC mit 93% wieder geringer ausfiel. Die verbleibende Konzentration von Ampicillin-resistenten Bakterien lag dabei zwischen  $7,2 \times 10^1$  und  $1,7 \times 10^2$  Zelläquivalenten pro 100 ng DNA. Bei Untersuchungen zur UV-Behandlung von konventionell gereinigtem Abwasser mit Intensitäten von 100 – 300 J pro m<sup>2</sup> wurden nur minimale Effekte auf Ampicillin-resistente Bakterien beobachtet. Die Abundanz von Ampicillin-resistenten Bakterien in der überlebenden Population schwankte zwischen -11% bis +34% (Abbildung 36B). Durch die Kombination aus 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC und 300 J pro m<sup>2</sup> wurde eine Reduktionsleistung von 98% erreicht. Dabei ist zu beachten, dass niedrigere UV-Intensitäten nicht nur zu einer geringeren Reduktionsleistung führen, sondern dass bei 100 J pro m<sup>2</sup> der vorherige Reduktionseffekt von 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC durch die nachfolgende UV-Behandlung negiert wurde (Abbildung 37C). Unter Berücksichtigung, dass populationsbezogene Anteile immer ein Verhältnis zwischen der Abundanz des untersuchten Zielgens und dem Rest der Population darstellen, spiegelt der beobachtete Effekt einen Überlebensvorteil von Ampicillin-resistenten Bakterien wieder, wenn hohe Ozondosen mit geringer UV-Intensität kombiniert werden.



**Abbildung 37** Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf Ampicillin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (gelb) der jeweiligen Abwasserbehandlung

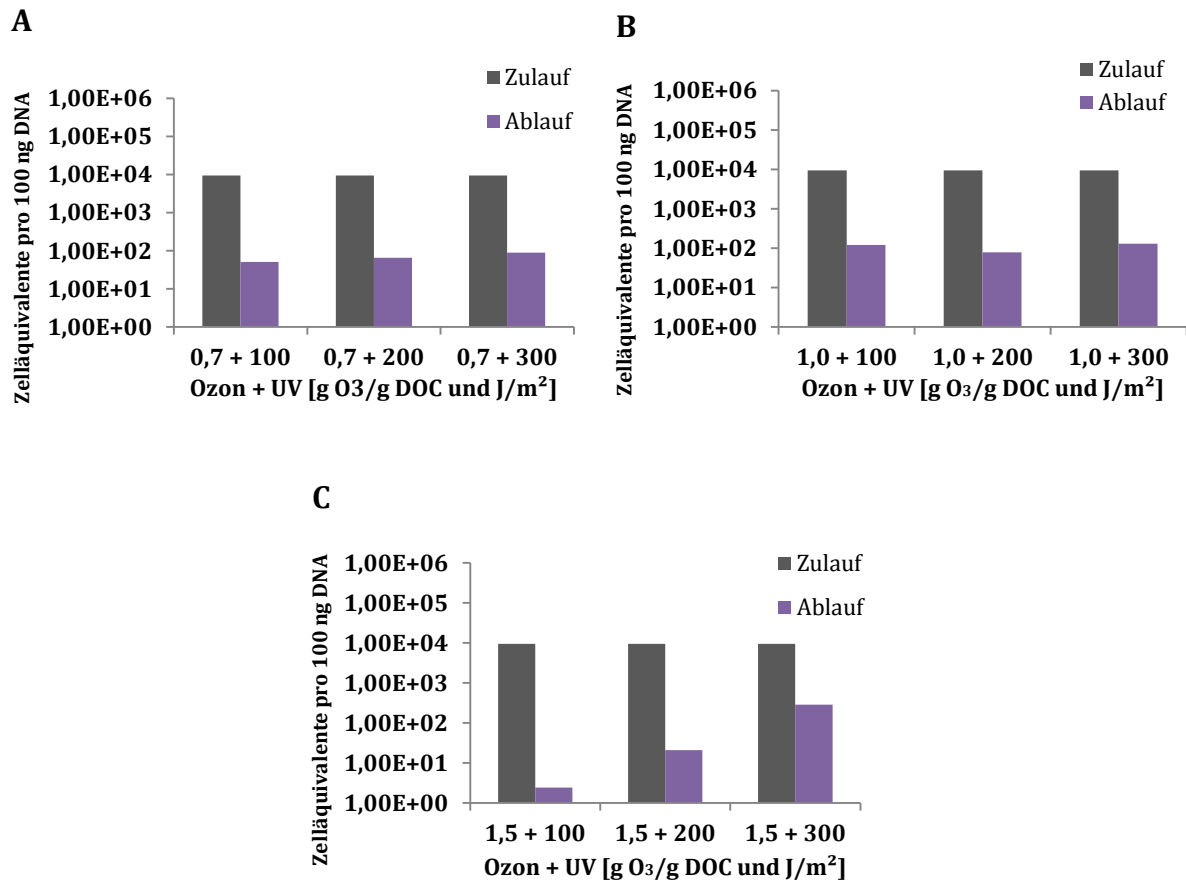
Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Antibiotikaresistenzgenen demonstrierten Bakterien mit Erythromycinresistenz (*ermB*) eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber Ozonbehandlung proportional zur eingesetzten Ozondosis. Ausgehend von dieser Abhängigkeit lag die Reduktionsleistung zwischen 99% (0,7 g O<sub>3</sub> pro g DOC) und 99,98% (1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC, Abbildung 38A) und somit nahe der Nachweisgrenze für *ermB* Zelläquivalente. Im Gegenteil zur Ozonanfälligkeit wiesen die UV-Behandlungen mit 100 bis 300 J pro m<sup>2</sup> keinen derartigen Effekt bei *ermB*-Genträgern gegenüber der Behandlung auf und schwankten zwischen 6,9 x 10<sup>3</sup> (-26%) und 1,2 x 10<sup>4</sup> (+28%) Zelläquivalenten pro 100 ng DNA gegenüber der unbehandelten Probe (Abbildung 38B).



**Abbildung 38** Effekt verschiedener Ozondosen (A) und UV-Intensitäten (B) auf Erythromycin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (violett) der jeweiligen Abwasserbehandlung

In den Untersuchungen zur Verfahrenskombination von Ozonbehandlung und nachfolgender UV-Bestrahlung ist vor allem die Anfälligkeit der Erythromycin-resistenten Bakterien gegenüber höheren Ozondosen zu beobachten. So werden bei 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC und 100 J pro m<sup>2</sup> ebenfalls Reduktionen von 99,98% erreicht (Abbildung 39C). Die Erhöhung der Ozon nachfolgenden UV-Konzentrationen führte dabei nicht zu einer weiteren Verbesserung der Reduktionsleistung, sondern verschlechtert sich mit zunehmender UV-Intensität. Die beobachtete Verschlechterung der Reduktionsleistung ist auf die Widerstandsfähigkeit der Erythromycin-resistenten Bakterien gegenüber der UV-Behandlung zurück zu führen, während die anderen Anteile der Bakterienpopulation im Abwasser durch die höheren Ozon- und UV-Konzentrationen im Vergleich zu *ermB*-Genträgern im Verhältnis dazu stärker reduziert werden.





**Abbildung 39** Effekt verschiedener Ozondosen 0,7 (A), 1,0 (B) und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC (C) in Kombination mit verschiedenen UV-Intensitäten auf Erythromycin-resistente Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation vor (grau) und nach (violett) der jeweiligen Abwasserbehandlung

Dennoch führt die Verfahrenskombination aus Ozon- und nachfolgender UV-Behandlung zu einer Verbesserung der mikrobiologischen Abwasserqualität. Einerseits wurde durch die Erhöhung der eingesetzten Ozondosis eine weitere Reduktion von Enterokokken erreicht, andererseits führt die nachfolgende UV-Bestrahlung zu einer Reduktion der ozonrobusteren *P. aeruginosa* Fraktion sowie zu einer Verringerung der Anteile an Imipenem-resistenten Bakterien. Dennoch ist die Anreicherung einiger Antibiotikaresistenzgene und Bakterien durch die Ozonbehandlung nur teilweise mit einer höheren Ozondosis in Kombination mit UV zu bewerkstelligen, sodass das bestehende Restrisiko der Verbreitung einiger hygienisch relevanter mikrobiologischer Parameter nicht vollständig eliminiert werden konnte. Allerdings ist die Kombination von Abwasserbehandlungsverfahren mit unterschiedlichen Angriffspunkten zur mikrobiologischen Inaktivierung eine effizientere Methode um Selektion und Anreicherung klinisch relevanter Antibiotikaresistenzen und opportunistischer Bakterien in der Bakterienpopulation zu vermeiden, als der Einsatz des jeweiligen Einzelverfahrens.

### 3.3.3 Zusammenfassung der mikrobiologischen Charakterisierung einer Ozonbehandlung und Verfahrenskombinationen an der Großkläranlage Neu Ulm-Steinhäule

Aufgrund der beobachteten Selektion einiger der untersuchten Antibiotikaresistenzgene und opportunistischen Bakterien durch die Ozonbehandlung an der Pilotanlage am Klärwerk Südhessen, wurde am Standort Neu Ulm-Steinhäule eine Pilotanlage zur Verfahrenskombination aus Ozon- mit nachfolgender UV-Behandlung im kleintechnischen Maßstab installiert. Es wurden sowohl verschiedene Ozon-, als auch UV-Konzentrationen (0,7, 1,0 und 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC; 100, 200 und 300 J pro m<sup>2</sup> UV) kombiniert.

Die effektivste Verfahrenskombination zur Reduktion von *P. aeruginosa* wurde bei 1,5 g O<sub>3</sub> pro gDOC und 300 J pro m<sup>2</sup> erzielt, wobei der Anteil an *P. aeruginosa* an der Population um 91% gegenüber dem Zulauf des Ozonsystems reduziert wurde (2,2 x 10<sup>1</sup> Zelläquivalente pro 100 ng DNA). Die Enterokokken-Abundanz verringerte sich hingegen bei allen 3 verwendeten Ozonkonzentrationen deutlich (bis zu 99,9% bei 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC). Im Gegenteil zur Ozonung zeigt die UV-Bestrahlung einen weitaus geringeren Effekt auf die Enterokokken-Abundanz. Die Reduktionsleistung lag zwischen 20% und 71% bei UV-Intensitäten von 100 bis 300 J pro m<sup>2</sup>. Die verringerte UV-Anfälligkeit von Enterokokken im Vergleich zu *P. aeruginosa* ist dabei auf die aufgelagerte dickere Peptidoglycanschicht der Gram-positiven Enterokokken, sowie auf ein kleineres Genom (weniger UV-induzierte Pyrimidin-Dimere) zurückzuführen.

Untersuchungen von Imipenem-resistenten Bakterien nach UV-Bestrahlung wiesen im Gegensatz zur Ozonbehandlung keine Anreicherung in der überlebenden Population auf. Der Selektionseffekt der Imipenem-resistenten Bakterien gegenüber der Ozonbehandlung (Hydroxylradikale) scheint durch die veränderte Wirkungsweise der UV-Bestrahlung (Thymin-Dimere) nicht mehr gegeben zu sein. Dadurch wurde eine Reduktionsleistung von bis zu 84% gemessen. Bei Vancomycin-resistenten Bakterien konnte ein Synergie-Effekt aus Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung abgeleitet werden. Allerdings tritt erst bei einer Ozondosis von 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC und einer UV-Intensität von 200 J pro m<sup>2</sup> keine Anreicherung der *vanA*-Anteile mehr in der Bakterienpopulation auf. Weiterhin wurde durch die Verfahrenskombination von 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC und 300 J pro m<sup>2</sup> auch bei Ampicillin-resistenten Bakterien eine Reduktion der Populationsanteile von 98% festgestellt.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Antibiotikaresistenzgenen zeigten Bakterien mit Erythromycinresistenz (*ermB*) auch am Standort Neu Ulm-Steinhäule eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber Ozonbehandlung. Die Reduktionsleistung war proportional zur

eingesetzten Ozondosis und lag zwischen 99% (0,7 g O<sub>3</sub> pro g DOC) und 99,98% (1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC). Im Gegenteil zur Ozonanfälligkeit wiesen die UV-Behandlungen mit 100 bis 300 J pro m<sup>2</sup> keinen derartigen starken Effekt auf und führte teilweise zu einem Anstieg (+28%) der *ermB*-Anteile in der überlebenden Population.

Die hier verwendete Kombination von Abwasserbehandlungsverfahren mit unterschiedlichen Angriffspunkten zur mikrobiologischen Inaktivierung erweist sich gegenüber den untersuchten Einzelverfahren als eine effizientere Methode, um Selektion und Anreicherung klinisch relevanter Antibiotikaresistenzen und opportunistischer Bakterien in der Bakterienpopulation des Abwassers zu vermeiden. So zeigte sich für *P. aeruginosa*, dass eine Ozonbehandlung (1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC) eine Selektion auf bis zu 1,0 x10<sup>3</sup> *P. aeruginosa* Zelläquivalenten pro 100 ng DNA induzierte (4-fache Zunahme), während durch die UV Behandlung (300 J pro m<sup>2</sup>) zumindest eine Teilreduktion der *P. aeruginosa* Abundanzen um ca. 50% erzielt werden konnte. Die Kombination beider Verfahren führte zu einer gesteigerten Reduktion von über 90% der *P. aeruginosa* Abundanzen pro 100 ng DNA. Auch bei der Reduktion der Imipenemresistenz konnte eine Verbesserung gegenüber der Ozon- (66%; 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC) und UV-Behandlung (84%; 300 J pro m<sup>2</sup>) erreicht werden. Wenn beide Verfahren kombiniert werden erreicht man Reduktionsleistungen von 97% bei 1,5 g O<sub>3</sub> pro g DOC mit 300 J pro m<sup>2</sup>. Dennoch wurden nicht alle mikrobiologischer Parameter effizient reduziert. Daher sollten weitere Untersuchungen zur Elimination des noch bestehenden Restrisikos durch weitere Verfahrenskombination durchgeführt werden.

### **3.4 Mikrobiologisches Bewertungskonzept zur Evaluierung technischer Systeme**

Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden zunehmend Untersuchungen zur mikrobiologischen Charakterisierung der Abwässer in Kläranlagen und angrenzenden Oberflächengewässern sowie nachgeschalteten Wassersystemen angestrebt. Mit Hilfe von Kultivierung und molekularbiologischen Methoden wurden dabei festgestellt, dass sowohl opportunistische Bakterien, als auch klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene die konventionelle Abwasserreinigung überstehen, in bestimmten Kompartimenten der Kläranlage akkumulieren können und auch in nachfolgenden Wassersystemen zu finden sind. Daher werden Abwasserbehandlungsverfahren zur Reduktion der mikrobiologischen Belastung immer wichtiger, um die Verbreitung von klinisch relevanten Mikroorganismen und Antibiotikaresistenzgenen in der Umwelt zu reduzieren.

Um die Effizienz der Ozonbehandlung zur Keimreduktion zu bewerten sowie die Veränderungen in der Zusammensetzung der Bakterienpopulation im Abwasser zu berücksichtigen, wurden neben der Konzentration der mikrobiologischen Parameter pro 100 mL Abwasser auch deren Abundanzen pro 100 ng DNA aus der Biomasse berücksichtigt.

Für die abschließende Charakterisierung und Eingruppierung in ein mikrobiologisches Bewertungskonzept wurden beide Bezugsgrößen gleich gewichtet und in einem kombinierten Wert abgebildet, der als mikrobiologischer Bewertungsindex (MBI) bezeichnet und in dieser Arbeit erstmals definiert wird.

Da nur ein kurzer Untersuchungszeitraum zur Verfahrenskombination von Ozon- und UV-Behandlung am Klärwerk Neu Ulm-Steinhäule zur Verfügung stand, wurden die über einen Zeitraum von 2 Jahren gemessenen Daten zur Ozonbehandlung am Klärwerk Südhessen als Beispiel verwendet, um sowohl die reine Eliminationsleistung einer Ozonbehandlung, als auch die Anreicherung bestimmter biologischer Parameter durch den Selektionsdruck zu berücksichtigen. Eine Kombination dieser beiden Betrachtungsweisen ist wichtig, um das Verbreitungspotential in nachfolgenden Wassersystemen und der Umwelt einzuschätzen zu können. Dieses Vorgehen ist sinnvoll, da in den durchgeführten Untersuchungen zur Ozonung erkannt wurde, dass der Anteil spezifischer antibiotikaresistenter Bakterien in der überlebenden Bakterienpopulation nach der Ozonung anstieg.

Die im Kapitel 2.5 und 2.6 genannten Parameter wurden als Grundlagen für den nachfolgenden Bewertungsindex herangezogen (Tabelle 18). Die Bewertung erfolgt nach der Häufigkeit der gefundenen Parameter, jeweils in 100 ng DNA und in 100 mL Volumen. Die oberen und unteren Grenzen einer jeden Bewertungskategorie spezifizieren einen Toleranzbereich von einer Zehnerpotenz. Durch die Skalierung der Bewertungsmatrix werden fünf Zehnerpotenzen an Zelläquivalenten abgedeckt. Dies ermöglicht die Bewertung und Darstellung von Abwasserprozessen bis hin zur Desinfektion mit einer Reduktion der Zelläquivalente von fünf Zehnerpotenzen. Die dargestellten mikrobiologischen Abundanzen (Tabelle 19 und 20) stellen die durchschnittlich über einen Zeitraum von 2 Jahren gemessenen Werte aus der Kläranlage Südhessen dar.

Die erhaltene Summe aus der Bewertungsmatrix zeigt auf einer 5-teiligen Skala den erforderlichen Handlungsbedarf an und die Einzelkategorien die Vor- und Nachteile des verwendeten Prozesses. Die Bewertungsmatrix ist durch weitere Parameter erweiterbar und auch die Bewertungsskala kann weiter differenziert werden. Neben den gemessenen Werten, die ausschlaggebend für das Bewertungskonzept sind, wurde auch der Grad der jeweiligen

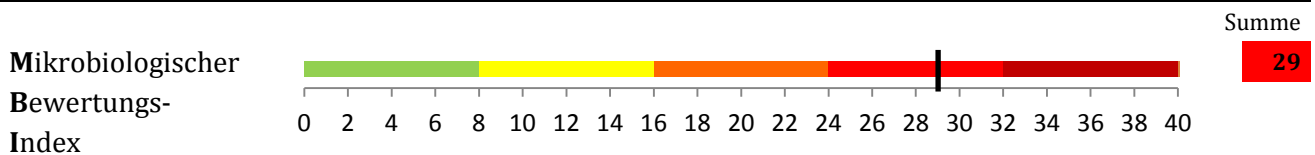
parameterspezifischen Reduktion bestimmt und in Klammern angegeben (Tabelle 20). Dadurch wird sowohl die Leistung des Ozonsystems als auch das bestehende Restrisiko erfasst.

**Tabelle 18** Mikrobiologischer Bewertungsindex (MBI)

MBI		Punkte
1	Sehr niedriges Risiko	0 – 8
2	Niedriges Risiko	8 – 16
3	Erhöhtes Risiko (Handlungsbedarf)	16 – 24
4	Starkes Risiko (erhöhter Handlungsbedarf)	24 – 32
5	Sehr starkes Risiko (sofortiger Handlungsbedarf)	32 – 40

**Tabelle 19** Anwendung der Bewertungsmatrix auf den Zulauf der Ozonbehandlung

Zulauf Ozonung	Abundanzen pro 100 ng DNA					Abundanzen pro 100 mL Abwasser					
	0 Pkt.	1 Pkt.	2 Pkt.	3 Pkt.	4 Pkt.	0 Pkt.	1 Pkt.	2 Pkt.	3 Pkt.	4 Pkt.	
	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>5</sup>	> 10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>4</sup>	> 10 <sup>4</sup>	
<i>blaVIM</i>			6,6 x 10 <sup>3</sup>					4,4 x 10 <sup>2</sup>			4
<i>vanA</i>			8,3 x 10 <sup>3</sup>					5,5 x 10 <sup>2</sup>			4
<i>ampC</i>			3,0 x 10 <sup>3</sup>					2,0 x 10 <sup>2</sup>			4
<i>ermB</i>			2,7 x 10 <sup>3</sup>					1,8 x 10 <sup>2</sup>			4
Enterokokken				2,6 x 10 <sup>4</sup>					1,7 x 10 <sup>3</sup>		6
Staphylokokken	1,7 x 10 <sup>1</sup>					1,0 x 10 <sup>0</sup>					0
<i>P. aeruginosa</i>			1,2 x 10 <sup>3</sup>				7,8 x 10 <sup>1</sup>				3
Enterobakterien			3,0 x 10 <sup>3</sup>					2,0 x 10 <sup>2</sup>			4



Im Gegensatz zum Einsatz der Ozonung in der Trinkwasseraufbereitung bei der bis zu vier Zehnerpotenzen Reduktion erreicht werden, wurden im Abwasser bei den mikrobiologischen Untersuchungen eine allgemeine Inaktivierung von bis zu maximal 1,5 Zehnerpotenzen gemessen. Diese Diskrepanz kann auf die höhere Konzentration an organischen Kohlenstoffverbindungen zurückgeführt werden, die im Abwasser mit dem Ozon bzw. den Hydroxylradikale reagieren und damit einen Puffer für die im Abwasser befindlichen Bakterien darstellen.

Bei der Einteilung der Abundanzen pro 100 ng DNA in die einzelnen Bewertungskategorien, entsprechen 100 ng DNA ca. 10<sup>7</sup> Bakterien. Das bedeutet, weniger als 10<sup>3</sup> Abundanzen in 100 ng DNA stehen somit für einen Anteil von weniger als 0,01% an der bakteriellen Population und

stellen damit nur ein geringes bis kein Restrisiko dar (1 bis 0 Pkt.). Unter Berücksichtigung dieser Betrachtungsweise tragen weniger als 0,08% aller Bakterien im Ozonzulauf die klinisch wichtigen Antibiotikaresistenzen *blaVIM* (Imipenemresistenz) und *vanA* (Vancomycinresistenz), was einer Bewertungskategorie von 2 Punkten für die Rubrik  $<10^4$  Abundanzen pro 100 ng DNA entspricht und damit bereits einen Handlungsbedarf anzeigen. Die Konzentration der anderen untersuchten Antibiotikaresistenzgene und opportunistischen Bakterien liegt mit einem Anteil von weniger 0,03% an der Gesamtpopulation darunter, aber dennoch im gleichen Bewertungsbereich (Tabelle 19, 2 Pkt.).

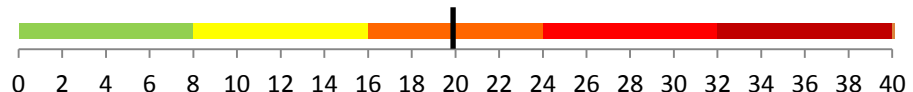
Für die volumenbezogene Eingruppierung wurden weniger als 10 klinisch relevante Antibiotikaresistenzträger und opportunistische Bakterien in 100 mL Abwasser als sehr niedriges Risiko eingestuft (0 Pkt.). So liegt die Konzentration im Ozonzulauf an *blaVIM* und *vanA* bei etwas mehr als 500 Resistenzträgern pro 100 mL Abwasser, was mit 2 Punkten für die Rubrik  $<10^3$  Häufigkeiten pro 100 mL bewertet wurde und damit auch hier auf einen Handlungsbedarf hinweisen. Die anderen Parameter liegen mit Ausnahme der Enterokokken bei weniger als 200 Resistenzträgern pro 100 mL Abwasser (2 bis 0 Pkt.).

Mit der aufgestellten Bewertungsmatrix wurde der konventionelle Ablauf der Kläranlage vor der Ozonung charakterisiert (Tabelle 19). Eine Gesamtpunktzahl von 29 resultiert in einem MBI von 4 und zeigt in diesen Fall einen erhöhten Handlungsbedarf an (Tabelle 18).

**Tabelle 20** Anwendung der Bewertungsmatrix auf den Ablauf der Ozonung. In Klammern ist der Wert der Reduktionsleistung/Akkumulation angegeben

Ablauf Ozonung	Abundanzen pro 100 ng DNA					Abundanzen pro 100 mL Abwasser					
	0 Pkt.	1 Pkt.	2 Pkt.	3 Pkt.	4 Pkt.	0 Pkt.	1 Pkt.	2 Pkt.	3 Pkt.	4 Pkt.	
	$< 10^2$	$< 10^3$	$< 10^4$	$< 10^5$	$> 10^5$	$< 10^1$	$< 10^2$	$< 10^3$	$< 10^4$	$> 10^4$	
<i>blaVIM</i>				$5,1 \times 10^4$ (+676%)				$1,1 \times 10^2$ (-75%)			5
<i>vanA</i>				$3,4 \times 10^4$ (+307%)				$1,1 \times 10^2$ (-79%)			5
<i>ampC</i>			$2,7 \times 10^3$ (-9%)				$1,8 \times 10^1$ (-90%)				3
<i>ermB</i>	$2,1 \times 10^1$ (-99%)					$7,2 \times 10^0$ (-95%)					0
Enterokokken		$5,2 \times 10^2$ (-98%)				$3,5 \times 10^0$ (-99%)					1
Staphylokokken	$6,2 \times 10^0$ (-65%)					$< 1 \times 10^0$					0
<i>P. aeruginosa</i>			$1,7 \times 10^3$ (+41%)				$6,2 \times 10^1$ (-20%)				3
Enterobakterien			$2,8 \times 10^3$ (-9%)				$1,8 \times 10^1$ (-90%)				3

Mikrobiologischer  
Bewertungs-  
Index



Summe  
20

In Tabelle 20 wurde die Bewertungsmatrix auf den Ablauf der Ozonung angewendet und erreicht eine Gesamtpunktzahl von 20, was einer Verbesserung der mikrobiologischen Abwasserqualität, aber immer noch einem erhöhten Restrisiko mit einem MBI von 3 entspricht. Daher sollten weiterführende Abwasserbehandlungsverfahren angestrebt werden, um das vorhandene Restrisiko weiter zu senken. Der Grund dafür liegt an der Häufung der klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgene innerhalb der Population durch die Ozonbehandlung von vorher ca. 0,08% (2 Pkt.) auf über 0,5% (starkes Risiko, 3 Pkt.). Dieser Effekt steht der Reduktion des Großteils an opportunistischen Bakterien pro 100 ng DNA entgegen, so dass die Verbesserung der allgemeinen Abwasserqualität (MBI: 3) keiner generellen Verbesserung entspricht (Tabelle 20). An diesem Phänomen wird deutlich, dass neben dem Summenparameter auch die Einzelkategorien berücksichtigt werden müssen, und eine Definition von Grenzwerten für Antibiotikaresistenzen und opportunistische Bakterien nötig sind, die dabei helfen, Ausschlusskriterien zu definieren, um das Risiko eines Abwasserprozesses besser evaluieren zu können.

Am Beispiel der Ozonbehandlung wird deutlich, dass volumenbezogene Bewertungskonzepte allein nicht ausreichen, um einen Abwasserprozess adäquat zu beurteilen, wenn es um die Erfassung von Restrisiken geht. Der Effekt der Selektion der Antibiotikaresistenzträger wird durch die Reduktion der Gesamtkeimfracht bei volumenbezogenen Konzentrationen maskiert.

Untersuchungen zu den der Ozonung nachgeschalteten Filtersystemen an der Kläranlage Südhessen (granulierte Aktivkohle und Biofilter) zeigten zwar eine Reduktion der untersuchten mikrobiologischen Parameter. Diese Reduktion bewegte sich jedoch lediglich in einem Bereich von 0,2 Zehnerpotenzen pro 100 ng DNA (max. 40 %). Dies bewirkte keine Veränderung des mikrobiologischen Bewertungs-Index (MBI).

Durch die Auswahl klinisch relevanter mikrobiologischer Parameter wurde eine Bewertungsmatrix erstellt, die die aktuelle Lage im humanmedizinischen Bereich (Kapitel 1.3.1) berücksichtigt und die Notwendigkeit einer vierten Reinigungsstufe als gegeben erachtet.

Untersuchungen zum bakteriellen Regenerationspotential zeigen (Kapitel 3.2.6), dass sich opportunistisch pathogene und antibiotikaresistente Bakterien unter günstigen Umweltbedingungen wieder vermehren können. Im Gegensatz zu chemischen Parametern, deren Risikopotential ausschließlich nach ihrer Konzentration bewertet wird, muss bei einer mikrobiologischen Risikocharakterisierung auch das Regenerationspotential mit einbezogen werden. Daher müssen für eine mikrobiologische Risikocharakterisierung mittels molekularbiologischer Untersuchungen die Konzentrationen klinisch relevanter Parameter nicht nur volumenbezogen sondern zwingend auch populationsbezogen ermittelt werden. Eine

Kombination beider Ansätze stellt ein geeignetes Mittel dar, um mögliche Restrisiken für nachfolgende aquatische Systeme adäquat abzuschätzen zu können (Risikopotential).



## 4 Ausblick

Da Kläranlagen kontinuierlich Antibiotikaresistenzen und opportunistische Bakterien in die Vorfluter emittieren, stellen sie einen Hot Spot für die Verbreitung dieser klinisch relevanten Parameter dar. Eine effektive Reduktion dieser Parameter sowohl in Konzentration, als auch in ihren Populationsanteilen würde diesem Umstand entgegenwirken.

Das entwickelte mikrobiologische Bewertungskonzept ermöglicht es, Betreibern und Aufsichtsbehörden den konventionellen Ablauf einer Kläranlage auf klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene und opportunistische Bakterien hin zu überprüfen und zu bewerten. Der aus diesem Konzept abgeleitete Handlungsbedarf beschreibt den Grad der Notwendigkeit einer weiterführenden Abwasserbehandlungsmaßnahme (4. Reinigungsstufe) bzw. gibt einen Risikohinweis im Bezug auf die Sorgfaltspflicht für nachfolgende Gewässer. Maßnahmen in der Abwasseraufbereitung sind in Anbetracht der derzeitigen Belastung durch die kontinuierliche Zunahme an Antibiotikaresistenzen im human- und veterinärmedizinischen Bereich angebracht, da Kläranlagen neben anderen Emittenten einen großen Einfluss auf die Qualität eines Rohwassers haben und Querverbindungen von abwasserbeeinflussten Systemen zurück zum Menschen vielfach aufgezeigt wurden.

Durch die zunehmende Verbreitung von Antibiotikaresistenzen sowie die immer geringer werdende Anzahl an neu zugelassenen Antibiotika wird die heutige Medizin zunehmend vor das Problem gestellt, dass sie bakterielle Infektionen entweder nur durch einen erheblichen Mehraufwand und mit höheren Kosten (z.B. längerer stationärer Aufenthalt) behandeln kann oder eine Therapie nicht mehr möglich ist. Zudem sind immer mehr Mediziner gezwungen, bei Infektionserkrankungen auf Reserveantibiotika zurückzugreifen. Dies geschieht derzeit immer häufiger im ambulanten Bereich und führt damit zwangsweise zu einer Reduktion der Effektivität eines Reserveantibiotikums bei ihrer Verwendung im stationären sowie intensivmedizinischen Bereich, da Bakterien durch die zunehmende ambulante Antibiotikagabe vorselektioniert sein können.

Die Reduktion der Emission von Antibiotikaresistenzen mit Hilfe einer verbesserten mikrobiologischen Abwasserqualität könnte dazu beitragen, eine Anreicherung dieser klinisch relevanten genetischen Determinanten in der aquatischen Umwelt zu reduzieren oder gar zu verhindern. Eine Unterbrechung der Verbreitungswege von Antibiotikaresistenzen würde auch zu Einsparungen im Gesundheitswesen führen, da weniger Reserveantibiotika verschrieben werden müssten und bakterielle Infektionen dadurch kostengünstiger behandelt werden könnten. Daher ist das vorgeschlagene, mikrobiologische Bewertungskonzept zur Evaluierung und Parametrierung weiterführender Abwasserbehandlungsverfahren aus wirtschaftlicher Sicht

ein Vorteil für das derzeitige und zukünftige Gesundheitswesen. Zurückliegende Berichte von anderen Infektionsausbrüchen, wie Warstein (Legionellen, 150 Erkrankte, 2 Tote) oder Hamburg (*P. aeruginosa* in Wasserzählern) zeigen deutlich, dass das derzeit gültige Indikatorsystem nicht ausreicht, um das Risiko im Abwasserbereich und in abwasserbeeinflussten Wassersystemen adäquat zu charakterisieren.

Das mikrobiologische Bewertungskonzept ist auch auf andere, weiterführende Abwasserbehandlungsmaßnahmen anwendbar und durch Erweiterung/Anpassung von weiteren hygienisch relevanten Parametern kann das Konzept auch außerhalb des kommunalen Kläranlagenbereichs eingesetzt werden und helfen, Risiken auch durch die Entwicklung neuer Hygienisierungstechnologien zu vermindern.

Die Hygienisierung des konventionellen Kläranlagenauslaufs ist der nächste Schritt in der Abwasserbehandlung. Neben der Ozonung kommen auch UV-Behandlung und Mikrofiltrationen zum Einsatz. Erste Untersuchungen zur Ozonung mit nachfolgender UV-Behandlung haben nur teilweise zu einer Verbesserung der Abwasserqualität in Bezug auf die Selektion der Imipenemresistenz und *P. aeruginosa* durch die vorherige Ozonbehandlung geführt. Diese Entwicklung muss jedoch noch weiter analysiert werden. Membranverfahren, wie die Mikro- und Ultrafiltration werden derzeit vor allem in der Trinkwasseraufbereitung verwendet und könnten bei vorheriger Verringerung der Partikelfracht aufgrund des Größenausschlussprinzips auch im Abwasserbereich eine Alternative zur chemischen Abwasserbehandlung darstellen.

Eine Evaluierung dieser Technologien mit Hilfe des mikrobiologischen Bewertungskonzeptes bietet die Möglichkeit, die individuellen Vor- und Nachteile dieser Abwasserbehandlungsmaßnahmen zu erfassen und miteinander zu vergleichen. Die Kombination aus volumen- und populationsbezogenen Konzentrationen bildet dabei die Grundlage, um in Zukunft auch andere aquatische Systeme mikrobiologisch zu charakterisieren und Techniken zur Reduktion zu evaluieren. Das Konzept ist auch zur Überwachung von Wasserschutzgebieten geeignet, um den Einfluss von Regenüberlaufbecken oder anderen saisonalen Kontaminationsquellen zu charakterisieren und gegebenenfalls Maßnahmen zur Risikominimierung zu entwickeln.

Neben genetischen Markern für einzelne Antibiotikaresistenzgene und opportunistische Bakterien ist die Charakterisierung und Quantifizierung mobiler genetische Elemente (z.B. Multiresistenz-Plasmide und -Transposons) in einer Population ein weiterer wichtiger Parameter, um weiterführende Abwassermaßnahmen zu bewerten. Diese Elemente können eine Mehrzahl an Resistenzdeterminanten oder Pathogenitätsfaktoren (z.B. Toxine) tragen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Verbreitung genetischer Informationen innerhalb einer Population. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse aus den Populationsanalysen eine Selektion

spezifischer Bakterienspezies. Das Überleben dieser Subpopulationen ist ein Hinweis auf funktionelle Gene dieser Bakterien, die für das Überleben nach der Ozonbehandlung verantwortlich sind, und auch Auswirkungen auf die zur Desinfektion in der Trinkwasseraufbereitung eingesetzten Oxidationsverfahren haben könnten. Das Prinzip dieser Toleranz gilt es zu untersuchen und zu überwinden, um die Effizienz von chemischen Desinfektionsverfahren zu verbessern oder Ausschlusskriterien zu definieren, die zu einer Selektion hygienisch relevanter Parameter führen.

## 5 Veröffentlichungen

### Publikationen

**Ternes, T., Prasse, C., Lütke-Eversloh, C., Knopp, G., Cornel, P., Schulte-Oehlmann, U., Schwartz, T., Alexander, J., Seitz, W., Coors, A., Oehlmann, J. (2017)**, Integrated evaluation concept to assess the efficacy of advanced wastewater treatment processes for the elimination of micropollutants and pathogens. *Environmental Science & Technology* 51(1), 308-319

**Alexander, J., Knopp, G., Dötsch, A., Wieland, A., Schwartz, T. (2016)** Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Science of the Total Environments* 559, 103-112.

**Karaolia, P., Michael-Kordatou, I., Hapeshi, E., Alexander, J., Schwartz, T., Fatta-Kassinos, D. (2016)** Investigation of the potential of a membrane bioreactor followed by solar Fenton oxidation to remove antibiotic-related microcontaminants. *Chemical Engineering Journal* 310(2), 491-502.

**Alexander, J., Bollmann, A., Seitz, W., Schwartz, T. (2015)** Microbial characterization of aquatic microbioms targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. *Science of Total Environment* 512-513, 316-325.

**Exner, M., Schwartz, T., Alexander, J., et al., (2015)** „Bewertungskonzepte in der Mikrobiologie“ mit dem Schwerpunkt Krankheitserreger und Antibiotikaresistenzen. DECHEMA e.V.

**Alexander, J., Karaolia, P., Fatta-Kassinos, D., Schwartz, T. (2015)**, Impacts of advanced oxidation processes on microbioms during wastewater treatment. *The Handbook of Environmental Chemistry* 45, 129-144. Springer Verlag.

### Poster-Präsentationen und Vorträge

**Schwartz, T., Alexander, J., Knopp G. (2015)** Impact of AOP on antibiotic resistant bacteria as part of the wastewater effluent microbiom. *FEMS Maastricht*, Posterbeitrag

**Alexander, J., Schwartz, T. (2014)** Impact of AOP on antibiotic resistant bacteria as part of the wastewater effluent microbiom. *VAAM Dresden*, Posterbeitrag

**Alexander, J., Schwartz, T. (2014)** Investigation of antibiotic resistance and pathogen fate in wastewater treatment in the German TransRisk project. *EAWAG Dübendorf*, Präsentation

**Alexander, J., Schwartz, T. (2013)** Investigation of waterborne Pathogens and antibiotic resistance patterns: a project to develop a concept of biological risk control. *Wasserchemische Gesellschaft Maurach*, Präsentation

**Alexander, J., Obst, U., Schwartz, T. (2013)** Resistente Bakterien im Wasserkreislauf: Gefahr für Umwelt und Gesundheit. *Karlsruher Wassertage, Karlsruhe*. Posterbeitrag

## 6 Literaturverzeichnis

- Alexander, J., Knopp, G., Dötsch, A., Wieland, A., Schwartz, T. (2016). Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Science of the Total Environments*, 559(3), 103-112.
- Alexander, J., Bollmann, A., Seitz, W., & Schwartz, T. (2015). Microbiological characterization of aquatic microbiomes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. *Science of The Total Environment*, 512-513, 316-325.
- Amador, P.P., Fernandes, R.M., Prudêncio, M.C., Barreto, M.P., & Duarte, I.M. (2015). Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of Enterobacteriaceae producers of Class A and Class C  $\beta$ -lactamases. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, 50(1), 26-39.
- Armstrong, J.L., Shigeno, D. S., Calomiris, J.J., & Seidler, R.J. (1981). Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(2), 277-83.
- Ashbolt, N.J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K.K., Collignon, P., Topp, E. (2013). Human Health Risk Assessment (HHRA) for Environmental Development and Transfer of Antibiotic Resistance. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 993-1001.
- Bae, S., Wuertz, S. (2009). Rapid decay of host-specific fecal Bacteroidales cells in seawater as measured by quantitative PCR with propidium monoazide. *Water Research*, 43, 4850-4859
- Bisdorff, B., Scholhölter, J., Claußen, K., Pulz, M., Nowak, D., & Radon, K. (2011). MRSA-ST398 in livestock farmers and neighbouring residents in a rural area in Germany. *BMC Proceedings*, 5(Suppl 6), 169.
- Biswal, B.K., Mazza, A., Masson, L., Gehr, R., & Frigon, D. (2014). Impact of wastewater treatment processes on antimicrobial resistance genes and their co-occurrence with virulence genes in *Escherichia coli*. *Water Research*, 50, 245-53.
- Blatchley, E.R., Weng, S., Afifi, M.Z., Chiu, H.H., Reichlin, D.B., Jousset, S., Erhardt, R.S. (2012). Ozone and UV254 radiation for municipal wastewater disinfection. *Water Environment Research*, 84 (11), 2017-2027.
- Brooks, B.D., & Brooks, A.E. (2014). Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78, 14-27.
- Bruchmann, J., Kirchen, S., & Schwartz, T. (2013). Sub-inhibitory concentrations of antibiotics and wastewater influencing biofilm formation and gene expression of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* wastewater isolates. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(6), 3539-49.
- Camarinha-Silva, A., Jáuregui, R., Chaves-Moreno, D., Oxley, A.P.A., Schaumburg, F., Becker, K., Pieper, D.H. (2014). Comparing the anterior nares bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environmental Microbiology*, 16(9), 2939-52.
- Cataldo, F. (2006). DNA degradation with ozone. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38(3-5), 248-54.

- Clifford, R.J., Milillo, M., Prestwood, J., Quintero, R., Zurawski, D.V, Kwak, Y.I., Mc Gann, P. (2012). Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PloS One*, 7(11),
- Cornejo-Juárez, P., Vilar-Compte, D., Pérez-Jiménez, C., Ñamendys-Silva, S., Sandoval-Hernández, S., & Volkow-Fernández, P. (2014). The impact of hospital acquired infections with multidrug-resistant bacterial at an oncological intensive care unit. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, (2014), 10–13.
- Cotta, M.A., Whitehead, T.R., Zeltwanger, R.L. (2003). Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. *Environmental Microbiology*, 5(9), 737-45.
- Crdoza, M.A., Rocchia, I. L., Luca, M.M. De, Pezzanl, B.C., & Basualdo, J.A. (2001). Resistance to Antibiotics in Injured Coliforms Isolated from Drinking Water, 45(5), 383–386.
- Davies, J. (2006). Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(7), 496–499.
- Davies, J., Spiegelman, G.B., & Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 445–453.
- Davis, M.F., Iverson, S.A., Baron, P., Vasse, A., Silbergeld, E. K., Lautenbach, E., & Morris, D. O. (2012). Household transmission of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(9), 703–16.
- Dealtry, S., Holmsgaard, P.N., Dunon, V., Jechalke, S., Ding, G.-C., Krögerrecklenfort, E., Smalla, K. (2014). Shifts in abundance and diversity of mobile genetic elements to diverse pesticides introduced into an on-farm biopurification system over a year. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Dodd, M.C. (2012). Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *Journal of Environmental Monitoring : JEM*, 14(7), 1754–71.
- Dourado, M.N., Franco, M.R., Peters, L.P., Martins, P.F., Souza, L.A., Piotto, F.A., & Azevedo, R.A. (2015). Antioxidant enzymes activities of *Burkholderia* spp. strains—oxidative responses to Ni toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19922–19932.
- Dwyer, D.J., Kohanski, M.A, & Collins, J. J. (2009). Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 482–9.
- El-zanfaly, H.T. (1991). The need for new microbiological water quality criteria. *Wat. Sci. Tech.*, 24(2), 43–48.
- Fall, S., Mercier, A., Bertolla, F., Calteau, A., Gueguen, L., Perrire, G., Simonet, P. (2007). Horizontal gene transfer regulation in bacteria as a “Spandrel” of DNA repair mechanisms. *PLoS ONE*, 2(10).
- Fiorentino, A., Ferro, G., Alferez, M.C., Polo-López, M.I., Fernández-Ibañez, P., Rizzo, L. (2015). Inactivation and regrowth of multidrug resistant bacteria in urban wastewater after

- disinfection by solar-driven and chlorination processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 43-50
- Flyunt, R. (2007). Ionising radiation and ozone in environmental studies: intermediates, stable products and mechanistic concepts.
- Ford, T.E. (1999). Microbiological Safety of Drinking Water : United States and Global Perspectives, (5).
- Forsberg, K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O.A., & Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), 1107–11.
- Gagnon, S., Lévesque, S., Lefebvre, B., Bourgault, A.-M., Labbé, A.-C., & Roger, M. (2011). vanA-containing *Enterococcus faecium* susceptible to vancomycin and teicoplanin because of major nucleotide deletions in Tn1546. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(12), 2758–62.
- Germap 2012, *Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch, Bericht über Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der human- und Veterinärmedizin in Deutschland*.
- Gruzdev, N., Pinto, R., & Sela Saldinger, S. (2012). Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. *Food Microbiology*, 32(2), 415–22.
- Guardabassi, L., & Dalsgaard, A. (2004). Occurrence, Structure, and Mobility of Tn 1546 -Like Elements in Environmental Isolates of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(2), 984–990.
- Gunten, U. Von. (2003). Ozonation of drinking water : Part II . Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine, 37, 1469–1487.
- Hammes, F., Salhi, E., Köster, O., Kaiser, H.-P., Egli, T., & von Gunten, U. (2006). Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during the ozonation of drinking water. *Water Research*, 40(12), 2275–86.
- Händel, N., Hoeksema, M., Freijo Mata, M., Brul, S., & Ter Kuile, B. H. (2015). Effects of stress, ROS and the SOS response on de novo acquisition of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi:10.1128/AAC.02684-15
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., & Kratz, K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225(1-2), 109–118.
- Hong, H., Ko, H.-J., Choi, I.-G., & Park, W. (2014). Previously undescribed plasmids recovered from activated sludge confer tetracycline resistance and phenotypic changes to *Acinetobacter oleivorans* DR1. *Microbial Ecology*, 67(2), 369–79.
- Hota, S., Hirji, Z., Stockton, K., Lemieux, C., Dedier, H., Wolfaardt, G., & Gardam, M. a. (2009). Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infection Control and Hospital Epidemiology : The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 30(1), 25–33.



- Huber, M.M., Ternes, T.A., von Gunten, U., (2004). Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17alpha-ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology*, 38(19), 5177-86
- Hunter, P.R., Wilkinson, D.C., Catling, L.A., & Barker, G.C. (2008). Meta-analysis of experimental data concerning antimicrobial resistance gene transfer rates during conjugation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 6085–90.
- Jacoby, G.A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–82,
- Jechalke, S., Schreiter, S., Wolters, B., Dealtry, S., Heuer, H., & Smalla, K. (2013). Widespread dissemination of class 1 integron components in soils and related ecosystems as revealed by cultivation-independent analysis. *Frontiers in Microbiology*, 4, 420.
- Jones, I.G., Roworth, M. (1996) An outbreak of Escherichia coli O157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public Health*, 110, 277-82
- Jungfer, C., Schwartz, T., & Obst, U. (2007). UV-induced dark repair mechanisms in bacteria associated with drinking water. *Water Research*, 41(1), 188–96.
- Klockgether, J., Würdemann, D., Reva, O., Wiehlmann, L., & Tümmler, B. (2007). Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2443–59.
- Kofteridis, D.P., Valachis, A., Dimopoulou, D., Maraki, S., Christidou, A., Mantadakis, E., & Samonis, G. (2014). Risk factors for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection/colonization: A case-case-control study. *Journal of Infection and Chemotherapy : Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 20(5), 293–7.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., & Collins, J.J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797–810.
- Kohanski, M.A., DePristo, M.A., & Collins, J.J. (2010). Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. *Molecular Cell*, 37(3), 311–320.
- Kondrakov, A.O., Ignatev, A.N., Lunin, V.V., Frimmel, F.H., Bräse, S., Horn, H. (2016) Roles of water and dissolved oxygen in photocatalytic generation of free OH radicals in aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions: An isotope labeling study. *Applied Catalysis B: Environmental* 182(3), 424-430
- Kraft, S., Stephanie, K., Obst, U., Ursula, O., Schwartz, T. (2011). Immunological detection of UV induced cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts in DNA from reference bacteria and natural aquatic populations. *Journal of Microbiological Methods*, 84(3), 435–41.
- Lebuhn, M., Effenberger, M., Garces, G., Gronauer, A., Wilderer, P.A. (2005). Hygienization by anaerobic digestion: comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR. *Water Science & Technology*, 52(1-2), 93-9.
- Lee, J., Lee, C.S., Hugunin, K.M., Maute, C.J., & Dysko, R. C. (2010). Bacteria from drinking water supply and their fate in gastrointestinal tracts of germ-free mice: a phylogenetic comparison study. *Water Research*, 44(17), 5050–8.

- Lüddecke, F., Heß, S., Gallert, C., Winter, J., Güde, H., Löffler, H. (2014). Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Research*, 69, 243–251.
- Marti, E., Variatza, E., & Balcazar, J. L. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 22(1), 36–41.
- Mezzanotte, V., Antonelli, M., Citterio, S., Nurizzo, C. (2007). Wastewater disinfection alternatives: chlorine, ozone, peracetic acid, and UV light. *Water Environment Research*, 79(12), 2373–2379.
- Michael, I., Rizzo, L., Mc Ardell, C. S., Manai, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Research*, 47(3), 957–95.
- Naber, C.K. (2009). Staphylococcus aureus bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48, S231–7.
- Oberlé, K., Capdeville, M.-J., Berthe, T., Budzinski, H., & Petit, F. (2012). Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant Escherichia coli: from medical center patients to a receiving environment. *Environmental Science & Technology*, 46(3), 1859–68.
- Obritsch, M.D., Fish, D.N., Maclaren, R., & Jung, R. (2004). National Surveillance of Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa Isolates Obtained from Intensive Care Unit Patients from 1993 to 2002, 48(12), 4606–4610.
- Okitsu, N., Kaieda, S., Yano, H., Nakano, R., Hosaka, Y., Okamoto, R., ... Inoue, M. (2005). Characterization of ermB Gene Transposition by Tn 1545 and Tn 917 in Macrolide-Resistant Streptococcus pneumoniae Isolates. *J Clin Microbiol.*, 43(1), 168–173.
- Olsen, S.J., Miller, G., Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., ... Mead, P. (2002). A Waterborne Outbreak of Escherichia coli O157 : H7 Infections and Hemolytic Uremic Syndrome : Implications for Rural Water Systems. *Emerging Infectious Diseases*, 8(4).
- Ortega-Gómez, E., Fernández-Ibáñez, P., Ballesteros Martín, M.M., Polo-López, M.I., Esteban García, B., & Sánchez Pérez, J. a. (2012). Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on Enterococcus faecalis survival. *Water Research*, 46(18), 6154–62.
- Oskoui, M., Farrokh, P. (2010). Distribution of insertion sequences associated with Tn1546 and clonal diversity of vancomycin-resistant enterococci isolated from patients in Tehran. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(1), 14–21.
- Otter, J.A., Yezli, S., & French, G.L. (2011). The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology : The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 32(7), 687–99.
- Pathak, S.P., Gautam, A.R., Gaur, A., Gopal, K., & Ray, P.K. (1993). Incidence of transferable antibiotic resistance among enterotoxigenic Escherichia coli in urban drinking water. *Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology*, 28(7), 1445–1455.
- Peters, L.P., Carvalho, G., Martins, P.F., Dourado, M.N., Vilhena, M.B., Pileggi, M., & Azevedo, R.A. (2014). Differential Responses of the Antioxidant System of Ametryn and Clomazone Tolerant Bacteria. *PLoS ONE*, 9(11), e112271.

- Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G.A. (2002). Plasmid-Determined AmpC-Type beta -Lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46(1), 1–11.
- Pronk, M., Goldscheider, N., Zopfi, J., & Zwahlen, F. (2009). Percolation and Particle Transport in the Unsaturated Zone of a Karst Aquifer. *Ground Water*, 47(3), 361–369.
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., & Carlson, K.H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental Science & Technology*, 40(23), 7445–50.
- Rieder, A., Schwartz, T., Schön-Hölz, K., Marten, S.-M., Süss, J., Gusbeth, C., Frey, W. (2008). Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 2035–45.
- Rincon, A.G., Pulgarin, C. (2006) Comparative evaluation of Fe<sup>3+</sup> and TiO<sub>2</sub> photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water. *Applied Catalysis B: Environmental*, 3-4(63), 222–231
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *The Science of the Total Environment*, 447, 345–60.
- Schindler, P.R.G., & Metz, H. (1991). Coliform bacteria in drinking water from south bavaria: identification by the API 20E system and resistance patterns. *Water Science & Technology*, 24(2), 81–84.
- Schwartz, T., Armant, O., Bretschneider, N., Hahn, A., Kirchen, S., Seifert, M., & Dötsch, A. (2015). Whole genome and transcriptome analyses of environmental antibiotic sensitive and multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates exposed to waste water and tap water. *Microbial Biotechnology*, 8(1), 116–30.
- Schwartz, T. (2012). Strategies to assess and minimize the biological risk of antibiotic resistance in the environment. *Antimicrobial Resistance in the Environment*, 251–264
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., & Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), 325–335.
- Seiler, C., Berendonk, T.U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 3, 399.
- Stalder, T., Barraud, O., Jove, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., & Ploy, M.-C. (2014). Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME Journal*, 8(4), 768–777.
- Starikova, I., Al-Haroni, M., Werner, G., Roberts, A.P., Sørum, V., Nielsen, K.M., & Johnsen, P. J. (2013). Fitness costs of various mobile genetic elements in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2755–65.
- Suetens, C., Hopkins, S., Kolman, J., & Högberg, L.D. (2012). Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. *ECDC Surveillance Report*. Retrieved from

<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>

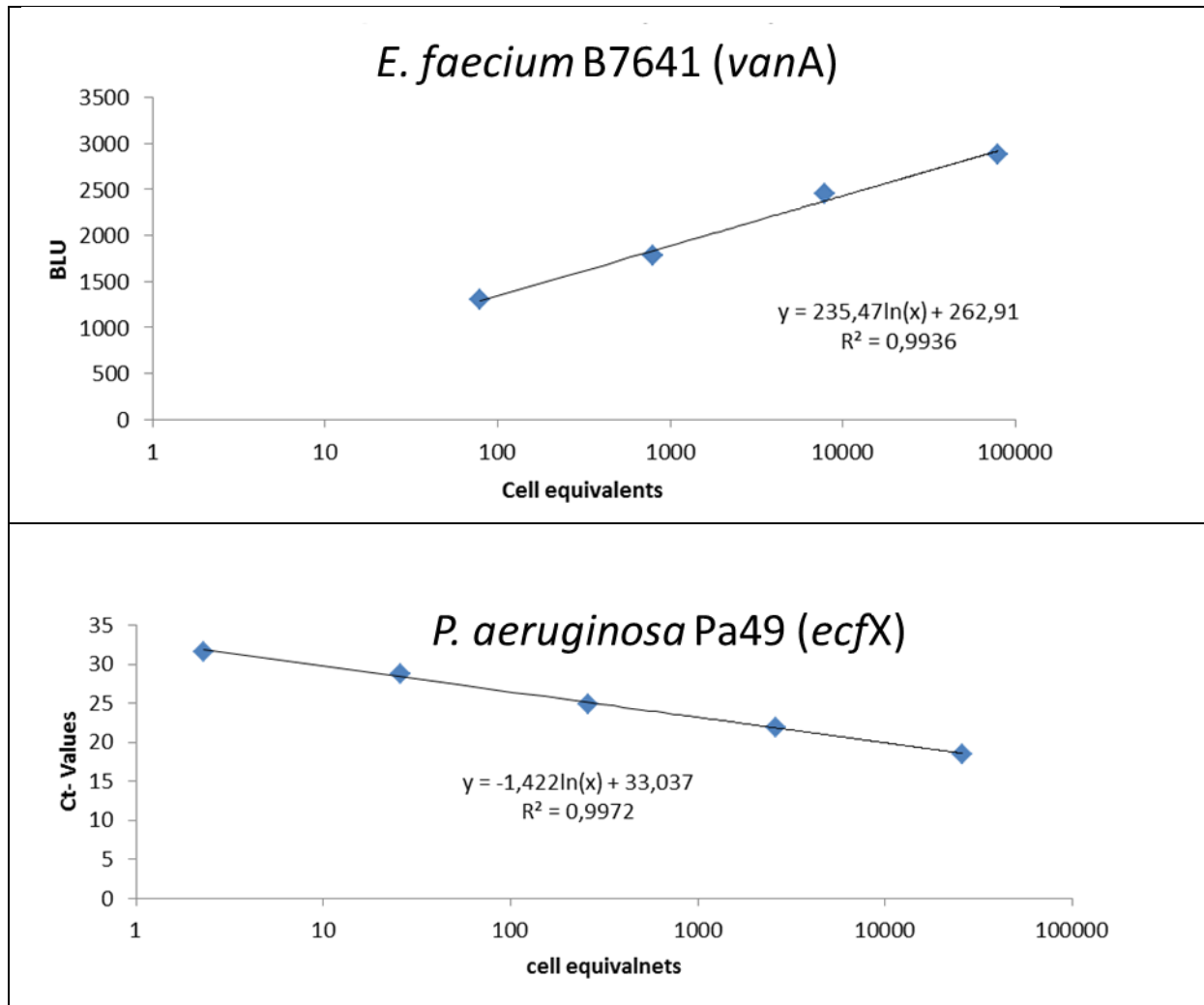
- Süss, J., Volz, S., Obst, U., & Schwartz, T. (2009). Application of a molecular biology concept for the detection of DNA damage and repair during UV disinfection. *Water Research*, 43(15), 3705–16.
- Tato, M., Coque, T.M., Baquero, F., & Cantón, R. (2010). Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 320–7.
- Tattevin, P., Basuino, L., & Chambers, H.F. (2009). Subinhibitory fluoroquinolone exposure selects for reduced beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant Staphylococcus aureus and alterations in the SOS-mediated response. *Research in Microbiology*, 160(3), 187–92.
- Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H.J., Gulde, B.H., Preuss, G., Wilme, U., Seibert, N.Z. (2002). Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental Science & Technology*, 36 (17), 3855e3863.
- Utter, B., Deutsch, D.R., Schuch, R., Winer, B.Y., Verratti, K., Bishop-Lilly, K., ... Fischetti, V.A. (2014). Beyond the chromosome: the prevalence of unique extra-chromosomal bacteriophages with integrated virulence genes in pathogenic Staphylococcus aureus. *PLoS One*, 9(6), e100502.
- Venkatesan N., Perumal G., Doble M. (2015). Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiology*, 10(11), 1743-50.
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., & Obst, U. (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 277–286.
- Von Gunten, U. (2003). Ozonation of drinking water: part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research*, 37(7), 1469-87
- Wardal, E., Markowska, K., Zabicka, D., Wróblewska, M., Giemza, M., Mik, E., ... Sadowy, E. (2014). Molecular analysis of vanA outbreak of Enterococcus faecium in two Warsaw hospitals: the importance of mobile genetic elements. *BioMed Research International*, 2014, 575367.
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E. (2005). Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environmental Science & Technology*, 39(17), 6649e6663
- Xi, C., Zhang, Y., Marrs, C.F., Ye, W., Simon, C., Foxman, B., & Nriagu, J. (2009). Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5714–8.
- Zhang, X., Zhao, F., Wu, B., & Cheng, S. (2013). Journal of Environmental Biology integrons and gene cassettes, 34(April), 391–399.

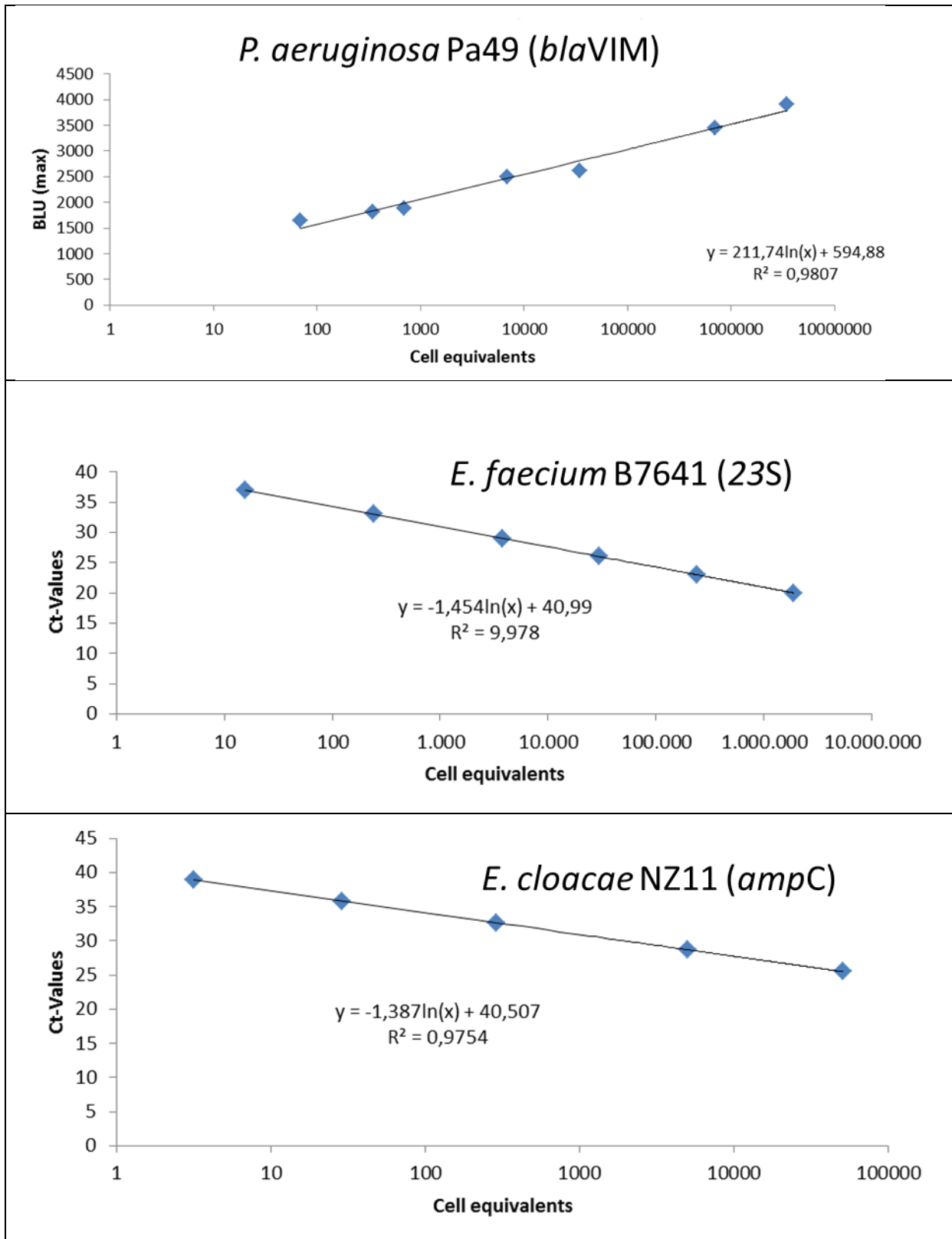
- Zhuang, Y., Ren, H., Geng, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Ding, L., & Xu, K. (2014). Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. *Environmental Science and Pollution Research International*.
- Zimmermann, S.G., Wittenwiler, M., Hollender, J., Krauss, M., Ort, C., Siegrist, H., & von Gunten, U. (2011). Kinetic assessment and modeling of an ozonation step for full-scale municipal wastewater treatment: micropollutant oxidation, by-product formation and disinfection. *Water Research*, 45(2), 605–17.

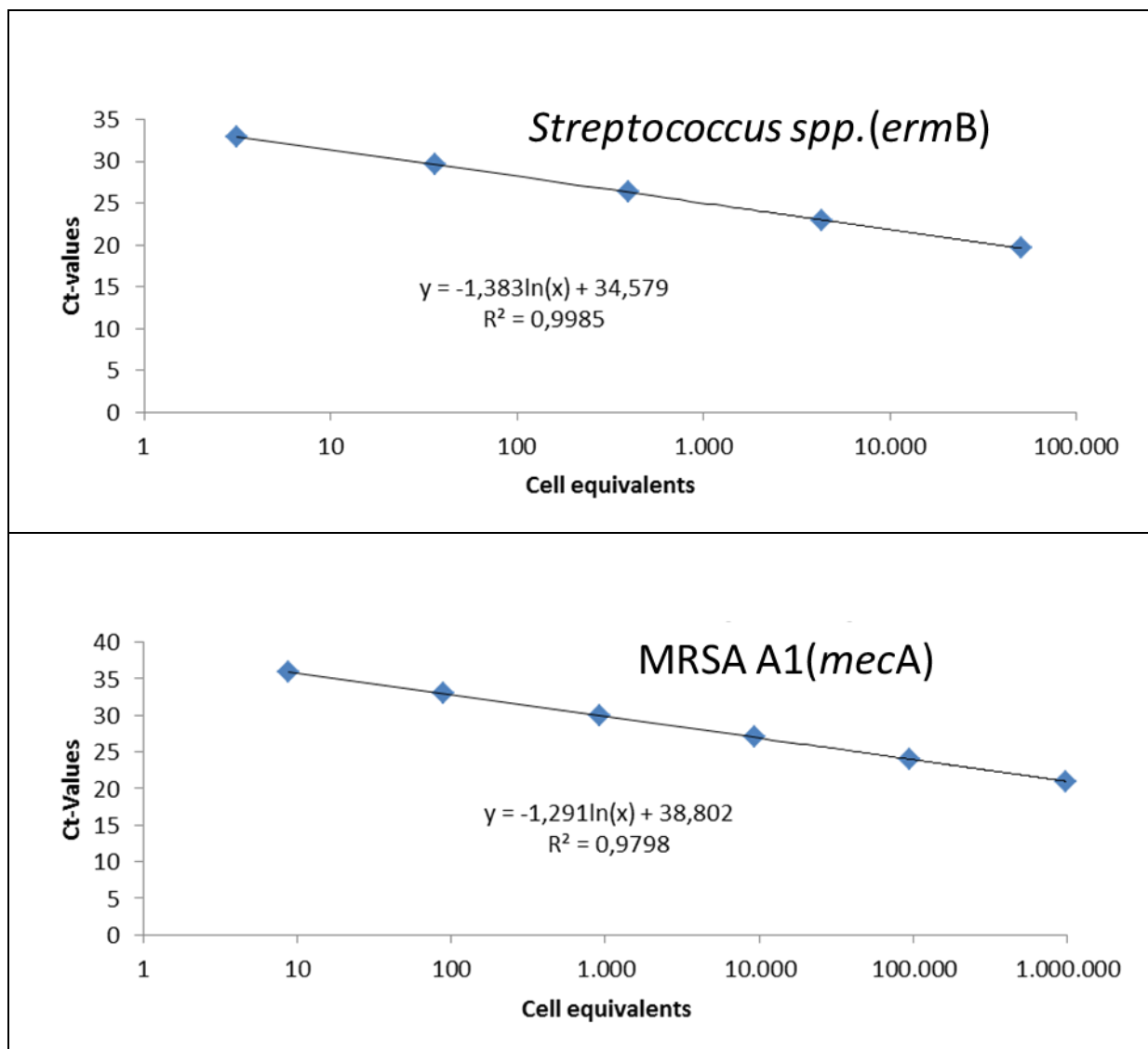
## 7 Anhang

### Kalibriergeraden zur Quantifizierung von Zelläquivalenten

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Kalibriergeraden zur Quantifizierung von Zelläquivalenten abgebildet. Aus den qPCR ermittelten Ct-Werten und LUs werden die Zelläquivalente abgeleitet. Angegeben sind die verwendeten Referenzbakterien und Zielgene.







### Durch die LW-Langenau durchgeführte chemische Analyse zur Detektion von Antibiotika im Abwasser

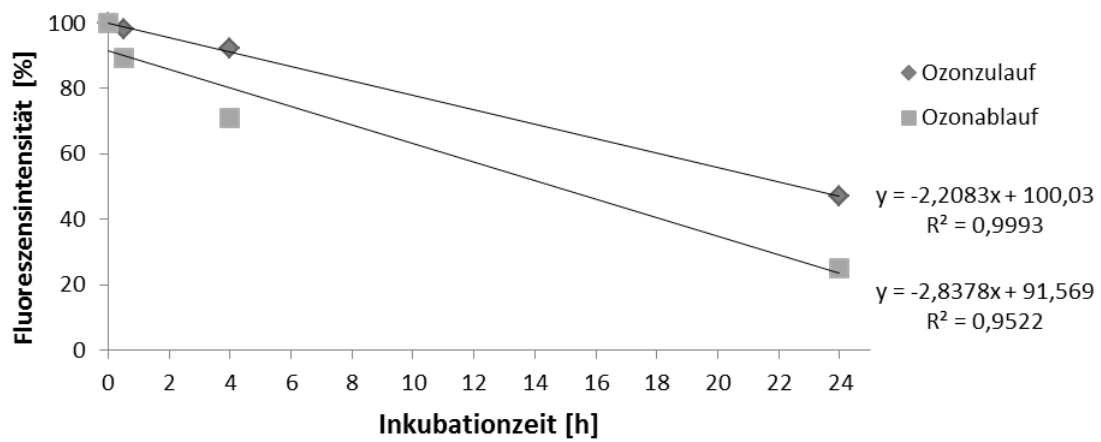
Chemische Analysen wurden mittels LC-MS durchgeführt. Dabei wurde ein Dionex RSLC UltiMate 3000 mit einem AB SciexQtrap 5500 Massenspektrometer verwendet. Für jedes der 100 µL Probevolumen wurde eine Zorbax Eclipse XDB-C18 Säule (50 x 4,6 mm, 1,8µm) verwendet. Die Durchflussrate betrug 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Der Lauf wurde mit einem Gradienten aus 0,1 V% Essigsäure in Ultrapure Wasser (A) und 0,1 V% Essigsäure in Methanol (B) im Verhältnis 95/5 (A/B) für 5 min begonnen und erreichte nach 10 min ein Verhältnis von 10/90. Nach weiteren 3 min erfolgte die Equilibrierung bis zu einem Verhältnis von 95/5 nach 6 min. Für die Massenspektrometrie wurde die Elektronsprayionisation im positiven Modus und multiple reaction monitoring (sMRM) verwendet. Die Target scan time betrug 0,8 s mit einem Detektionszeitraum (MRM) von 240 s. Für die Untersuchungen wurde ein Ionenspray mit 5000



V, CUR (35 psi), bei 700 °C, CAD (8), GS1 (70 psi), GS2 (40 psi), und EP (10 V) verwendet. Aufzeichnung der gewonnenen Daten und Auswertung erfolgte mit der Analysen Software von AB Sciex (Version 1.6.2).

### Nuklease-Aktivität im Ozonzu- und ablauf.

Abgebildet ist die indirekte Korrelation zwischen Nuklease-Aktivität und Fluoreszenzintensität der DNA-Fragmente.



**Illumina 16S Amplicon Sequenzierungsdaten aus der Bakterienpopulation des Ozonzulaufes.**

Nur solche Genera mit Abundanzen größer als 0,2% sind abgebildet, beginnend mit der größten Abundanz.

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
Flavobacterium	GATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAGAGTAAGCTTGCTTACTTGAGACCGGCGCACGGG TGCGTAACGCGTATGCAATCTACCTTATACAAGGGAATAGCCCAGAGAAATTTGGATTAATGCCCCATGGTATTATAG AGTGGCATCACTTTATAATTAAGTGCCAACGGTATAAGATGAGCATGCGTCCCATTAGTTAGTTGGTAAGGTAACGG CTTACCAAGACGATGATGGGTAGGGTCTGAGAGGGAGATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAG
Limnohabitans	ATTGAACGCTGGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGTAGAGGGAGCAACCCCTCGAGAGTGGCGAACTGGTG AGTAATATATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACGTAGCGAAAAGTTACGCTAATACCGCATTCGATCTAAGTAT GAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCAC CAAGCCAACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAECTGAGACACGGTCCAG
Saccharibacteria	GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTTCTCACTATGCTTTTGAAGTTTTCGAAGG TTTAGTGAGAATGCTGACGAGTGGCGGACGGCTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCCAAAGTGAGGGATAAGCACCGGA AACGGTGTCTAATACCGCATATGATCTTCGGATTAAGCAGCAATGCGCTTTGGGAGCGGCCTGCGTCGGATTAGGTTG TTGGTGAGATAATGGCTCACCAAGCCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCAGACTGGAECTGAGACAC GGTCCAG
Actinomycetales	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAACCAGAGCTTGCTCTGGGGATCAGTGGCGAACGG GTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCCAGACTCTGGGATAACCTCGGGAAACCGATGCTAATACCGGATACGACCCTTC GGACATCCGACGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTCTGGGATGGGCCCCGCGCCTATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTA CCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGAECTGAGACACGGTCCAG
Flavobacterium	GATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAGAACACTTCGGTGTGTTGAGACCGGCGCACGGGTGC GTAACGCGTATGCAATCTACCTTGTACAGGGGAATAGCCCAGAGAAATTTGGATTAATGCCCCATAGTATATAACCTTCG CATGTTGGTTATATTAAGTTCCAACGGTACAAGATGAGCATGCGTCCCATTAGTTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACC AAGACGATGATGGGTAGGGTCTGAGAGGGAGATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAG
Alphaproteobacteria	AACGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAATAAGAGCTCTGGCTTGCCAGAGAATTCTGTTAGTGG CATAACGGGTGAGTAACACGTGGGAATCTACCCAGTAGTATGGAATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCATATACGC CCTGAGGGGGAAAGATTTATTGCTATTGGATGAGCCCGCTTAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCC TACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGA
Limnohabitans	ATTGAACGCTGGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGG GTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACGTAGTAAAATTACGCTAATACCGCATAACGATCTAAGG ATGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTC ACCAAGCCAACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCAGACTGGTACTGAGACACGGACCAG

Comamonadaceae	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGCTACGCTAATACCGCATAACGATCTAC GGATGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAAGC CCACTAAGGAGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACTACCAGCCACACTGGAAGTGATACACGGTCCAG
Clostridium XI	GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGATTTACTTCCGTAAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC GCGTGGGTAACCTGCCCTGTACACACGGATAACATAACCGAAAGGTATGCTAATACGAGATAATATGCTTTTATCGCAT GGTAGAAGTATCAAAGCTTTTTCGGTACAGGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA GGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAAGTACGAGACACGGTCCAA
Saccharibacteria	GATGAATGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGGACGGCTG AGTAACGCGTGGGAACATGCCCCAAAGTGAGGGATAACGCACCGAAAGGTGTGCTAATACCGCATATGGTCTTCCGAT TAAAGGATTTATCCGCTTTGGGAGTGGCCTGCGTACGATTAGATTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGTCGACGAT CGTTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAGACTGGAAGTACGAGACACGGCCAG
Actinomycetales	GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAACCGGAGTTTACTCTGGGGATCAGTGGCGAACG GGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCCAGACTCTGGGATAACTTCGGGAAACCGATGCTAATACCGGATATGACCAC TTCGGACATCCGATGGTGGTGGAAAAGTTTTTCGGTCTGGGATGGGCCCGCGGTCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATG GCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAG
Polynucleobacter	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAA CGGGTGAGTAATACATCGGAACGTACCTTATCGTGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATAACGCCCT GAGGGGAAAGCGGGGGATCGAAAGACCTCGCGCGATTAGAGCGGCCGATGCCTGATTAGCTTGTGGTGGGGTAAA AGCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGGCACGGCCAG
Phylum Proteobacteria	AAAGAACGCTGGCGGCATGCTAACACATGCAAGTCGAACGAATAAAATGTCTAGCTTACTAGATATTTTATTAGTG GCAAACGGGTGAGTAACACGTAGGAATCTACCCTGTAGTACGGAACAACAAGTGAACGGTTGCTAATACCGCATA CGCTCGAAAGAGGAAAGATTTATCGCTATAGGATGAGCCTGCGTTAGATTAGGTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACC AAGCCTACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAG
Phenylobacterium	AGCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCCCTTCGGGGGAGTGGGGGAGGGGTGAGTAACGCG TGGGAACGTGCCCTTTGGTACGGAACAAGTACGAGGAAACTTCAGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATT TATCGCCATTGGAGCGGCCCGCTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCTACGATCCATAGCTGG TCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
Domain Bacteria	GATGAGCGCTGGCGGTATGCCTAACACATGCAAGTCGTACGCCTCACTTCCGTTGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAC ACGTTAGTACCTGCCCCAAAGTGGGGAATAACTGCCGAAAGGGTAGCTAATACCCATAGTCTCCGGTTTATCCGGA GTAAAGATTTATCGCTTTGGGAGGGCTTGCCTTTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAACGAT CAATAGCTGGATCGAGAGGTTGACCAGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAG
Fam. Moraxellaceae	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTTTGGTTAGCTTGTAAACCAGATAGCGGCGAACGGG TGAGGAATGCTTGGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGATAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGCCCTACG G

Betaproteobacteria	GGAAAGGGGGGATCTTCGGACCTCTCGCTATTAGATGAGCCCAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTC ACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG ATTGAACGCTGCCGGCGTGCTTTACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGACCTTCGGGTTGGCGGCGAGCGGCGAAC GGGTGAGTAATACATCGGAACGTACCTTTTAGTTGGGGATAACGCATCGAAAGATGTGCTAATACCGAATAATCTC TGAGGAGGAAAGGCGGGGATCGGAAACGACCTGTCTGCTGAAAGAGCGGCCGATGGCCGATTAGCTAGTTGGCGGGG TAAAAGCCCACCAAGGCGATGATCGGTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG AGCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGTCCTTTTCGGGGGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCG TGGGAACGTGCCCTTTGGTACGGAACAACCTGAGGGAAACTTCAGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATT TATCGCCATTGGAGCGGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCTACGATCCATAGCTGG TCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCCCT
Phenyllobacterium	ATTGAACGCTGGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGTAGAGGGGGCAACCCCTTGAGAGTGGCGAACGGGA GAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATAACGATCTAAGG ATGAAAGCGGGGACTCGCAAGAGCCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGG CTCACCAAGCCAACGATCTGTAGCTGGTCTGAGTGGACGACTAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGTTCCAG GACGAACGCTGGCGGTGTGCTTACACATGCAAGTCGAACGAGGAAGCAATACCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACG CGTGGGAATCTGCCCTTTAGATGGGGGATAACGAGCCGAAAGGCTCGCTAATACCGCATAAGGTTCGCGAGATTAAAGGA GTAATCCGTCTAGAGATGAGCCCAGCTCCGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCGGTAGC TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCACAT
Limnohabitans	GATGAATGCTGGCGGTATGGATAAGGCATGCAAGTCGAACGGCCCCGCAAGGGCAGTGGCAGACGAGGTAGTAACAG TACGAACGTACCCTGTAGTCTGGCATAGCTCGTCGAAAGACGGGGTAATTCGGGATGGTCCCGAAAGGGTAAAGTTT TCGCTACAGGAACGGCGTGCCTAGTATCAGCTTGTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCTACGACGCGTAGGGGAGC TGAGAGGCTGACCCCCACCGATGGGACTGAGACACGGCCCCAG
Phylum "Proteobacteria"	ATTGAACGCTGGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGCACTTCGGTGGCTGACGAGTGGCGAACGGG TGAGTAATACATCGGAACGTGCCCGAGAGTGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATAACGATCTACGG ATGAAAGCAGGGGACCGCAAGGCCTTGCCTCATGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAGCTT ACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Parcubacteria	ATTGAACGCTGGCGGCATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACATTCTAGCTTGCTAGAAGGGTGGCGAGTGG CGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATATGCCTTAAAGAGGGGGATAACTTGGGGAAACTCAAGCTAATACCGCATAACG CTCTGAGGAGCAAAGCTTGGGACCTTCGGCCCTGGCGCTTAAAGAATAGCCTGCGTCCGATTAGCTAGTTGGAGTGGTA AAGGCACACCACGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAACAGCCACACTGGGACTGAGGCACGGCCCCAG
Fam. Comamonadaceae	GATAAACGCTGGCGGTGTGCCTGAGATATGCAAGTCGAGCGGGAATCATTGAAGTCGCAAGATGGATATGATTTACAGC GGCGGACGGCTGAGTAACACGTAAGAATCTCCCCAAAGTCTCACATAGCTACCGAAAGGTGGGGTAATTTGAGATA GTCTCCCCTCGCAAGAGGGGTGTAAGCCGCAAGGCGCTTCGGGATGAGCTTGCCTATGAGGTAGTTGGTGGGGT AATGGCCCACCAAGCCTACGACGGGTAGCTGGCCTCATGAGGGTGGTCAGCCAGAAGGGGACTGAGATACGGCCCCCT
Legionella	GATGAACGCTGGCGGCCTAAGACATGCAAGTCGAGTGGGTTTAGGCCACGGCAAACGGGTGAGTAATATCTA
Unclassified	
Domain Bacteria	

	GGAACATACCTCGAGTTGAGCATAACCTACCGAAAGGTAGAGCAATTCTCAATGTGACCGCAAGGTTAAAGTCGCAA GACGCTAGAGAAGTGGCCTGGACACCATCAGCTAGTTGGTAAGGTAAAGGCTTACCAAGGCTTTGACGGTTAGGGGC CCCCGAGAGGGGACACCCCCACACTGGAAGTGAACGACGTTCCAG
Betaproteobacteria	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGGAGGAGCTTGCTCCTCTGATGGCGAGTG GCGAACGGGTGAGTAAAGCATCGGAACGTGCCGTGTAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATA CGCACGGAGGTGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGGCTATACGAGCGCCGATGTCAGATGAGCTAGTTGGTAG GGTAAAGGCCTACCACGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACCCGGCAAAG
Fam. Comamonadaceae	ATTGAACGCTGGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGGCAACCCTGGTGGCGAGTGGCGAAC GGGTGAGTAACACATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGCTACGCTAATACCGCATAACGATCT ACGGATGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAA GGCTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Paraperlucidibaca	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTGTGGTGGTCTGACTAACGCTTAGTGGCGAAC GGGTGAGTAATACTTGGGAATCTGCCTTGTAGCGGGGATAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGCTCT ACGGGAGAAAGGAGGGGATCTTCGGACCTTCCACTATAAGATGAGCCCAAGCGAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAA GGCTTACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Clostridium	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGTGAATCTCCTTCGGGAGTGAAACTAGCGGCGGAC GGGTGAGTAACACGCTGGGCAACCTGCCTCGTAGAGGGGAATAGCCTTTCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAAGATT GTAGCTTCGCATGAAGTAGCAATTAAGGAGCAATCCGCTATGAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAG GTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Saccharibacteria	GATGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCTCCTTCGGGAGTACACGAGCGGCGGACGG CTGAGTAACGCGTAGGAACGTACCCCAAAGTGAAGGATAACTGCTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATGTGCTCTAC GGAGTAAAGCTACGGCGGTTTGGGAACGGCCTGCGTACGATTAGATTGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGTCGAC GATCGTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAGACTGGGACTGAGAACGGCCCAG
Betaproteobacteria	ATTGAACGCTGGCGGCGTGCCTTACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCATGACCTTCGGGTCTATGGCGAGCGGCGAACG GGTGAGTAATACATCGGAACGTACCTTTTAGTGGTGGATAACGCATCGAAAGATGTGCTAATACAGCATAATCTCTG AGGAGGAAAGGCGGGGATCACGCAAGTGACCTGTCGCTGAAAGAGCGGCCGATGGTTCGATTAGCTAGTTGGCGGGGT AAAAGCCCACCAAGGCGATGATCGATAGCGGGTCTGAGAGGACGATCCGTCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Fam. Comamonadaceae	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAAC GGTTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTGGCTAATACCGCATAACGATCT ACGGATGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGGTAGTTGGTAGGGTAAA AGCCTACCAAGCCTGCGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGAACGACGTTCCAG
Fam. Flavobacteriaceae	GATGAACGCTAGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTCGAGGGGTATAGTAGCAATACTAGAGACCGGCGCACGGGTGC GTAACGCGTATGCAATCTACCTTTTACCGAGGGATAGCCAGAGAAATTTGGATTAATACCTCATAGCGTTATAGTA TGGCATCATACAATAACTAAAGTAACAACAGTAAAAGATGAGCATGCGTCTATTAGTTAGTTGGTAAGGTAACGG CTTACCAAGACGATGATAGGTAGGGTCTGAGAGGGAGAGCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAG

Dom. Bacteria	GATGAACGCTGGCGGCGCGCTAAGTCATGCAAGTCGTGTGGGTTTCAGACCCACGGCAAACGGGAGAGTAACACATT GGTAACCTACCCCAAAGACGGGCATAACCTCGCGAAAGTGAGGATAATACCCGATGGTATCAGCTGACATAAGTTGG TTGATTAAGCTTCGGCGCTTTGGGAGGGACCTATGCATCATCAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCTA CGACGATTACCGGGTGTGAGAGCATGGCCCCGGCCACTGGGACTGAGACACTGCCAG
Brevundimonas	AGCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGACCCTTCGGGGTTAGTGCGGACGGGTGAGTAACA CGTGGGAACGCGCCTTTAGGTTTCGGAATAGCTCCTGGAAAGGGGTGGTAATGCCGAATGTGCCCTTCGGGGAAAGA TTTATCGCCTTTAGGGCGGCCGCTTCTGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCTACGATCAGTAGC TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
Ordung "Flavobacteriales"	GATGAACGCTAGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAGCAGGTTTAAATTTTCGTTTTAAATGCTGACGAC CGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAACAATCTACCTTATACTGGAGGATAGCCCTAAGAAATTTGGGATTAATACTCC ATAAAATTATTGGTCCGCATGGATTGATTATTAAGCTACGGCGGTATAAGATGAGTATGCGTCTGATTAGCTAGTT GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTACGATCAGTAGGGGGCCTGAGAGGGTTATCCCCACACTGGGACTGAGACACG GCCAG
Perlucidibaca	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGACTTCGGTCTAGCGGCCAACGGGTGAGGAATGC TTGGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGATAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGAAAGGGG GGGATCTTCGGACCTCTCGCTATTAGATGAGCCCAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCGA CGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGCCAG
Ordung Burkholderiales	ATTGAACGCTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGGGTTGGGAGCTTGCTTCCAATCTAGTGCCGAACGGGT GAGTAATACATCGGAACGTACCGTGTAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATAACGATCCACGGA TGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGTGCTATACGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCAC CAAGGCGACGATCAGTAGCGGGTCTGAGAGGATGAGCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
Fam. Comamonadaceae	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGG GTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAATCGTGGGGGATAACGCAGCGAAAGTTGTGCTAATACCGCATAAGATCTACG GATGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCGAGTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC CACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAG
Fam. Comamonadaceae	ATTGAACGCTGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGG TGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTCTGTTGGGGGATAACGCAGCGAAAGTTGTGCTAATACCGCATAACGATCTATGG ATGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGGTTGTTGGTGAGGTAAGGCT CACCAAGCCTGCGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGTTCCAG
Betaproteobacteria	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGGAAGAGCTTGCTCTTCTGATGGCGAGTGG CGAACGGGTGAGTAAAGCATCGGAACGTACCGTGTAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATAAC GCACTGAGGTGGAAATCAGGGGATCGCAAGACCTTGGCCTATACGAGCGGCCGATGTCAGATTAGCTAGTTGGTAGGG TAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
Pigmentiphaga	ATTGAACGCTAGCGGGATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGGCGAAC GGGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCCAGTAGCGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGCCCT

Fam. Methylococcaceae	ACGGGGGAAAGGGGGGATCGCAAGACCTCTCACTATTGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAA GGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTTTTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG ATTGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCAGGCCCTTCGGGGTGCTGACGAGTGGCGGAC GGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTGCCTTGTGAGAGGGATAGCCTAGGGGAACTTAGGGTAATACCGCATAAGCCTG AGAGGGGAAAGCCGGGAGCCGCGAGGTCTGGCGCAATAAGATGAGCCTACGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTA AAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGGGTGCTTGCACCTGATGGCGAGTGGCGA ACGGGTGAGTAATGCATCGGAACGTACCCGGAAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAAGTTACGCTAATACCGCATATTCT GTGAGCAGGAAAAGAGGGGGATCGCAAGACCTCTCGCTTTCGGAGCGGCCGATGTCAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTA AAAGCCTACCAAGGTGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG GATGAATGCTGGCGGCGTGGATGATGCATGCAAGTCGAATGGGTTTAGGCCCATGGCAGACGAGGTAGGAACACGTA GGTACGTACCCCAAAGTCAGGGATAATCCGTGCAAAGGCGGCACAATACTTGATGGTCTCTTCGGAGTAAAGATTTA TCGCTTTGGGAACGGCCTGCGGGCTATCAGCTTGTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTACGACGGCTAGGGGAG GTGAGAGCCTGACCCCAACCGATGGAAGTGGCAGACGGTCCAT
Propionivibrio	GATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGGTGTTGGTGCTTGCCTAACACCTAGTGGCGAAC GGGTGAGTAATACTTGGGAATCTGCCTTGTAGCGGGGGATAACGTTTCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATAACGTCCT ACGGGAGAAAGGAGGGGATCTTCGGACCTTCCACTATAAGATGAGCCCAAGCGAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAA GGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG AGCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGGTCTTCGGGACTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACG CGTGGGAACGTGCCCTTGGTACGGAACAAGTGGAGGAACTTCAGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGA TTTATCGCCATTGGAGCGGCCCGGTTGGATTAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGCCAACGATCTGTAGCT GGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGGCAGACGGTCCAG
Parcubacteria	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAAC GGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTAGTGGGGGATAGCCCGGCAAAGCCGATTAATACCGCATAACGACCT GTGGGTGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTTGTGGTGGGGTAAAA GCCCACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCTAG ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGAACGG GTGAGTAATACATCGGAACGTGCCGAGAGTGGGGGATAACGAAGCGAAAAGCTTTGCTAATACCGCATAACGATCTCA GGATGAAAGCAGGGGACCGCAAGGCCTTGCCTCACGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAAG CTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAAATGCAAGTCGAACCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAA GAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAACTACCCATCAGAGGGGGATAACAATTGGAAACAGGTGCTA ATACCGCATAACAGTTTATGCCGATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCG GTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTCAGAGGGTGATCGGCCAC ACTGAGACTGAGACTTGGCCCTG
Paraperlucidibaca	GATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGGTGTTGGTGCTTGCCTAACACCTAGTGGCGAAC GGGTGAGTAATACTTGGGAATCTGCCTTGTAGCGGGGGATAACGTTTCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATAACGTCCT ACGGGAGAAAGGAGGGGATCTTCGGACCTTCCACTATAAGATGAGCCCAAGCGAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAA GGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG AGCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGGTCTTCGGGACTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACG CGTGGGAACGTGCCCTTGGTACGGAACAAGTGGAGGAACTTCAGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGA TTTATCGCCATTGGAGCGGCCCGGTTGGATTAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGCCAACGATCTGTAGCT GGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGGCAGACGGTCCAG
Phenylobacterium	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAAC GGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTAGTGGGGGATAGCCCGGCAAAGCCGATTAATACCGCATAACGACCT GTGGGTGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTTGTGGTGGGGTAAAA GCCCACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCTAG ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGAACGG GTGAGTAATACATCGGAACGTGCCGAGAGTGGGGGATAACGAAGCGAAAAGCTTTGCTAATACCGCATAACGATCTCA GGATGAAAGCAGGGGACCGCAAGGCCTTGCCTCACGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAAG CTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAAATGCAAGTCGAACCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAA GAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAACTACCCATCAGAGGGGGATAACAATTGGAAACAGGTGCTA ATACCGCATAACAGTTTATGCCGATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCG GTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTCAGAGGGTGATCGGCCAC ACTGAGACTGAGACTTGGCCCTG
Rhizobacter	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAAC GGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTAGTGGGGGATAGCCCGGCAAAGCCGATTAATACCGCATAACGACCT GTGGGTGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTTGTGGTGGGGTAAAA GCCCACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCTAG ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGAACGG GTGAGTAATACATCGGAACGTGCCGAGAGTGGGGGATAACGAAGCGAAAAGCTTTGCTAATACCGCATAACGATCTCA GGATGAAAGCAGGGGACCGCAAGGCCTTGCCTCACGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAAG CTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAAATGCAAGTCGAACCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAA GAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAACTACCCATCAGAGGGGGATAACAATTGGAAACAGGTGCTA ATACCGCATAACAGTTTATGCCGATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCG GTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTCAGAGGGTGATCGGCCAC ACTGAGACTGAGACTTGGCCCTG
Acidovorax	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGAACGG GTGAGTAATACATCGGAACGTGCCGAGAGTGGGGGATAACGAAGCGAAAAGCTTTGCTAATACCGCATAACGATCTCA GGATGAAAGCAGGGGACCGCAAGGCCTTGCCTCACGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAAG CTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAAATGCAAGTCGAACCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAA GAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAACTACCCATCAGAGGGGGATAACAATTGGAAACAGGTGCTA ATACCGCATAACAGTTTATGCCGATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCG GTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTCAGAGGGTGATCGGCCAC ACTGAGACTGAGACTTGGCCCTG
Enterococcus	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAAATGCAAGTCGAACCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTGGAAA GAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAACTACCCATCAGAGGGGGATAACAATTGGAAACAGGTGCTA ATACCGCATAACAGTTTATGCCGATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCG GTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTCAGAGGGTGATCGGCCAC ACTGAGACTGAGACTTGGCCCTG

Fam. Comamonadaceae	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTTAAGCTGACGAGTGGCGAACGGGTG AGTAATATATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGCTACGCTAATACCGCATAACGATCTATG GATGAAAGCGGGGATCGCAAGACCTCGCGGATTGGAGCGGCCGATATCATATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAG GCTCACCAAGGGCAGCATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG
Ordnung Actinomycetales	GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGTGACCCAGGGCTTGCCCTGGTGATCAGTGGCGAA CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGACTTCGGGATAACTCCTCGAAAGAGGAGCTAATACCGGATACGA CCACTTCGGACATCCGATGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTCAGGGATGGGCCCCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGGG GTAAGGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC AG
Fam. Sphingomonadaceae	AACGAACGCTGGCGGCATGCCTTAAACACATGCAAGTCGAACGAGACCTTCGGGTCTAGTGGCGCACGGGTGCGTAAC GCGTGGGAATCTACCTTTGCTACGGAATAACTCAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATAATGTCGCAAGACAAA GATTTATCGGCAGAGGACGAGCCCGGTAAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCTTT AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Undibacterium	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAAC GGGTGAGTAATATATCGGAACATAACCCTAGAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATAACGCAC TAAGGTGGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCATGCTCATGGAGTGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTGGAGTA AAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG
Alphaproteobacteria	AACGAACGCTGGCGGCATGCCTTAAACACATGCAAGTTGAACGGACTAATTTGGAGCTTGCTCTAGATTGGTTAGTGG CAAACGGGTGAGTAACACGTGGGAATCTCCCATCAGTATGGAATAACTTTGGAAACAAATGCTAATACCATATA TTCTCTGCGGAGGAAAGATTTATCGCTGACGGATGAGCCTGCGTCAGATTAGGTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTAC CAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
Domain Bacteria	AACGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGGCATAGCAATATGTCAGTGGCAAACGGGTGAGGA ATGCAGAGGAATCTCCCAGCAGTAAGGAATAACTTTGGGAAACCAAAGCTAATGCCATATATCTCCTATTTATCGG GAAAGATTTATCGCTGTTGGATGAGCCTCTGTGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAATGATC CGTAGCTGGTCTTAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG
Fam. Comamonadaceae	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAA CGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATAACGAT CTACGGATGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGGATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGT AAAGGCCACCAAGGCGATGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Gordonia	GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCAGCTTGCTGGGTACTCGAGTGGCGAA CGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCCAACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGA CCTGCTCCTGCATGGGGGTTGGTGGAAAGCTTTTGGGTTTGGGATGGGCCCCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGG TAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Betaproteobacteria	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGGGCAACCCTTGGCGGAGTGGCGAA CGGGTGAGTAATGTATCGGAACGTATCCTGTAATGGGGGATAACCAGTCGAAAGATTGGGTAATACCGCATAACGC



	ACGAGAGTGGAAAGTAGGGGATCGCAAGACCTTACGTTATAGGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTGGG GTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAG
Rheinheimera	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGTTTTTCGGACCTAGCGTTCGGACGGGTGAGTAAT GCGTAGGAAGCTACCCGATAGAGGGGGATACCAGTTGAAACGACTGTTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAA GTGTGGGACCTTCGGGCCACATGCTATCGGATGCGCCTACGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCA AGGCGACGATCTCTAGCTGGTTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAG
Alphaproteobacteria	AACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGCTGGGACCTTCGGGTCCCGATGCTAGTGGCGCA CGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTACCCTTTAGTACGGAATAACTGAGGGAACTTCAGCTAATACCGTATGACTC CTTCGGGAGAAAGATTTATCGCTAAAGGATCGGCCCGCGTCTGATTAGGTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAG CCTACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGACCAG
Domain Bacteria	AACGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGTGTAGCAATACATCAGTGGCAAACGGGTGAGGA ATATAGAGGAATCTCCCTAGCAGTAAGGAATAACTTTGGGAAACCAAAGCTAATGCCATATATTACCGATTTATCG GGAAAGATTTATCGCTGTTAGATGAGCCTCTATCGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAATGA TCCGTAGCTGGTCTTAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAG
Domain Bacteria	GATTAACGCTGGCGGTATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAATGCTATTTAAGAAAATCTCACACTAGTGAGGG ATTTTCACGAGTAGTATTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGAACCTGCCCAAAGTGGGGAATAACTGCC CGAAAGGTAGCTAATACCCCATAGTATCCAGTTTATCTGGATTAAGATTTATCGCTTTGGGAGGGGCCTGCGTC TGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTTCGAGAGGATGACCAGCCACAC TGGGACTGAGAGACGGCCCAG
Zoogloea	ATTGAACGCTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGGAGCTTGCTCCGCTGACGAGTGGCGAAC GGGTGAGTAATGCATCGGAACGTACCCAGTCGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATAACGTCTT GAGGGAGAAAGCGGGGACCGTAAGGCCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAA AGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Phylum "Proteobacteria"	ATTGAACGCTGGCGGCACGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGAGAGTAGTAATACTCTTGGGTGGCGAG TGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTACCCTAGAGATGAGGATAACTTGGGGAACTCAAGCTAATACTGA ATACGCCCTTAGGGGTAAAGGTTGCGCAAGCAGCCGCTTTAGGATGAGCCTGCGTTAGATTAGCTAGTTGGTGGGG TAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGTTCTGAGAGGACGAACAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Caulobacter	AGCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGATCCTTCGGGATTAGTGGCGGACGGGTGAGTAAC ACGTGGGAACGTGCCTTTTGGTTCGGAACAACGCAGAGAAATTTGCGCTAATACCGAATGTGCCCTTCGGGGAAA GATTTATCGCCATTAGAGCGGCCCGCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCTACGATCAGTA GCTGGTCTGAGAGGATGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAA
Alphaproteobacteria	AACGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGGTATAGGTGCTTGCACTTATACTTAGGTGGCAG ACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATGTACCCTTGGATCGGGATAACGGCTGGAAACGGTTCGCTAATACCGGATACGT CCGGAAGGAGAAAGATTTATTGCCGAGGGAACGGCCCAGTTGGATTAGGTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCA

	AGCCTGTGATCCATAGCTGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Domain Bacteria	GGTGAACGCTGGCGGCATGGATAAGGCATGCAAGTCGAATGGGTTTAGACCCATGGCAGACGTGGTAGTAACACG TAGGAACGTACCCAGAAGTCAAGAATATTCTATCGAAAGATAGCGCAATACTTGATGGTCTCGCAAGACTAAAGA TTTATCGCTTCTGGAGCGGCCTGCGCAATATCAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTATGACGTTTATG GGGAGCTGAGAGGGTGACCCCCACCGATGGAACCTGAGAACGGTCCAT
Curvibacter	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAA CGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACGTAGCGAAAAGCTACGCTAATACCGCATACGAT CTATGGATGAAAAGCGGGGATCGCAAGACCTCGCGGATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGGTAGTTGGTGAGGT AAAGGCTCACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGGCGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Parcubacteria	GATGAATGCTGGCGGCGTGGATGATGCATGCAAGTCGAATGGGTTTAGACCCATGGCAGACGAGGTAGGAACACGTA GGTACGTACCCAAGAGTCAGGGATAACCTGGAGAAAATCCAGAATAATACTTGATGGTCCCTTCGGGGTAAAGATTTA TCGCTCTTGAACGGCCTGCGGGCTATCAGCTTGTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTACGACGGCTAGGGGAG GTGAGAGCCTGACCCCCACCGATGGAACCTGCGACACGGTCCAT
Fam. Burkholderiales	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACGCGGGGCAACCTGGCGACGAGTGGCGAACGG GTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAATAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATGAGACCTGA GGGTGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGG CCCACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAG
Dokdonella	AGTAAAAGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGCTCCGACCACCTCGGGTGGTGGATGGCG GCGAGCGGCGACGGGTGAGGAATGCATCGGAATCTGCCTCGTTGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATAC CGCATAACGACCTACGGGTGAAAGTGGGGACCTTCGGGCCTCACGCGATGAGATGAGCCGATGCCGGATTAGCTAGTT GGCGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACG GTCCAG
Aquabacterium	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGGAGCAATCCTGGCGGCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGACCTGA GGGTGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTACTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC CTACCAAGGCAACGATCTGTAGTTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Alphaproteobacteria	AACGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAATAAGAGTCCAAGCTTGCTTGAAGTTCTGTTAGTG GCATACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGTATAT TCCCTGAGGGGAAAGATTTATCGCTACTAGATGAGCCCGCTTAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAG CCTACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Domain Bacteria	AACGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGATATAGCAATATATCAGTGGCAAACGGGTGAGGAAT GTAGAGGAATCTCCCCAGCAGTAAGGAATAACTTTGGGAAACCAAAGCTAATGCCATATATCACCGATTTATCGGGAA AGATTTATCGCTGTTGGATGAGCCTCTATCGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAATGATCCGTA GCTGGTCTTAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAG

Parcubacteria	GGTGAACGCTGGCGGCGTGGATGAGGCATGCAAGTCGAATGGGTTTAGGCCCATGGCAGACGAGGTAGGAACAAGTA GGTACGTACCCCAAAGTCAGGGATAACCCGGAGAAATCCGGAATAATACTTGATGGTCTCGCGAGAGTGAAGATTTA TCGCTTTGGGAACGGCCTGCTTTCTATCAGCTTGTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTACGACGGATAGGGGAGG TGAGAGCCTGACCCCCACCGATGGAAGTGCACACGGTCCAT
Betaproteobacteria	ATTGAACGCTGGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCTTGCTCCTGGTGGCGAGTGGCGAA CGGGTGAGTAATATATCGGAACGTATCCAATAATGGGGGATAACTAATCGAAAGGTTGGCTAATACCGCATAACGCCCT GAGGGGAAAGCTGGGGAGCGTAAGACCTAGCGTTAATGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAG GCCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG
Tetrasphaera	GACGAACGCTGGCGGCGTGGTAAACACATGCAAGTCGAACGGTGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGATCAGTGGCGAACGG GTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCCAGACTCTGGGATAACAGTTGGAACAGCTGCTAATACCGGATACGAGACGG AGAGGCATCTCTACCGTCTGGAAGTTTTTCGGTCTGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGGGTAATGG CTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Domain Bacteria	GATGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGTGCGCCCTGAACAGTGTGCTTTTAAATGTCTGTAACAGATA GTAAAAGAGCATAATGTGCAGGGAGCGGCGGACGGGTGCGTAACACATGGGAATCTGCCCAAAGTGGGGATAACTA CTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATATGGTCTTCGGATTAAAGCCTTCTGGCGGTTTGGGAGGAGCCTGTGGCAGATT AGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGATGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT GAGACACGGCCCAG
Sulfuritalea	ATTGAACGCTGGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGCGGGGGCAACCCTGGCGGCGAGCGGCGAACG GGTGAGTAACATATCGGAACGTACCCTGTCTGGGGGATAACTATCCGAAAGGATAGCTAATACCGCATAACGACCTGA GGGTGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCGATAGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGC TCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG
Ordnung Burkholderiales	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGGCAACCCTGGTGGCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAATACATCGGAATGTACCAGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTTGCTAATACCGCATAACGACTAT GGTGGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTATTGGAGCAGCCGATGTCCGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAAGC CTACCAAGCCCGGATCGGTAAGTGGTCTGAGAGGACGACCAGTCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Ordnung Burkholderiales	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACGCGGGGCAACCCTGGCGACGAGTGGCGAACGGG TGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAGCCTGACTAATACCGCATAACGACCGAAGG GTGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCTATTGGAGCGGCCGATATCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAAGCCT ACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
Domain Bacteria	GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAAACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTTCGGGGGTACACGAGCGGCGGACGGG TGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCCAAAGTGGGGATAAGCATTGGAACGATGTCTAATACCGCATATGGTCTTCGG ATTAAAGCTTCGGCGGTTTGGGAAGAGCCCGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTCACCAAGGCGACGAT CTTTAACTGGTGTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG
Pseudorhodoferax	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGAGCAATCCTGGTGGCGAGTGGCGAACG GGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCCAGTCTGGGGGATAACGCAGCGAAAGCTGTGCTAATACCGCATAACGATCTAT

---

Mycobacterium	GGATGAAAGCGGGGATCGCAAGACCTCGCGGAATGGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC TCACCAAGGAGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG GACGAACGCTGGCGCGTGTCTAACACATGCAAGTCGAACAGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGTGGCGAACGGGTG AGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACTACGGCC TGCTTGGGTTGTGGTGGAAAGCTTTTGGCGTGTGGGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTATGGCCT ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAG
Clostridium XI	ATTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGATTCTCTTCGGAGAAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC GCGTGGGTAACCTGCCCTGTACACACGGATAACATAACGAAAGGTATGCTAATACGGGATAACATAAGAAATTCGCAT GTTTTTCTTATCAAAGCTCCGGCGGTACAGGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGGTCACCAAG GCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACAGTGGAACTGAGACACGGTCCAA
Phylum "Proteobacteria"	AACGAACGCTGGCGGCATGCTAACACATGCAAGTCGAACGGGCATAGCAATATGTCAGCGCAAACGGGTGAGAAAT ACAGAGGAATCTACCTAGCAGTAAGGAATAACCTGGGAAACCAGAGCTAATGCCATATATTACCCTCCGGGGGAAAG ATTTATCGCTGTTAGATGAGCCTCTGCCGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCTACCAAGGCAATGATGCGTAGC TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG
Saccharibacteria	GATGAATGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGCGTCTAGTTTACTAGATGGCGGCGAGCGGGCG ACGGCTGAGTAACGCGTAGGAATGTGCCCAAAGTGAGGAATAACTGCCGAAAGGGTAGCTAATGCCGCATATGGTC TTCGGATTAAGGATTTATCCGCTTTGGGATCAGCCTGCGTACGATTAGATAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGT CGACGATCGTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAGACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG
Fam. Rickettsiaceae	AACGAACGCTGGCGGCATGCTAACACATGCAAGTTGAACGGGCTAATTTAGGGCTTGCTCTAGATTAGCTAGTAGCA AACGGGTGAGTAACACGTGGGAATCTACCCATCAGTACGGAATAACATTTGGAAACAAATGCTAATACCGTATATTCT CTTAGGAGGAAAGATTTATCGCTGATGGATGAGCCCGCTCAGATTAGGTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGCC GACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
Betaproteobacteria	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAAAGTAGCAATACTTGAGAGTGGCGAACGGGTGAG TAATATATCGGAACGTACCTAGTAGTGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATAACGTCCTAAGGGGGA AAGCAGGGGATCGTAAGACCTTGCCTATTAGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTAGTTGGTTGGGTAAGGCTCACCA AGGCAACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGTCACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG
Parcubacteria	ATTGAACGCTGGCGGCGTGGATGAGGCATGCAAGTCGAATGGGCTTAGACCCATGGCAGACGAGGTAGGAACACGTAG GTACGTACCCCAAAGTCAGGGATAACCCGCCGAAAGGCGGAATAATACTTGATGGTCTCGCGAGAGTAAAGATTTATCG CTTTGGGAACGGCCTGCGTTCTATCAGCTTGTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTACGACGGATAGGGGAGGTGAG AGCCTGACCCCAACCGATGGAAGTGGGACACGGTCCAT
Paraperlucidibaca	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTCGAACGAGGTGTTGGTGTGCTTGCCTAACACCTAGTGGCGAACGG GTGAGTAATACTTGGGAATCTGCCTGTAGCGGGGATAACGTTTCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATAACGTCCTACGG GGGAAAGGAGGGATCTTCGGACCTTGCCTATAAGATGAGCCAAGCGAGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTC ACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGG
Ideonella	ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAAAGTAGCAATACTTGAGAGTGGCGAACGGGTGAG TAATATATCGGAACGTACCTAGTAGTGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATAACGTCCTAAGGGGGA AAGCAGGGGATCGTAAGACCTTGCCTATTAGAGCGGCCGATATCAGATTAGCTAGTTGGTTGGGTAAGGCTCACCA AGGCAACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGTCACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAG

---

Phylum "Proteobacteria"

TGAGTAAAGCATCGGAACGTGCCAGTAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGACCTAAGG  
GTGAAAGGGGGGATCGCAAGACCTCTCGCTATTGGAGCGGCCGATGTCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCT  
ACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG  
AAAGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAATAAAATGTCTAGCTTGCTAGATATTTTATTAGTGG  
CAGACGGGTGCGTAACACGTAGGAATCTACCCTGTAGTACGGAACAACAATCGGAAACGGTTGCTAATACCGAATACG  
CTCGGCAACGAGGAAAGATTTATCGCTATAGGATGAGCCTGCGCTAGATTAGGTAGTTGGTAGGGTAAGGGCCTACCA  
AGCCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAECTGAGATACGGTCCAG

Caenimonas

ATTGAACGCTGGCGGAATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACGGGGCAACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGG  
TGAGTAATACATCGGAACGTGCCAATCGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATAACGATCTACGG  
ATGAAAGCGGGGGATCGCAAGACCTCGCGCAATGGAGCGGCCGATGTCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTC  
ACCAAGCCAATGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAECTGAGACACGGTCCAG

**Auswahl gemessener Ct-Werte aus den mikrobiologischen Untersuchungen ausgesuchter aquatischer Habitate im Donauried** (Messungen erfolgten in Triplikate).

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	KA Langenau Zulauf	29,29	29,04	0,255
	KA Langenau Zulauf	28,78	29,04	0,255
	KA Langenau Zulauf	29,03	29,04	0,255
	KA Asselfingen Zulauf	28,88	29,00	0,637
	KA Asselfingen Zulauf	28,44	29,00	0,637
	KA Asselfingen Zulauf	29,69	29,00	0,637
	KA Steinhäule Zulauf	29,24	29,38	0,123
	KA Steinhäule Zulauf	29,44	29,38	0,123
	KA Steinhäule Zulauf	29,46	29,38	0,123
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	KA Langenau Zulauf	24,46	24,41	0,074
	KA Langenau Zulauf	24,45	24,41	0,074
	KA Langenau Zulauf	24,32	24,41	0,074
	KA Asselfingen Zulauf	24,35	24,82	0,408
	KA Asselfingen Zulauf	25,11	24,82	0,408
	KA Asselfingen Zulauf	25,00	24,82	0,408
	KA Steinhäule Zulauf	25,63	25,55	0,146
	KA Steinhäule Zulauf	25,38	25,55	0,146
	KA Steinhäule Zulauf	25,63	25,55	0,146
	NTC	35,15	35,15	0,000
<i>ampC</i>	KA Langenau Zulauf	32,32	32,30	0,081
	KA Langenau Zulauf	32,37	32,30	0,081
	KA Langenau Zulauf	32,21	32,30	0,081
	KA Asselfingen Zulauf	31,72	31,52	0,227
	KA Asselfingen Zulauf	31,27	31,52	0,227
	KA Asselfingen Zulauf	31,58	31,52	0,227
	KA Steinhäule Zulauf	30,64	30,58	0,086
	KA Steinhäule Zulauf	30,63	30,58	0,086
	KA Steinhäule Zulauf	30,48	30,58	0,086
	NTC	N/A	0,00	0,000
Enterococci	KA Langenau Zulauf	27,25	27,32	0,245
	KA Langenau Zulauf	27,11	27,32	0,245
	KA Langenau Zulauf	27,58	27,32	0,245
	KA Asselfingen Zulauf	25,34	25,54	0,180
	KA Asselfingen Zulauf	25,58	25,54	0,180
	KA Asselfingen Zulauf	25,70	25,54	0,180
	KA Steinhäule Zulauf	24,77	24,65	0,112
	KA Steinhäule Zulauf	24,63	24,65	0,112
	KA Steinhäule Zulauf	24,55	24,65	0,112
	NTC	N/A	0,00	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	KA Langenau Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Langenau Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Langenau Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Asselfingen Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Asselfingen Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Asselfingen Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Steinhäule Zulauf	37,01	37,01	
	KA Steinhäule Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Steinhäule Zulauf	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	KA Langenau Zulauf	23,53	23,95	0,367
	KA Langenau Zulauf	24,12	23,95	0,367
	KA Langenau Zulauf	24,20	23,95	0,367
	KA Asselfingen Zulauf	23,84	23,84	0,000
	KA Asselfingen Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Asselfingen Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Steinhäule Zulauf	23,49	23,46	0,087
	KA Steinhäule Zulauf	23,36	23,46	0,087
	KA Steinhäule Zulauf	23,52	23,46	0,087
	NTC	39,10	39,10	0,00
<i>P. aeruginosa</i>	KA Langenau Zulauf	34,15	34,05	0,333
	KA Langenau Zulauf	34,32	34,05	0,333
	KA Langenau Zulauf	33,67	34,05	0,333
	KA Asselfingen Zulauf	33,01	33,13	0,109
	KA Asselfingen Zulauf	33,23	33,13	0,109
	KA Asselfingen Zulauf	33,15	33,13	0,109
	KA Steinhäule Zulauf	33,11	33,36	0,259
	KA Steinhäule Zulauf	33,36	33,36	0,259
	KA Steinhäule Zulauf	33,63	33,36	0,259
	NTC	N/A	0,00	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	Nau	29,71	29,18	0,488
	Nau	29,07	29,18	0,488
	Nau	28,76	29,18	0,488
	RkB Schammbach	27,89	28,02	0,311
	RkB Schammbach	27,79	28,02	0,311
	RkB Schammbach	28,37	28,02	0,311
	KA Langenau Ablauf	29,09	29,01	0,076
	KA Langenau Ablauf	29,02	29,01	0,076
	KA Langenau Ablauf	28,93	29,01	0,076
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	Nau	25,35	24,59	0,653
	Nau	24,26	24,59	0,653
	Nau	24,17	24,59	0,653
	RkB Schammbach	23,94	23,99	0,064
	RkB Schammbach	23,96	23,99	0,064
	RkB Schammbach	24,06	23,99	0,064
	KA Langenau Ablauf	24,01	23,60	0,386
	KA Langenau Ablauf	23,25	23,60	0,386
	KA Langenau Ablauf	23,54	23,60	0,386
	NTC	36,49	36,49	0,000
<i>ampC</i>	Nau	32,08	32,08	0,061
	Nau	32,15	32,08	0,061
	Nau	32,02	32,08	0,061
	RkB Schammbach	33,43	33,31	0,140
	RkB Schammbach	33,33	33,31	0,140
	RkB Schammbach	33,16	33,31	0,140
	KA Langenau Ablauf	32,11	32,22	0,200
	KA Langenau Ablauf	32,45	32,22	0,200
	KA Langenau Ablauf	32,10	32,22	0,200
	NTC	N/A	0,00	0,000
Enterococci	Nau	27,42	27,42	0,025
	Nau	27,39	27,42	0,025
	Nau	27,44	27,42	0,025
	RkB Schammbach	32,04	32,02	0,083
	RkB Schammbach	31,93	32,02	0,083
	RkB Schammbach	32,09	32,02	0,083
	KA Langenau Ablauf	25,57	25,49	0,074
	KA Langenau Ablauf	25,44	25,49	0,074
	KA Langenau Ablauf	25,45	25,49	0,074
	NTC	N/A	0,00	0,000



Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	Nau	N/A	0,00	0,000
	Nau	N/A	0,00	0,000
	Nau	N/A	0,00	0,000
	RkB Schammbach	N/A	0,00	0,000
	RkB Schammbach	N/A	0,00	0,000
	RkB Schammbach	N/A	0,00	0,000
	KA Langenau Ablauf	N/A	0,00	0,000
	KA Langenau Ablauf	N/A	0,00	0,000
	KA Langenau Ablauf	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	Nau	28,67	28,72	0,188
	Nau	28,56	28,72	0,188
	Nau	28,93	28,72	0,188
	RkB Schammbach	34,09	34,18	0,144
	RkB Schammbach	34,11	34,18	0,144
	RkB Schammbach	34,35	34,18	0,144
	KA Langenau Ablauf	26,61	26,49	0,105
	KA Langenau Ablauf	26,45	26,49	0,105
	KA Langenau Ablauf	26,42	26,49	0,105
	NTC	37,37	26,49	0,00
<i>P. aeruginosa</i>	Nau	30,92	30,94	0,133
	Nau	30,81	30,94	0,133
	Nau	31,08	30,94	0,133
	RkB Schammbach	29,43	29,24	0,162
	RkB Schammbach	29,13	29,24	0,162
	RkB Schammbach	29,17	29,24	0,162
	KA Langenau Ablauf	30,55	30,53	0,224
	KA Langenau Ablauf	30,29	30,53	0,224
	KA Langenau Ablauf	30,74	30,53	0,224
	NTC	37,03	37,03	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	Rammingen Rüb	27,62	27,76	0,121
	Rammingen Rüb	27,83	27,76	0,121
	Rammingen Rüb	27,84	27,76	0,121
	Lone	28,86	29,20	0,406
	Lone	29,65	29,20	0,406
	Lone	29,11	29,20	0,406
	Rammingen VSB	27,00	26,82	0,217
	Rammingen VSB	26,87	26,82	0,217
	Rammingen VSB	26,58	26,82	0,217
	NTC	38,53	38,53	0,000
<i>vanA</i>	Rammingen Rüb	23,56	23,24	0,362
	Rammingen Rüb	23,53	23,24	0,362
	Rammingen Rüb	22,92	23,24	0,362
	Lone	24,61	28,04	6,103
	Lone	24,42	28,04	6,103
	Lone	35,08	28,04	6,103
	Rammingen VSB	21,47	21,38	0,112
	Rammingen VSB	21,26	21,38	0,112
	Rammingen VSB	21,42	21,38	0,112
	NTC	34,23	34,23	0,000
<i>ampC</i>	Rammingen Rüb	31,14	31,34	0,440
	Rammingen Rüb	31,85	31,34	0,440
	Rammingen Rüb	31,04	31,34	0,440
	Lone	33,40	32,89	0,477
	Lone	32,81	32,89	0,477
	Lone	32,45	32,89	0,477
	Rammingen VSB	30,39	30,29	0,130
	Rammingen VSB	30,33	30,29	0,130
	Rammingen VSB	30,14	30,29	0,130
	NTC	38,41	38,41	0,000
Enterococci	Rammingen Rüb	31,72	31,80	0,304
	Rammingen Rüb	32,13	31,80	0,304
	Rammingen Rüb	31,54	31,80	0,304
	Lone	32,20	32,27	0,071
	Lone	32,35	32,27	0,071
	Lone	32,27	32,27	0,071
	Rammingen VSB	31,45	31,69	0,353
	Rammingen VSB	32,09	31,69	0,353
	Rammingen VSB	31,52	31,69	0,353
	NTC	36,46	36,46	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	Rammingen Rüb	34,52	34,52	0,000
	Rammingen Rüb	N/A	0,00	0,000
	Rammingen Rüb	N/A	0,00	0,000
	Lone	N/A	0,00	0,000
	Lone	N/A	0,00	0,000
	Lone	N/A	0,00	0,000
	Rammingen VSB	N/A	0,00	0,000
	Rammingen VSB	N/A	0,00	0,000
	Rammingen VSB	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	Rammingen Rüb	33,92	34,23	0,308
	Rammingen Rüb	34,53	34,23	0,308
	Rammingen Rüb	34,23	34,23	0,308
	Lone	33,99	31,87	2,512
	Lone	29,10	31,87	2,512
	Lone	32,54	31,87	2,512
	Rammingen VSB	33,22	33,09	0,241
	Rammingen VSB	32,81	33,09	0,241
	Rammingen VSB	33,23	33,09	0,241
	NTC	38,99	38,99	0,00
<i>P. aeruginosa</i>	Rammingen Rüb	29,59	31,59	4,474
	Rammingen Rüb	36,71	31,59	4,474
	Rammingen Rüb	28,46	31,59	4,474
	Lone	32,18	31,96	0,463
	Lone	31,53	31,96	0,463
	Lone	N/A	0,00	0,000
	Rammingen VSB	30,10	30,07	0,026
	Rammingen VSB	30,06	30,07	0,026
	Rammingen VSB	30,05	30,07	0,026
	NTC	37,22	37,22	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	GWMst 7103	29,36	29,64	0,345
	GWMst 7103	29,52	29,64	0,345
	GWMst 7103	30,02	29,64	0,345
	GWMst 7106	28,86	28,87	0,217
	GWMst 7106	28,66	28,87	0,217
	GWMst 7106	29,09	28,87	0,217
	GWMst 7721	29,00	29,24	0,261
	GWMst 7721	29,52	29,24	0,261
	GWMst 7721	29,21	29,24	0,261
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	GWMst 7103	24,13	24,01	0,120
	GWMst 7103	23,99	24,01	0,120
	GWMst 7103	23,90	24,01	0,120
	GWMst 7106	24,31	24,38	0,156
	GWMst 7106	24,27	24,38	0,156
	GWMst 7106	24,56	24,38	0,156
	GWMst 7721	24,15	24,14	0,046
	GWMst 7721	24,10	24,14	0,046
	GWMst 7721	24,19	24,14	0,046
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ampC</i>	GWMst 7103	32,31	32,20	0,100
	GWMst 7103	32,12	32,20	0,100
	GWMst 7103	32,17	32,20	0,100
	GWMst 7106	26,04	26,00	0,030
	GWMst 7106	25,99	26,00	0,030
	GWMst 7106	25,98	26,00	0,030
	GWMst 7721	29,30	29,26	0,036
	GWMst 7721	29,23	29,26	0,036
	GWMst 7721	29,26	29,26	0,036
	NTC	N/A	0,00	0,000
Enterococci	GWMst 7103	37,56	38,02	0,422
	GWMst 7103	38,13	38,02	0,422
	GWMst 7103	38,38	38,02	0,422
	GWMst 7106	32,22	31,26	0,044
	GWMst 7106	31,30	31,26	0,044
	GWMst 7106	31,24	31,26	0,044
	GWMst 7721	30,56	30,52	0,069
	GWMst 7721	30,56	30,52	0,069
	GWMst 7721	30,44	30,52	0,069
	NTC	N/A	0,00	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	GWMst 7103	N/A	0,00	0,000
	GWMst 7103	N/A	0,00	0,000
	GWMst 7103	N/A	0,00	0,000
	GWMst 7106	37,45	37,45	0,000
	GWMst 7106	N/A	0,00	0,000
	GWMst 7106	N/A	0,00	0,000
	GWMst 7721	N/A	0,00	0,000
	GWMst 7721	N/A	0,00	0,000
	GWMst 7721	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	GWMst 7103	36,28	35,55	0,913
	GWMst 7103	35,86	35,55	0,913
	GWMst 7103	34,53	35,55	0,913
	GWMst 7106	36,10	35,85	0,506
	GWMst 7106	36,18	35,85	0,506
	GWMst 7106	35,27	35,85	0,506
	GWMst 7721	36,49	36,28	0,229
	GWMst 7721	36,32	36,28	0,229
	GWMst 7721	36,03	36,28	0,229
	NTC	N/A	0,00	0,00
<i>P. aeruginosa</i>	GWMst 7103	34,11	33,97	0,139
	GWMst 7103	33,98	33,97	0,139
	GWMst 7103	33,83	33,97	0,139
	GWMst 7106	34,57	34,72	0,298
	GWMst 7106	34,53	34,72	0,298
	GWMst 7106	35,07	34,72	0,298
	GWMst 7721	31,61	31,73	0,210
	GWMst 7721	31,97	31,73	0,210
	GWMst 7721	31,61	31,73	0,210
	NTC	N/A	0,00	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	KA Halzhausen Zulauf	38,32	28,37	0,557
	KA Halzhausen Zulauf	27,84	28,37	0,557
	KA Halzhausen Zulauf	28,95	28,37	0,557
	Donau	29,47	29,35	0,139
	Donau	29,20	29,35	0,139
	Donau	29,39	29,35	0,139
	RKB Rohngraben	26,12	26,37	0,260
	RKB Rohngraben	26,34	26,37	0,260
	RKB Rohngraben	26,64	26,37	0,260
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	KA Halzhausen Zulauf	24,61	24,65	0,035
	KA Halzhausen Zulauf	24,65	24,65	0,035
	KA Halzhausen Zulauf	24,68	24,65	0,035
	Donau	23,50	23,46	0,034
	Donau	23,44	23,46	0,034
	Donau	23,45	23,46	0,034
	RKB Rohngraben	24,03	23,95	0,084
	RKB Rohngraben	23,96	23,95	0,084
	RKB Rohngraben	23,87	23,95	0,084
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ampC</i>	KA Halzhausen Zulauf	32,88	32,76	0,188
	KA Halzhausen Zulauf	32,55	32,76	0,188
	KA Halzhausen Zulauf	32,87	32,76	0,188
	Donau	31,60	31,48	0,164
	Donau	31,55	31,48	0,164
	Donau	31,29	31,48	0,164
	RKB Rohngraben	30,69	30,75	0,104
	RKB Rohngraben	30,87	30,75	0,104
	RKB Rohngraben	30,69	30,75	0,104
	NTC	N/A	0,00	0,000
Enterococci	KA Halzhausen Zulauf	27,18	27,26	0,078
	KA Halzhausen Zulauf	27,33	27,26	0,078
	KA Halzhausen Zulauf	27,28	27,26	0,078
	Donau	37,08	36,10	1,405
	Donau	36,72	36,10	1,405
	Donau	34,49	36,10	1,405
	RKB Rohngraben	28,86	29,01	0,138
	RKB Rohngraben	29,13	29,01	0,138
	RKB Rohngraben	29,04	29,01	0,138
	NTC	N/A	0,00	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	KA Halzhausen Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Halzhausen Zulauf	N/A	0,00	0,000
	KA Halzhausen Zulauf	N/A	0,00	0,000
	Donau	N/A	0,00	0,000
	Donau	N/A	0,00	0,000
	Donau	N/A	0,00	0,000
	RKB Rohngraben	37,03	36,89	0,175
	RKB Rohngraben	36,94	36,89	0,175
	RKB Rohngraben	36,69	36,89	0,175
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	KA Halzhausen Zulauf	25,28	25,23	0,061
	KA Halzhausen Zulauf	25,24	25,23	0,061
	KA Halzhausen Zulauf	25,16	25,23	0,061
	Donau	34,25	34,54	0,304
	Donau	34,85	34,54	0,304
	Donau	34,50	34,54	0,304
	RKB Rohngraben	31,23	31,24	0,020
	RKB Rohngraben	31,23	31,24	0,020
	RKB Rohngraben	31,26	31,24	0,020
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>P. aeruginosa</i>	KA Halzhausen Zulauf	33,28	32,90	0,446
	KA Halzhausen Zulauf	33,01	32,90	0,446
	KA Halzhausen Zulauf	32,41	32,90	0,446
	Donau	34,67	34,58	0,128
	Donau	34,64	34,58	0,128
	Donau	34,44	34,58	0,128
	RKB Rohngraben	31,40	31,51	0,136
	RKB Rohngraben	31,66	31,51	0,136
	RKB Rohngraben	31,45	31,51	0,136
	NTC	N/A	0,00	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	KA Halzhausen Ablauf	27,79	27,82	0,242
	KA Halzhausen Ablauf	27,59	27,82	0,242
	KA Halzhausen Ablauf	28,07	27,82	0,242
	KA Asselfingen Ablauf	30,27	30,01	0,232
	KA Asselfingen Ablauf	29,82	30,01	0,232
	KA Asselfingen Ablauf	29,94	30,01	0,232
	RKB Schammenbach	27,64	27,33	0,299
	RKB Schammenbach	27,30	27,33	0,299
	RKB Schammenbach	27,04	27,33	0,299
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	KA Halzhausen Ablauf	22,85	22,80	0,079
	KA Halzhausen Ablauf	22,85	22,80	0,079
	KA Halzhausen Ablauf	22,71	22,80	0,079
	KA Asselfingen Ablauf	24,72	24,41	0,289
	KA Asselfingen Ablauf	24,35	24,41	0,289
	KA Asselfingen Ablauf	24,15	24,41	0,289
	RKB Schammenbach	21,90	21,55	0,301
	RKB Schammenbach	21,42	21,55	0,301
	RKB Schammenbach	21,34	21,55	0,301
	NTC	39,18	39,18	0,000
<i>ampC</i>	KA Halzhausen Ablauf	32,91	32,54	0,324
	KA Halzhausen Ablauf	32,34	32,54	0,324
	KA Halzhausen Ablauf	32,37	32,54	0,324
	KA Asselfingen Ablauf	33,97	34,13	0,291
	KA Asselfingen Ablauf	33,95	34,13	0,291
	KA Asselfingen Ablauf	34,46	34,13	0,291
	RKB Schammenbach	31,62	31,45	0,169
	RKB Schammenbach	31,28	31,45	0,169
	RKB Schammenbach	31,46	31,45	0,169
	NTC	N/A	0,00	0,000
Enterococci	KA Halzhausen Ablauf	33,02	33,12	0,084
	KA Halzhausen Ablauf	33,16	33,12	0,084
	KA Halzhausen Ablauf	33,17	33,12	0,084
	KA Asselfingen Ablauf	31,54	31,69	0,438
	KA Asselfingen Ablauf	32,18	31,69	0,438
	KA Asselfingen Ablauf	31,34	31,69	0,438
	RKB Schammenbach	28,60	28,09	0,465
	RKB Schammenbach	28,00	28,09	0,465
	RKB Schammenbach	27,68	28,09	0,465
	NTC	N/A	0,00	0,000



Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	KA Halzhausen Ablauf	37,77	37,40	0,519
	KA Halzhausen Ablauf	37,03	37,40	0,519
	KA Halzhausen Ablauf	N/A	0,00	0,000
	KA Asselfingen Ablauf	N/A	0,00	0,000
	KA Asselfingen Ablauf	N/A	0,00	0,000
	KA Asselfingen Ablauf	N/A	0,00	0,000
	RKB Schammenbach	N/A	0,00	0,000
	RKB Schammenbach	N/A	0,00	0,000
	RKB Schammenbach	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	KA Halzhausen Ablauf	31,81	31,92	0,115
	KA Halzhausen Ablauf	32,03	31,92	0,115
	KA Halzhausen Ablauf	31,91	31,92	0,115
	KA Asselfingen Ablauf	32,50	32,42	0,159
	KA Asselfingen Ablauf	32,53	32,42	0,159
	KA Asselfingen Ablauf	32,24	32,42	0,159
	RKB Schammenbach	27,86	27,85	0,043
	RKB Schammenbach	27,89	27,85	0,043
	RKB Schammenbach	27,80	27,85	0,043
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>P. aeruginosa</i>	KA Halzhausen Ablauf	34,30	34,18	0,202
	KA Halzhausen Ablauf	34,29	34,18	0,202
	KA Halzhausen Ablauf	33,95	34,18	0,202
	KA Asselfingen Ablauf	34,88	34,74	0,106
	KA Asselfingen Ablauf	34,80	34,74	0,106
	KA Asselfingen Ablauf	34,53	34,74	0,106
	RKB Schammenbach	30,54	30,33	0,186
	RKB Schammenbach	30,29	30,33	0,186
	RKB Schammenbach	30,17	30,33	0,186
	NTC	N/A	0,00	0,000

<b>Gen</b>	<b>Probe</b>	<b>Ct-Wert</b>	<b>Ct-Mittelwert</b>	<b>Ct-Standardabweichung</b>
<i>blaVIM</i>	Klinikum Langenau	33,27	33,21	0,133
	Klinikum Langenau	33,06	33,21	0,133
	Klinikum Langenau	33,31	33,21	0,133
	Klinikum Ulm	24,02	23,87	0,139
	Klinikum Ulm	23,81	23,87	0,139
	Klinikum Ulm	23,77	23,87	0,139
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	Klinikum Langenau	29,01	28,75	0,231
	Klinikum Langenau	28,63	28,75	0,231
	Klinikum Langenau	28,75	28,75	0,231
	Klinikum Ulm	24,10	23,80	0,295
	Klinikum Ulm	23,79	23,80	0,295
	Klinikum Ulm	23,51	23,80	0,295
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ampC</i>	Klinikum Langenau	33,24	33,75	0,466
	Klinikum Langenau	33,89	33,75	0,466
	Klinikum Langenau	34,14	33,75	0,466
	Klinikum Ulm	31,69	31,45	0,210
	Klinikum Ulm	31,36	31,45	0,210
	Klinikum Ulm	31,29	31,45	0,210
	NTC	N/A	0,00	0,000
Enterococci	Klinikum Langenau	25,88	25,80	0,089
	Klinikum Langenau	25,81	25,80	0,089
	Klinikum Langenau	25,70	25,80	0,089
	Klinikum Ulm	27,18	27,07	0,185
	Klinikum Ulm	27,18	27,07	0,185
	Klinikum Ulm	26,86	27,07	0,185
	NTC	N/A	0,00	0,000

<b>Gen</b>	<b>Probe</b>	<b>Ct-Wert</b>	<b>Ct-Mittelwert</b>	<b>Ct-Standardabweichung</b>
<i>mecA</i>	Klinikum Langenau	N/A	0,00	0,000
	Klinikum Langenau	N/A	0,00	0,000
	Klinikum Langenau	N/A	0,00	0,000
	Klinikum Ulm	35,17	35,93	1,067
	Klinikum Ulm	36,68	35,93	1,067
	Klinikum Ulm	0,00	0,000	1,067
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	Klinikum Langenau	26,88	26,81	0,078
	Klinikum Langenau	26,72	26,81	0,078
	Klinikum Langenau	26,83	26,81	0,078
	Klinikum Ulm	22,11	22,00	0,179
	Klinikum Ulm	22,09	22,00	0,179
	Klinikum Ulm	21,79	22,00	0,179
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>P. aeruginosa</i>	Klinikum Langenau	35,16	35,20	0,112
	Klinikum Langenau	35,33	35,20	0,112
	Klinikum Langenau	35,12	35,20	0,112
	Klinikum Ulm	31,08	31,15	0,058
	Klinikum Ulm	31,17	31,15	0,058
	Klinikum Ulm	31,19	31,15	0,058
	NTC	N/A	0,00	0,000

**Auswahl der gemessenen Ct-Werte der mikrobiologischen Parameter an der Pilotanlage an der Kläranlage Südhessen.** Alle Werte wurden in Triplikaten vermessen.

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	Ozonung Zulauf	27,83	27,85	0,106
	Ozonung Zulauf	27,75	27,85	0,106
	Ozonung Zulauf	27,96	27,85	0,106
	Ozonung Ablauf	26,15	25,97	0,154
	Ozonung Ablauf	25,91	25,97	0,154
	Ozonung Ablauf	25,86	25,97	0,154
	GAC 1 Ablauf	28,56	28,74	0,499
	GAC 1 Ablauf	29,31	28,74	0,499
	GAC 1 Ablauf	28,36	28,74	0,499
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	Ozonung Zulauf	23,22	23,14	0,091
	Ozonung Zulauf	23,14	23,14	0,091
	Ozonung Zulauf	23,04	23,14	0,091
	Ozonung Ablauf	23,38	23,10	0,252
	Ozonung Ablauf	22,89	23,10	0,252
	Ozonung Ablauf	23,04	23,10	0,252
	GAC 1 Ablauf	24,30	23,80	0,447
	GAC 1 Ablauf	23,67	23,80	0,447
	GAC 1 Ablauf	23,44	23,80	0,447
	NTC	39,11	39,11	0,000
<i>ampC</i>	Ozonung Zulauf	33,16	32,78	0,514
	Ozonung Zulauf	32,98	32,78	0,514
	Ozonung Zulauf	32,20	32,78	0,514
	Ozonung Ablauf	32,16	32,21	0,112
	Ozonung Ablauf	32,14	32,21	0,112
	Ozonung Ablauf	32,34	32,21	0,112
	GAC 1 Ablauf	34,30	31,20	0,123
	GAC 1 Ablauf	34,06	31,20	0,123
	GAC 1 Ablauf	34,23	31,20	0,123
	NTC	40,62	40,62	0,000
Enterococci	Ozonung Zulauf	28,71	28,40	0,283
	Ozonung Zulauf	28,34	28,40	0,283
	Ozonung Zulauf	28,16	28,40	0,283
	Ozonung Ablauf	35,30	35,44	0,486
	Ozonung Ablauf	35,03	35,44	0,486
	Ozonung Ablauf	35,98	35,44	0,486
	GAC 1 Ablauf	37,00	36,73	0,290
	GAC 1 Ablauf	36,77	36,73	0,290
	GAC 1 Ablauf	36,42	36,73	0,290
	NTC	37,21	37,21	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	Ozonung Zulauf	N/A	0,00	0,000
	Ozonung Zulauf	N/A	0,00	0,000
	Ozonung Zulauf	N/A	0,00	0,000
	Ozonung Ablauf	N/A	0,00	0,000
	Ozonung Ablauf	N/A	0,00	0,000
	Ozonung Ablauf	N/A	0,00	0,000
	GAC 1 Ablauf	N/A	0,00	0,000
	GAC 1 Ablauf	N/A	0,00	0,000
	GAC 1 Ablauf	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	Ozonung Zulauf	28,37	28,31	0,047
	Ozonung Zulauf	28,29	28,31	0,047
	Ozonung Zulauf	28,29	28,31	0,047
	Ozonung Ablauf	34,48	34,30	0,160
	Ozonung Ablauf	34,20	34,30	0,160
	Ozonung Ablauf	34,21	34,30	0,160
	GAC 1 Ablauf	36,26	36,95	0,605
	GAC 1 Ablauf	37,23	36,95	0,605
	GAC 1 Ablauf	37,36	36,95	0,605
	NTC	40,77	40,77	0,000
<i>P. aeruginosa</i>	Ozonung Zulauf	33,96	33,98	0,125
	Ozonung Zulauf	33,86	33,98	0,125
	Ozonung Zulauf	34,11	33,98	0,125
	Ozonung Ablauf	33,57	33,65	0,073
	Ozonung Ablauf	33,65	33,65	0,073
	Ozonung Ablauf	33,72	33,65	0,073
	GAC 1 Ablauf	34,07	34,04	0,103
	GAC 1 Ablauf	33,92	34,04	0,103
	GAC 1 Ablauf	34,12	34,04	0,103
	NTC	N/A	0,00	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	GAC 2 Ablauf	29,43	29,49	0,070
	GAC 2 Ablauf	29,57	29,49	0,070
	GAC 2 Ablauf	29,47	29,49	0,070
	Biofilter 1 Ablauf	29,02	29,09	0,066
	Biofilter 1 Ablauf	29,10	29,09	0,066
	Biofilter 1 Ablauf	29,15	29,09	0,066
	Biofilter 2 Ablauf	28,27	28,36	0,113
	Biofilter 2 Ablauf	28,33	28,36	0,113
	Biofilter 2 Ablauf	28,49	28,36	0,113
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	GAC 2 Ablauf	24,05	23,91	0,123
	GAC 2 Ablauf	23,81	23,91	0,123
	GAC 2 Ablauf	23,87	23,91	0,123
	Biofilter 1 Ablauf	24,11	24,03	0,072
	Biofilter 1 Ablauf	23,97	24,03	0,072
	Biofilter 1 Ablauf	24,03	24,03	0,072
	Biofilter 2 Ablauf	24,26	24,16	0,116
	Biofilter 2 Ablauf	24,03	24,16	0,116
	Biofilter 2 Ablauf	24,17	24,16	0,116
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ampC</i>	GAC 2 Ablauf	32,98	32,85	0,274
	GAC 2 Ablauf	33,03	32,85	0,274
	GAC 2 Ablauf	32,53	32,85	0,274
	Biofilter 1 Ablauf	32,37	32,78	0,653
	Biofilter 1 Ablauf	32,44	32,78	0,653
	Biofilter 1 Ablauf	33,54	32,78	0,653
	Biofilter 2 Ablauf	33,29	33,81	0,360
	Biofilter 2 Ablauf	33,77	33,81	0,360
	Biofilter 2 Ablauf	34,37	33,81	0,360
	NTC	N/A	0,00	0,000
Enterococci	GAC 2 Ablauf	35,51	35,16	0,322
	GAC 2 Ablauf	34,88	35,16	0,322
	GAC 2 Ablauf	35,11	35,16	0,322
	Biofilter 1 Ablauf	38,05	35,58	0,750
	Biofilter 1 Ablauf	39,11	35,58	0,750
	Biofilter 1 Ablauf	N/A	0,00	0,000
	Biofilter 2 Ablauf	34,07	35,44	1,500
	Biofilter 2 Ablauf	35,22	35,44	1,500
	Biofilter 2 Ablauf	37,04	35,44	1,500
	NTC	38,27	38,27	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	GAC 2 Ablauf	N/A	0,00	0,000
	GAC 2 Ablauf	N/A	0,00	0,000
	GAC 2 Ablauf	N/A	0,00	0,000
	Biofilter 1 Ablauf	37,76	38,85	1,229
	Biofilter 1 Ablauf	40,18	38,85	1,229
	Biofilter 1 Ablauf	38,61	38,85	1,229
	Biofilter 2 Ablauf	N/A	0,00	0,000
	Biofilter 2 Ablauf	N/A	0,00	0,000
	Biofilter 2 Ablauf	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	GAC 2 Ablauf	30,63	30,79	0,148
	GAC 2 Ablauf	30,93	30,79	0,148
	GAC 2 Ablauf	30,79	30,79	0,148
	Biofilter 1 Ablauf	34,65	34,48	0,346
	Biofilter 1 Ablauf	34,71	34,48	0,346
	Biofilter 1 Ablauf	34,08	34,48	0,346
	Biofilter 2 Ablauf	27,86	27,69	0,184
	Biofilter 2 Ablauf	27,50	27,69	0,184
	Biofilter 2 Ablauf	27,72	27,69	0,184
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>P. aeruginosa</i>	GAC 2 Ablauf	33,87	33,97	0,094
	GAC 2 Ablauf	33,99	33,97	0,094
	GAC 2 Ablauf	34,06	33,97	0,094
	Biofilter 1 Ablauf	35,05	35,13	0,447
	Biofilter 1 Ablauf	34,73	35,13	0,447
	Biofilter 1 Ablauf	35,62	35,13	0,447
	Biofilter 2 Ablauf	34,13	33,93	0,202
	Biofilter 2 Ablauf	33,94	33,93	0,202
	Biofilter 2 Ablauf	33,72	33,93	0,202
	NTC	N/A	0,00	0,000

**Gemessene Ct-Werte aus der Untersuchung zu Verfahrenskombination aus Ozon- und UV-Behandlung an der Pilotanlage am Klärwerk Neu Ulm-Steinhäule.** Alle Werte wurden in Duplikaten vermessen.

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	0,7 Ozon + UV 0	27,74	27,50	0,339
	0,7 Ozon + UV 0	27,26	27,50	0,339
	0,7 Ozon + UV 100	28,13	28,02	0,165
	0,7 Ozon + UV 100	27,90	28,02	0,165
	0,7 Ozon + UV 200	32,16	32,22	0,083
	0,7 Ozon + UV 200	32,28	32,22	0,083
	0,7 Ozon + UV 300	35,12	35,01	0,164
	0,7 Ozon + UV 300	34,89	35,01	0,164
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	0,7 Ozon + UV 0	23,80	23,83	0,036
	0,7 Ozon + UV 0	23,85	23,83	0,036
	0,7 Ozon + UV 100	24,97	24,88	0,126
	0,7 Ozon + UV 100	24,79	24,88	0,126
	0,7 Ozon + UV 200	24,59	24,59	0,000
	0,7 Ozon + UV 200	24,59	24,59	0,000
	0,7 Ozon + UV 300	23,05	23,02	0,040
	0,7 Ozon + UV 300	22,99	23,02	0,040
	NTC	38,70	37,70	0,000
<i>ampC</i>	0,7 Ozon + UV 0	31,07	31,06	0,018
	0,7 Ozon + UV 0	31,04	31,06	0,018
	0,7 Ozon + UV 100	33,77	33,70	0,092
	0,7 Ozon + UV 100	33,64	33,70	0,092
	0,7 Ozon + UV 200	35,08	35,21	0,184
	0,7 Ozon + UV 200	35,34	35,21	0,184
	0,7 Ozon + UV 300	36,08	36,07	0,016
	0,7 Ozon + UV 300	36,05	36,07	0,016
	NTC	37,54	37,54	0,000
Enterococci	0,7 Ozon + UV 0	32,29	32,08	0,294
	0,7 Ozon + UV 0	31,87	32,08	0,294
	0,7 Ozon + UV 100	33,35	33,59	0,337
	0,7 Ozon + UV 100	33,83	33,59	0,337
	0,7 Ozon + UV 200	33,21	33,18	0,041
	0,7 Ozon + UV 200	33,15	33,18	0,041
	0,7 Ozon + UV 300	33,42	33,52	0,141
	0,7 Ozon + UV 300	33,62	33,52	0,141
	NTC	N/A	0,00	0,000



Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	0,7 Ozon + UV 0	N/A	0,00	0,000
	0,7 Ozon + UV 0	N/A	0,00	0,000
	0,7 Ozon + UV 100	N/A	0,00	0,000
	0,7 Ozon + UV 100	N/A	0,00	0,000
	0,7 Ozon + UV 200	N/A	0,00	0,000
	0,7 Ozon + UV 200	N/A	0,00	0,000
	0,7 Ozon + UV 300	N/A	0,00	0,000
	0,7 Ozon + UV 300	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	0,7 Ozon + UV 0	30,57	30,57	0,000
	0,7 Ozon + UV 0	N/A	0,00	0,000
	0,7 Ozon + UV 100	31,60	31,52	0,102
	0,7 Ozon + UV 100	31,45	31,52	0,102
	0,7 Ozon + UV 200	31,28	31,25	0,042
	0,7 Ozon + UV 200	31,22	31,25	0,042
	0,7 Ozon + UV 300	31,24	31,24	0,006
	0,7 Ozon + UV 300	31,23	31,24	0,006
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>P. aeruginosa</i>	0,7 Ozon + UV 0	33,58	33,75	0,233
	0,7 Ozon + UV 0	33,91	33,75	0,233
	0,7 Ozon + UV 100	30,92	30,97	0,074
	0,7 Ozon + UV 100	31,02	30,97	0,074
	0,7 Ozon + UV 200	36,48	35,63	1,198
	0,7 Ozon + UV 200	34,78	35,63	1,198
	0,7 Ozon + UV 300	35,12	34,81	0,435
	0,7 Ozon + UV 300	34,51	34,81	0,435
	NTC	N/A	0,00	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	1,0 Ozon + UV 0	29,31	29,57	0,263
	1,0 Ozon + UV 0	29,84	29,57	0,263
	1,0 Ozon + UV 100	30,45	30,22	0,229
	1,0 Ozon + UV 100	29,98	30,21	0,229
	1,0 Ozon + UV 200	29,74	30,12	0,382
	1,0 Ozon + UV 200	30,50	30,12	0,382
	1,0 Ozon + UV 300	30,07	30,95	0,885
	1,0 Ozon + UV 300	31,84	30,00	0,885
	NTC	N/A	0,00	0,00
<i>vanA</i>	1,0 Ozon + UV 0	24,72	24,84	0,116
	1,0 Ozon + UV 0	24,95	24,84	0,116
	1,0 Ozon + UV 100	25,37	25,44	0,074
	1,0 Ozon + UV 100	25,51	25,44	0,074
	1,0 Ozon + UV 200	25,12	25,01	0,103
	1,0 Ozon + UV 200	24,91	25,01	0,103
	1,0 Ozon + UV 300	26,19	26,46	0,273
	1,0 Ozon + UV 300	26,74	26,46	0,273
	NTC	N/A	0,00	0,00
<i>ampC</i>	1,0 Ozon + UV 0	39,71	39,43	0,280
	1,0 Ozon + UV 0	39,15	39,43	0,280
	1,0 Ozon + UV 100	37,98	38,62	0,643
	1,0 Ozon + UV 100	39,27	38,62	0,643
	1,0 Ozon + UV 200	38,40	38,59	0,194
	1,0 Ozon + UV 200	38,79	38,59	0,194
	1,0 Ozon + UV 300	37,79	37,61	0,176
	1,0 Ozon + UV 300	37,44	37,61	0,176
	NTC	N/A	0,00	0,00
Enterococci	1,0 Ozon + UV 0	35,21	35,37	0,163
	1,0 Ozon + UV 0	35,54	35,37	0,163
	1,0 Ozon + UV 100	34,51	34,16	0,343
	1,0 Ozon + UV 100	33,82	34,16	0,343
	1,0 Ozon + UV 200	33,71	33,82	0,111
	1,0 Ozon + UV 200	33,93	33,82	0,111
	1,0 Ozon + UV 300	34,36	34,18	0,176
	1,0 Ozon + UV 300	34,00	34,18	0,176
	NTC	N/A	0,00	0,00

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	1,0 Ozon + UV 0	N/A	0,00	0,000
	1,0 Ozon + UV 0	N/A	0,00	0,000
	1,0 Ozon + UV 100	N/A	0,00	0,000
	1,0 Ozon + UV 100	N/A	0,00	0,000
	1,0 Ozon + UV 200	N/A	0,00	0,000
	1,0 Ozon + UV 200	N/A	0,00	0,000
	1,0 Ozon + UV 300	N/A	0,00	0,000
	1,0 Ozon + UV 300	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	1,0 Ozon + UV 0	34,09	34,48	0,393
	1,0 Ozon + UV 0	34,88	34,48	0,393
	1,0 Ozon + UV 100	32,43	32,51	0,082
	1,0 Ozon + UV 100	32,59	32,51	0,082
	1,0 Ozon + UV 200	32,05	32,14	0,093
	1,0 Ozon + UV 200	32,24	32,14	0,093
	1,0 Ozon + UV 300	31,97	32,12	0,154
	1,0 Ozon + UV 300	32,28	32,12	0,154
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>P. aeruginosa</i>	1,0 Ozon + UV 0	37,01	36,72	0,284
	1,0 Ozon + UV 0	36,44	36,72	0,284
	1,0 Ozon + UV 100	37,55	37,78	0,233
	1,0 Ozon + UV 100	38,02	37,78	0,233
	1,0 Ozon + UV 200	38,18	38,33	0,153
	1,0 Ozon + UV 200	38,49	38,33	0,153
	1,0 Ozon + UV 300	38,73	39,31	0,580
	1,0 Ozon + UV 300	39,89	39,31	0,580
	NTC	N/A	0,00	0,000

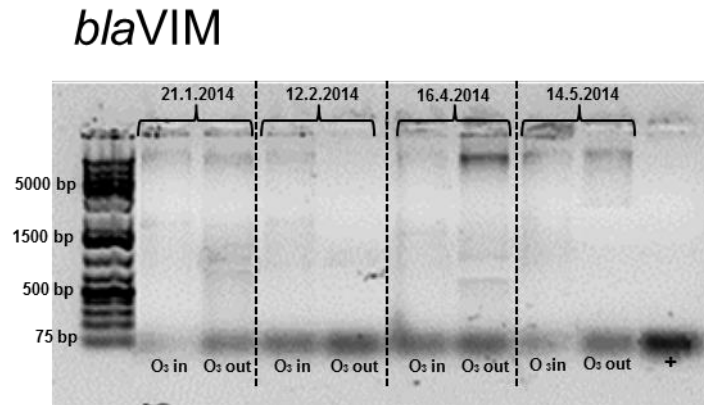
Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	1,5 Ozon + UV 0	31,04	30,70	0,479
	1,5 Ozon + UV 0	30,36	30,70	0,479
	1,5 Ozon + UV 100	25,53	25,68	0,212
	1,5 Ozon + UV 100	25,83	25,68	0,212
	1,5 Ozon + UV 200	31,08	31,52	0,626
	1,5 Ozon + UV 200	31,97	31,52	0,626
	1,5 Ozon + UV 300	33,18	32,61	0,795
	1,5 Ozon + UV 300	32,05	32,61	0,795
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	1,5 Ozon + UV 0	26,52	26,72	0,278
	1,5 Ozon + UV 0	26,92	26,72	0,278
	1,5 Ozon + UV 100	24,27	24,14	0,179
	1,5 Ozon + UV 100	24,01	24,14	0,179
	1,5 Ozon + UV 200	24,78	26,13	1,918
	1,5 Ozon + UV 200	27,49	26,13	1,918
	1,5 Ozon + UV 300	26,22	25,89	0,464
	1,5 Ozon + UV 300	25,56	25,89	0,464
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ampC</i>	1,5 Ozon + UV 0	35,47	35,07	0,573
	1,5 Ozon + UV 0	34,66	35,07	0,573
	1,5 Ozon + UV 100	31,99	31,57	0,596
	1,5 Ozon + UV 100	31,15	31,57	0,596
	1,5 Ozon + UV 200	34,57	34,72	0,203
	1,5 Ozon + UV 200	34,86	34,72	0,203
	1,5 Ozon + UV 300	38,25	39,07	1,158
	1,5 Ozon + UV 300	39,89	39,07	1,158
	NTC	N/A	0,00	0,000
Enterococci	1,5 Ozon + UV 0	35,86	37,62	2,485
	1,5 Ozon + UV 0	39,38	37,62	2,485
	1,5 Ozon + UV 100	N/A	0,00	0,000
	1,5 Ozon + UV 100	N/A	0,00	0,000
	1,5 Ozon + UV 200	34,15	33,94	0,300
	1,5 Ozon + UV 200	33,73	33,94	0,300
	1,5 Ozon + UV 300	31,87	31,76	0,155
	1,5 Ozon + UV 300	31,65	31,76	0,155
	NTC	N/A	0,00	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>mecA</i>	1,5 Ozon + UV 0	N/A	0,00	0,000
	1,5 Ozon + UV 0	N/A	0,00	0,000
	1,5 Ozon + UV 100	N/A	0,00	0,000
	1,5 Ozon + UV 100	N/A	0,00	0,000
	1,5 Ozon + UV 200	N/A	0,00	0,000
	1,5 Ozon + UV 200	N/A	0,00	0,000
	1,5 Ozon + UV 300	N/A	0,00	0,000
	1,5 Ozon + UV 300	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	1,5 Ozon + UV 0	35,12	35,30	0,255
	1,5 Ozon + UV 0	35,48	35,30	0,255
	1,5 Ozon + UV 100	35,18	35,66	0,687
	1,5 Ozon + UV 100	36,15	35,66	0,687
	1,5 Ozon + UV 200	32,48	32,36	0,169
	1,5 Ozon + UV 200	32,24	32,36	0,169
	1,5 Ozon + UV 300	30,16	30,19	0,042
	1,5 Ozon + UV 300	30,22	30,19	0,042
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>P. aeruginosa</i>	1,5 Ozon + UV 0	37,85	37,72	0,185
	1,5 Ozon + UV 0	37,59	37,72	0,185
	1,5 Ozon + UV 100	29,31	29,83	0,731
	1,5 Ozon + UV 100	30,35	29,83	0,731
	1,5 Ozon + UV 200	36,57	36,19	0,538
	1,5 Ozon + UV 200	35,81	36,19	0,538
	1,5 Ozon + UV 300	35,25	35,31	0,086
	1,5 Ozon + UV 300	35,37	35,31	0,086
	NTC	N/A	0,00	0,000

Gen	Probe	Ct-Wert	Ct-Mittelwert	Ct-Standardabweichung
<i>blaVIM</i>	UV 0	27,98	28,06	0,083
	UV 0	28,15	28,06	0,083
	UV 100	28,79	29,12	0,334
	UV 100	29,46	29,12	0,334
	UV 200	30,82	30,46	0,359
	UV 200	30,09	30,46	0,365
	UV 300	29,72	29,86	0,144
	UV 300	30,01	29,86	0,144
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>vanA</i>	UV 0	25,03	25,16	0,127
	UV 0	25,28	25,16	0,127
	UV 100	27,41	27,44	0,032
	UV 100	27,47	27,44	0,032
	UV 200	27,84	28,03	0,195
	UV 200	28,23	28,03	0,195
	UV 300	27,92	27,57	0,349
	UV 300	27,21	27,57	0,354
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ampC</i>	UV 0	30,42	30,03	0,390
	UV 0	29,64	30,03	0,390
	UV 100	29,72	29,86	0,135
	UV 100	29,99	29,86	0,135
	UV 200	29,12	30,22	1,105
	UV 200	31,33	30,22	1,105
	UV 300	29,92	29,93	0,014
	UV 300	29,95	29,93	0,014
	NTC	N/A	0,00	0,000
Enterococci	UV 0	22,63	22,69	0,056
	UV 0	22,74	22,69	0,056
	UV 100	22,89	23,12	0,226
	UV 100	23,34	23,12	0,226
	UV 200	24,21	24,07	0,131
	UV 200	23,94	24,07	0,131
	UV 300	23,31	23,46	0,146
	UV 300	23,46	23,46	0,146
	NTC	N/A	0,00	0,000

<b>Gen</b>	<b>Probe</b>	<b>Ct-Wert</b>	<b>Ct-Mittelwert</b>	<b>Ct-Standardabweichung</b>
<i>mecA</i>	UV 0	N/A	0,00	0,000
	UV 0	N/A	0,00	0,000
	UV 100	N/A	0,00	0,000
	UV 100	N/A	0,00	0,000
	UV 200	N/A	0,00	0,000
	UV 200	N/A	0,00	0,000
	UV 300	N/A	0,00	0,000
	UV 300	N/A	0,00	0,000
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>ermB</i>	UV 0	22,17	22,37	0,195
	UV 0	22,56	22,37	0,195
	UV 100	22,32	22,16	0,157
	UV 100	22,00	22,16	0,157
	UV 200	22,81	22,77	0,038
	UV 200	22,72	22,77	0,044
	UV 300	22,39	22,54	0,150
	UV 300	22,69	22,54	0,150
	NTC	N/A	0,00	0,000
<i>P. aeruginosa</i>	UV 0	33,12	33,27	0,155
	UV 0	33,43	33,27	0,155
	UV 100	34,02	33,89	0,129
	UV 100	33,75	33,89	0,134
	UV 200	33,74	33,93	0,187
	UV 200	34,11	33,93	0,187
	UV 300	34,71	34,52	0,190
	UV 300	34,33	34,52	0,190
	NTC	N/A	0,00	0,000

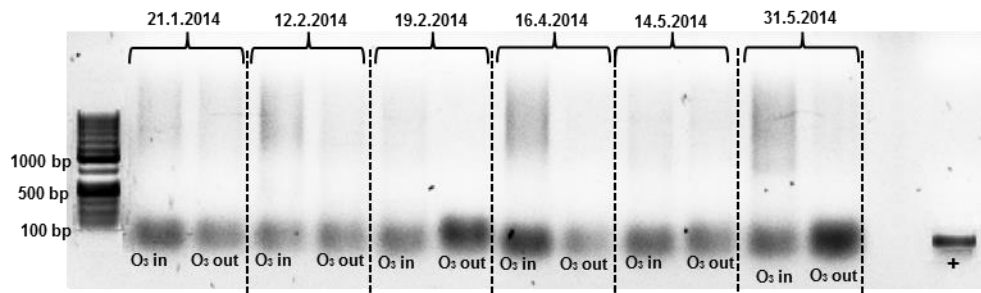
**Nachweis und Quantifizierung der Antibiotikaresistenzgene *vanA* und *blaVIM* über Standard PCR und anschließende Gel-Elektrophorese. Densitometrischen Quantifizierung (Light Units, LumiImager Working Station, Lumi Analyst Software)**



Probendatum	BLU	DNA-Konzentration (ng/ $\mu$ L)	Zelläquivalente pro 100ng DNA
13/14.5.	2269,9	24,2	11.272
	2824,5	17,9	109.165
10/11.5.	1337,6	49,4	1.168
	1830,7	14,9	2.300
11/12.2.	2101,4	13,8	8.919
	2415,7	10,2	53.243
15/16.4.	2274	36,7	7.578
	2317,4	16,8	20.320
18/19.2	2194,9	15,9	12.039
	2244,9	17,2	14.093
20/21.1.	1569,6	54,2	1.184
	2097,3	16,9	7.144



# vanA



Probendatum	BLU	DNA-Konzentration (ng/ $\mu$ L)	Zelläquivalente pro 100ng DNA
30/31.5.	2224,5	24,2	17.143
	2069,9	17,9	12.020
13/14.5.	1337,6	49,4	1.194
	1430,7	14,9	956
11/12.2.	2001,4	13,8	11.656
	2115,7	10,2	14.201
15/16.4.	2174	36,7	9.122
	2317,4	16,8	36.638
18/19.2	1994,9	15,9	9.841
	2244,9	17,2	26.303
20/21.1.	1569,6	54,2	474
	2097,3	16,9	14.303