

**Überwachung fakultativ pathogener Bakterien und der  
Antibiotika-Resistenzlage in Wässern aus Kläranlagen mit  
und ohne erweiterten Behandlungsverfahren und in  
abwasserbeeinflussten Umwelt-Kompartimenten**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

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

DISSERTATION

Von

M. Sc. Thomas Jäger  
aus Tiefenbronn

---

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Harald Horn

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christoph Syldatk

Drittgutachter: Prof. Dr. Thomas Schwartz

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 13 Absatz 2 Ziffer 4 der Promotionsordnung des  
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) für die KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und  
Verfahrenstechnik

Name            Thomas Jäger

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Überwachung fakultativ pathogener  
Bakterien und der Antibiotika-Resistenzlage in Wässern aus Kläranlagen mit und ohne  
erweiterten Behandlungsverfahren und in abwasserbeeinflussten Umwelt-Kompartimenten“  
handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner  
unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus  
anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder  
Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer  
unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und  
nichts verschwiegen habe.

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift

## Danksagung

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

Ich danke meinem/ meiner Zweitgutachter/-in für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Im Besonderen möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Schwartz für sein starkes Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit, seine Unterstützung bei der Erstellung von Publikationen und Präsentationen, sowie für seine hilfreichen Ratschläge und seine Geduld danken.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen für die freundliche Atmosphäre.  
Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich dem JPI Water, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und dem Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) am KIT Campus Nord.

Meiner Familie danke ich ganz herzlich für ihre liebevolle Unterstützung während meiner Promotion und ihrem steten Interesse an meiner Arbeit.

## Zusammenfassung

Ein Ziel dieser Arbeit war zum einen die Untersuchung und Verbesserung erweiterter Abwasserbehandlungstechnologien und/ oder deren Kombination mit biologischen Prozessen an einer lokalen Großkläranlage zur Minimierung von Mutationsraten, horizontalem Gentransfer und Antibiotikaresistenz-Selektion. Zu den Kriterien für die Auswahl der Technologien gehört u.a. auch die Eliminierung von fakultativ pathogenen Bakterien, ARGs und Schadstoffen. Es wurden verschiedene Abwasserbehandlungsoptionen betrachtet, die die mikrobiologische Belastung, insbesondere mit fakultativ pathogenen Bakterien im Ablauf von Kläranlagen reduzieren können, um eine angemessene Wasserqualität zu erreichen.

Da Ozon häufig zur Beseitigung chemischer Mikroverunreinigungen eingesetzt wird, konzentrierte sich diese Arbeit stark auf die Auswirkungen der Ozonbehandlung auf die Reduktion fakultativ pathogener Bakterien und auf die Verschiebung der mikrobiellen Abwasserpopulation. Molekularbiologische Analysen ergaben eine unterschiedliche Dynamik bei der Reduktion fakultativ pathogener Bakterien und ARGs durch die erweiterten Behandlungsmaßnahmen des biologisch gereinigten Abwassers.

Die Gesamtkeimbelastung und die Mehrzahl der klinisch relevanten Untersuchungsparameter wurden bei der Ozon- oder UV-Behandlung reduziert, aber nicht eliminiert. Hinsichtlich der absoluten Häufigkeit, auf der Basis des filtrierten Abwasservolumens, führte die UV-Behandlung zu geringen Reduktionswerten, während die Ozonbehandlung und die Kombination von Ozon und UV absolute Reduktionen von 70% bis unter die Nachweisgrenze zeigten. Darüber hinaus konnten fakultativ pathogene Bakterien und ARGs innerhalb der überlebenden Population, auf der Grundlage der extrahierten DNA, im Abwasser noch nachgewiesen werden und einige wiesen eine erhöhte relative Häufigkeit auf.

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Analysen zeigten daher verschiedene selektive Prozesse und spezifische Vermehrungsraten der Mikroorganismen auf der Grundlage ihrer Anfälligkeit für die Ozonbehandlung. Untersuchungen zur Wiederverkeimung zeigten, dass insbesondere *P. aeruginosa* nach dreitägiger Inkubation von ozoniertem Abwasser in der Populationszusammensetzung dominierte. Daher ist eine Kombination verschiedener methodischer Ansätze erforderlich, um die mikrobielle Abwasserqualität umfassend zu bewerten und angepasste Standardrichtlinien zu erstellen, die auch langfristige Effekte berücksichtigen.

Immunologische Untersuchungen der innovativen Technologien zeigten, dass UV-Licht zu chemischen Veränderungen, einschließlich Pyrimidin-Dimere, sowie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und Pyrimidin-Pyrimidin (6-4)-Photoprodukte führte. Diese mutagenen Läsionen verändern die Struktur der DNA und hemmen die Polymerasen und stoppen die Replikation. Diese DNA-Läsionen traten nur nach einer UV-Behandlung auf, nicht aber nach einer Ozon- oder Kombinationsbehandlung aus Ozon und UV.

Die Belastungssituationen im regionalen Bereich zeigten, dass Antibiotikaresistenzgene und fakultativ pathogene Bakterien in Oberflächengewässern nachweisbar waren und dass die gemessenen Häufigkeiten je nach Art des Oberflächenwassers, wie z.B. Fließgewässer oder Seen, variieren. Ebenso konnten die als besonders kritisch einzustufenden Resistenzgene, je nach Standort, in geringen Häufigkeiten nachgewiesen werden. Deutlich wurden jedoch die Auswirkungen der Kläranlagen auf die Abwasser aufnehmenden Gewässer. So konnte eine geringere Belastung oberhalb der Einleitungsstelle der Kläranlage und eine Erhöhung der Belastung unterhalb der Einleitungsstelle der Kläranlage beobachtet werden. Darüber hinaus wies die untersuchte Kläranlage im urbanen Gebiet eine höhere Belastungssituation auf als die Kläranlage im ländlich geprägten Gebiet. So waren im Ablauf der ländlichen Kläranlage 3 von 6 Parametern der fakultativ pathogenen Bakterien und keines der 6 als kritisch einzustufenden Antibiotikaresistenzgene nachweisbar. Im Auslauf der städtischen Kläranlage konnten alle 6 Parameter der fakultativ pathogenen Bakterien und alle 6 als kritisch einzustufenden Antibiotikaresistenzgene nachgewiesen werden. Diese unterschiedlichen Belastungen im Ablauf der Kläranlagen spiegeln sich auch im Vorfluter wider. Es besteht daher Handlungsbedarf in den jeweiligen Kläranlagen. Ein Vergleich von Fließgewässern zeigte auch, dass die Grundbelastung im ländlichen Gebiet geringer ist als im städtischen Gebiet. Die zusätzlichen Multiresistenzstudien vervollständigen das Bild und wiesen auf eine häufigere Verteilung von 3 MRGN und vereinzelt auch 4 MRGN in den analysierten Wassersystemen hin.

## Abstract

One objective of this work was the development of concepts to evaluate and improve advanced wastewater treatment technologies and/or their combination with biological processes on a local wastewater treatment plant (WWTP) to be implemented in critical points (e.g., WWTP, hospital effluents) to minimize mutation rates, horizontal gene transfer, and AR selection. The criteria for the selection of the technologies also includes the elimination of other emerging contaminants and pathogens. Several wastewater treatment options are discussed for their capability to reduce the microbiological load especially with facultative pathogens in the final effluent of wastewater treatment plants (WWTP) to achieve an adequate water quality. Still, a coherent assessment concept is missing to prove the success of reduction efficiency of microbial parameters. This is concerning the choice of technical operations as well as the evaluation of their introduction.

Since ozone is frequently used to remove chemical micro-pollutants, this work tightly focuses on the impact of ozone treatment on the reduction of facultative pathogens as well as the shifts in microbial communities are of specific interest. Molecular biology analyses revealed different dynamics of facultative pathogens and ARGs by the advanced treatments of conventionally treated wastewater.

The overall bacterial load and the majority of other clinically relevant bacterial targets were reduced during ozone or UV treatment, but not eliminated. Regarding the absolute abundance based on volume, UV treatment led to minor reduction values, whereas ozone treatment and the combination of ozone and UV showed absolute reductions ranging from 70% up to the detection limit. Furthermore, the relative abundance within the surviving population based on extracted DNA, showed that antibiotic resistance genes were also present in the effluents under the adjusted parameters and some exhibited an increased relative abundance.

Hence, results from molecular biology analyses indicated different selective processes and specific recovery rates of microorganisms based on their susceptibility towards the ozone treatment. Regrowth experiments showed, that especially *P. aeruginosa* dominated in the population composition after three days of incubation of ozonated wastewater. Thus, a combination of different methodological setups is needed to evaluate microbial wastewater qualities and to generate adjusted standard guidelines considering also long-term effects.

Regarding the DNA, UV light led to chemical alterations including pyrimidine dimers, as well as cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine-pyrimidine (6-4) photoproducts. These mutagenic lesions alter the structure of the DNA and inhibit polymerases and arrest the

replication. These lesions weren't found after ozonation or the combination of ozone and UV treatment.

When considering the regional measurements, it can be stated that antibiotic resistance genes and facultative pathogenic bacteria were detectable in surface waters and that, depending on the type of surface water, such as running waters or lakes, the measured abundances vary. Likewise, the resistance genes, which are to be classified as particularly critical, could be detected in low abundances depending on the location. However, the impact of the wastewater treatment plants on adjacent water bodies became clear. Thus, a lower load above the discharge point of the WWTP and an increase in the load below the discharge point of the wastewater treatment plant could be observed. The investigated WWTP in urban areas showed a higher load situation than the wastewater treatment plant in rural areas. Thus, 3 of 6 parameters of facultative pathogenic bacteria and none of the 6 antibiotic resistance genes, which are to be classified as critical, were detectable in the outlet of the rural WWTP. In the outlet of the urban WWTP all 6 parameters of the facultative pathogenic bacteria and all 6 antibiotic resistance genes classified as critical could be detected. Furthermore, these different load situations in the effluents of the WWTPs are reflected in the receiving water body. Therefore, there is a need for action at the respective wastewater treatment plants. A comparison of running waters also showed that the basic pollution in rural areas was lower than in urban areas. The additional multi-resistance studies completed the picture and indicated a more frequent distribution of 3 MRGN and occasionally also 4 MRGN in the analyzed water systems.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Ursachen der Resistenzentwicklung .....	1
1.2. Auswirkungen des Antibiotikaverbrauchs auf die Resistenzlage .....	1
1.3. Die allgemeine Bedeutung der Problematik der Antibiotika-Resistenz .....	3
1.4. Kläranlagen als „HotSpots“ der bakteriellen Resistenzentwicklung .....	7
1.5. Möglichkeiten der Überwachung der aktuellen Resistenzlage in Kläranlagen .....	10
1.6. Methoden zur Elimination von Antibiotika resistenten Bakterien und Antibiotika Resistenzgenen in Kläranlagen .....	11
1.6.1. Das Ozonverfahren .....	14
1.6.2. Das UV-Verfahren .....	16
1.6.3. Das Photo-Fenton-Verfahren .....	17
1.6.4. Das TiO <sub>2</sub> -Photokatalyse Verfahren .....	17
1.7. Reparaturmechanismen nach innovativen Abwassertechnologien .....	18
1.8. Motivation dieser Arbeit .....	19
2. Material und Methoden .....	22
2.1. Probenaufbereitung .....	22
2.2. Untersuchungen zum Wiederverkeimungspotential .....	22
2.3. Kultur-basierte Untersuchungsmethoden .....	22
2.4. Untersuchungen zur Multiresistenz bei Gram-negativen Bakterien .....	23
2.5. Lebend/ Tot-Diskriminierung mittels Propidiummonoazid (PMA) .....	24
2.6. Durchführung der DNA-Extraktion .....	25
2.7. Molekularbiologische Untersuchungen .....	25
2.7.1. Quantifizierung der Belastungssituationen mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) .....	25
2.8. Populationsanalysen mittels einer Illumina Shotgun Metagenomdatenanalyse .....	33
2.9. Antikörper basiertes Nachweissystem zur Detektion unterschiedlicher DNA Schäden .....	34
3. Ergebnisse .....	36
3.1. Lokale Untersuchungen an einer Großkläranlage .....	36
3.2. Die Belastungssituation mit fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs nach der mechanischen Abwasseraufbereitung .....	38
3.2.1. Absolute Quantifizierung von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung .....	38

3.2.2.	Relative Häufigkeiten von ARB und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung .....	41
3.3.	Die Belastungssituation mit fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs nach der biologischen Abwasseraufbereitung .....	43
3.3.1.	Bestimmung absoluter Häufigkeiten der fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung .....	43
3.3.2.	Quantifizierung relativer Häufigkeiten von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung .....	46
3.3.3.	Betrachtung der Belastungssituationen während eines kompletten konventionellen Reinigungsprozesses an der lokalen Kläranlage.....	48
3.4.	Die Belastungssituation mit fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs nach einer Ozonbehandlung.....	51
3.4.1.	Bestimmung absoluter Häufigkeiten von ARB und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung.....	51
3.4.2.	Quantifizierung relativer Häufigkeiten von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung .....	54
3.4.3.	Untersuchungen weiterer Abwasserbehandlungstechniken durch Kombination unterschiedlicher erweiterter Verfahrenstechniken .....	57
3.5.	Auswirkungen erweiterter Abwasserbehandlungstechnologien auf die bakterielle DNA .....	60
3.6.	Metagenom-Untersuchungen zu den Auswirkungen von Ozon auf die bakterielle Abwasserpopulation .....	62
3.7.	Wiederverkeimungspotentials der Abwasserpopulation nach einer Ozon-Behandlung.....	67
3.7.1.	Wiederverkeimungspotential und Populationsveränderungen nach der Ozonbehandlung anhand von Metagenomanalysen.....	69
3.8.	Regional unterschiedlich geprägte Siedlungsgebiete und das Auftreten von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs in abwasserbeeinflussten Systemen ...	71
3.8.1	Einfluss von Kläranlagen auf das aufnehmende Gewässer .....	71
3.8.2	Auswirkungen der Abwassereinleitung in unterschiedlich geprägten Siedlungsgebieten anhand Kultur-basierter Untersuchungen .....	76
3.8.3	Auftreten von mehrfach resistenten Bakterien in den verschiedenen Siedlungsgebieten .....	76
4.	Europa-weite Untersuchungen zur Belastung von Aufbereitetem Abwasser aus Kläranlagen mit Antibiotika-resistenten Bakterien und Antibiotikarückständen .....	79
5.	Diskussion.....	87
6.	Literaturverzeichnis .....	97
7.	Anhang .....	114
7.1.	Absolute Häufigkeiten der ARB während der unterschiedlichen Reinigungsstufen einer Großkläranlage .....	114

7.2.	Absolute Häufigkeiten der ARGs während der unterschiedlichen Reinigungsstufen einer Großkläranlage .....	116
7.3.	Relative Häufigkeiten der ARB während der unterschiedlichen Reinigungsstufen einer Großkläranlage .....	119
7.4.	Relative Häufigkeiten der ARGs während der unterschiedlichen Reinigungsstufen einer Großkläranlage .....	121
7.5.	Auswirkungen der biologischen Abwasseraufbereitung auf die bakterielle Population .....	124
7.6.	Auswirkungen der Ozonbehandlung auf die bakterielle Abwasserpopulation .....	125
7.7.	Reduktionseffizienzen innovativer Abwasserbehandlungstechniken .....	126
7.8.	Wiederverkeimungspotential nach der biologischen Aufbereitung anhand absoluter und relativer Häufigkeiten.....	127
7.9.	Wiederverkeimungspotential nach der Ozonung anhand von Populationsanalysen ..	128
7.10.	Auftreten von ARB und ARGs in abwasserbeeinflussten aquatischen Systemen im urbanen Siedlungsgebiet.....	129
7.11.	Auftreten von ARB und ARGs in abwasserbeeinflussten aquatischen Systemen im ländlichen Siedlungsgebiet .....	130
7.12.	Kultur-basierte Untersuchungen des Kläranlageneinflusses im urbanen Siedlungsgebiet.....	132
7.13.	Kultur-basierte Untersuchungen des Kläranlageneinflusses im ländlich geprägten Siedlungsgebiet.....	132

## Abkürzungsverzeichnis

6-4-PP	6-4-Photoprodukt
AMR	antimicrobial resistance, Antimikrobielle Resistenz
ARB	Antibiotic resistant bacteria, Antibiotika resistente Bakterien
ARG	Antibiotic resistance gene, Antibiotika-Resistenzgen
BD	Becton Dickinson
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CAZ	Ceftazidim
C-C	Kohlenstoffbindung
CIP	Ciprofloxacin
Cl <sub>2</sub>	Chlor
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan-4-yl) phenyl phosphate; chemiluminescent alkaline phosphatase substrate for protein or nucleic acid blotting on nitrocellulose membranes
CTX	Cefotaxime
Da	Dalton
DDD	defined daily dose, definierte Tagesdosis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DOC	disolved organic carbon, gelöster organischer Kohlenstoff
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	Extended-spectrum $\beta$ -lactamases, erweitertes Spektrum an $\beta$ -Laktamasen
EU	Europäische Union
EWR	Europäischer Wirtschaftsraum
Fe	Eisen
G	Guanin

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
HAC	High Antibiotic consumption, hoher Antibiotikaverbrauch
HGT	Horizontaler Gentransfer
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IMI	Imipenem
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KLA	Kläranlage
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
LAC	Low antibiotic consumption, niedriger Antibiotikaverbrauch
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LEV	Levofloxacin
LOD	Limit of Detection, Detektionslimit
MDR	Multidrug resistant, Mehrfach resistent
MEM	Meropenem
mENT	Membran geeigneter Enterokokken Agar
mFC	Membran geeigneter Fäkaler Coliformen Agar
MGE	Mobile genetische Elemente
MH	Müller Hinton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
Mn	Mangan
MRGN	Multiresistente Gram-negative
MRSA	Methicillin-resistente S. aureus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
ND	nicht detektiert
NKB	Nachklärbecken
NTC	no template control

PC Membran	Polycarbonat-Membran
PCoA	Principal Component Analysis, Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PMA	Propidiummonoazid
PRL	Piperacillin
PTZ	Piperacillin/Tazobactam
qPCR	quantitative PCR
recA	Gen für Rekombinase A
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
TBS-Puffer	<i>Tris-buffered saline Puffer</i>
TEM	Temocillin
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
Tris/HCl Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/ Hydrochlorid Puffer
TrisHCl	TRIS Hydrochlorid
TTBS	TBS-Puffer mit Tween 20
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
VBNC	Viable but not cultivable
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
XDR	extensively drug-resistant, äußerst resistent
ZVK	Zweckverband Klärwerk

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chronologische Darstellung der Entwicklung und Markteinführung unterschiedlicher Antibiotika und die Detektion des ersten resistenten Bakteriums gegen das entsprechende Antibiotikum.....	4
Abbildung 2: Darstellung der Antibiotikaverbrauchsanteile in Deutschland .....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Zuläufe, die zu diversen Belastungssituationen an Kläranlagen beitragen und mögliche Verbreitungswege des geklärten Abwassers.....	8
Abbildung 4: Zusammenfassung und Überblick über die Häufigkeiten der ARGs aus 18 Studien, die in Zufluss- und Abflussproben konventioneller Kläranlagen nachgewiesen wurden.....	12
Abbildung 5: Potentielle innovative Abwasserbehandlungen basierend auf unterschiedlichen Oxidationsprozessen.....	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Probenahmestellen für die lokalen Untersuchungen an der Großkläranlage.....	38
Abbildung 7: Belastungssituationen im Ablauf der mechanischen Reinigung .....	41
Abbildung 8: Belastungssituationen im Ablauf des Nachklärbeckens.....	46
Abbildung 9: Darstellung der qPCR-Analysen von taxonomischen und Antibiotikaresistenz-Markern während der konventionellen Abwasserbehandlung einer lokale, kommunalen Großkläranlage .....	50
Abbildung 10: Belastungssituationen im Ablauf der Ozonbehandlung .....	53
Abbildung 11: Darstellung der qPCR-Analysen von taxonomischen und Antibiotikaresistenz-Markern in mit innovativen Maßnahmen behandelten Abwasserproben einer kommunalen Kläranlage.....	57
Abbildung 12: Detektion der Cyclobutan-Pyrimidin Dimere und der 6-4 Photoprodukte nach innovativen Behandlungstechnologien.....	61
Abbildung 13: Populationsanalysen des Ablaufs des Nachklärbeckens und dem Ablauf der Ozonung mit und ohne Lebend/Tot-Diskriminierung mittels Illumina HiSeq Sequenzierung. ....	64
Abbildung 14: Wiederverkeimungspotential im Ablauf der Ozonbehandlung .....	69
Abbildung 15: PCoA Darstellung der Metagenomanalysen.....	70
Abbildung 16: Darstellung des Einflusses der Kläranlage auf das aufnehmende Gewässer anhand einzelner ausgewählter Parameter.....	72
Abbildung 17: Darstellung ausgewählter Parameter der unterschiedlichen Kläranlagenausläufen, entsprechend der Art des Siedlungsgebiets.....	74
Abbildung 18: Darstellung ausgewählter Parameter von kläranlagenbeeinflussten Gewässern .....	75
Abbildung 19: Relative Genhäufigkeiten, der Zulaufproben von Ländern mit hohem und niedrigem Antibiotikakonsum.....	82
Abbildung 20: Vergleich der durchschnittlichen relativen Häufigkeit der ARGs im Zufluss und im Ablauf für die Klassen mit signifikant unterschiedlichen Werten .....	83
Abbildung 21: Wiederverkeimungspotential im Ablauf des Nachklärbeckens .....	127
Abbildung 22: Populationszusammensetzung und Auswirkungen des Wiederverkeimungspotentials 72h nach einer Ozonbehandlung mittels einer Metagenomanalyse.....	128
Abbildung 23: Mikrobiologischen Untersuchungen im Bereich der urban geprägten Kläranlage.....	132

Abbildung 24: Mikrobiologischen Untersuchungen im Bereich der ländlich geprägten Kläranlage..... 132

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste klinisch relevanter fakultativ pathogener Bakterien.....	2
Tabelle 2: Auflistung des prozentualen Anteils der Ausgangssubstanz, welche nach Durchgang durch den Patienten unverändert im Urin ausgeschieden wird .....	9
Tabelle 3: Auflistung der für die KRINKO relevanten getesteten Antibiotika im Multiresistenztest .....	24
Tabelle 4: Standardthermoprofil für die Untersuchungsparameter der qPCR Analysen aller Primersysteme .....	27
Tabelle 5: Thermoprofil für der Untersuchungsparameter bla <sub>VIM2</sub> .....	27
Tabelle 6: Molekularbiologische Untersuchungsparameter zur Detektion von fakultativ pathogenen Bakterien.....	28
Tabelle 7: Molekularbiologische Nachweissysteme für die untersuchten, häufig vorkommenden Antibiotika-Resistenzgenen .....	29
Tabelle 8: Molekularbiologische Nachweissysteme für die untersuchten, intermediär vorkommenden Antibiotika-Resistenzgenen .....	29
Tabelle 9: Molekularbiologische Nachweissysteme für die untersuchten, selten vorkommenden und als besonders kritisch zu wertende Antibiotika-Resistenzgenen .....	30
Tabelle 10: Geradengleichungen aller Untersuchungsparameter zur Berechnung der Zelläquivalente .....	31
Tabelle 11: Auflistung der untersuchten Probenahmestellen .....	38
Tabelle 12: Multiresistenzanalysen im urban und ländlich geprägten Raum.....	78
Tabelle 13: Konzentrationen (ng/L) der 17 Antibiotika, die in den Proben aus den 13 Kläranlagen nachgewiesen wurden.....	86
Tabelle 14: Molekularbiologische Untersuchungen der absoluten Häufigkeiten von fakultativ pathogener Bakterien nach verschiedenen Abwasserbehandlungstechnologien und die Auswirkungen 72h nach der Behandlung anhand von qPCR-Analysen.....	114
Tabelle 15: Maximale und minimale Abweichungen der absoluten Häufigkeiten der taxonomischen Parameter der unterschiedlichen Abwasserbehandlungstechnologien der Großkläranlage. ....	115
Tabelle 16: Molekularbiologische Untersuchungen der absoluten Häufigkeiten der Antibiotika-Resistenzgene nach verschiedenen Abwasserbehandlungstechnologien und die Auswirkungen 72h nach der Behandlung anhand von qPCR-Analysen.....	116
Tabelle 17: Maximale und minimale Abweichungen der absoluten Häufigkeiten der untersuchten Resistenzgene der unterschiedlichen Verfahrenstechniken der Großkläranlage. ....	117
Tabelle 18: Molekularbiologische Untersuchungen der relativen Häufigkeiten der fakultativ pathogener Bakterien nach verschiedenen Abwasserbehandlungstechnologien und die Auswirkungen 72h nach der Behandlung anhand von qPCR-Analysen.....	119
Tabelle 19: Maximale und minimale Abweichungen der relativen Häufigkeiten der taxonomischen Parameter der unterschiedlichen Reinigungsstufen der Großkläranlage. ....	120
Tabelle 20: Molekularbiologische Untersuchungen der relativen Häufigkeiten der Antibiotika-Resistenzgene nach verschiedenen Abwasserbehandlungstechnologien und die Auswirkungen 72h nach der Behandlung anhand von qPCR-Analysen.....	121
Tabelle 21: Maximale und minimale Abweichungen der relativen Häufigkeiten der untersuchten Resistenzgene der unterschiedlichen Reinigungsstufen der Großkläranlage. ....	122
Tabelle 22: Lebend-/Gesamtverhältnis der im Auslauf des Nachklärbeckens (NKB) vorhandenen Gattungen.....	124

Tabelle 23: Lebend-/Gesamtverhältnis der im Auslauf der Ozonanlage vorhandenen Gattungen .....	125
Tabelle 24: Reduktionseffizienten der innovativen Abwasserbehandlungstechnologien auf taxonomische und Antibiotika-Resistenz Markergene.....	126
Tabelle 25: Auswertung der molekularbiologischen Untersuchungen im urban geprägten Siedlungsgebiet.....	129
Tabelle 26: Auswertung der molekularbiologischen Untersuchungen im ländlich geprägten Siedlungsgebiet.....	130
Tabelle 27: Belastungssituation während des Klärprozesses und Erfassung des Wiederverkeimungspotentials anhand Kultur-basierter Nachweismethoden.....	131

# 1. Einleitung

## 1.1. Ursachen der Resistenzevolution

Auf der Welt existieren ca.  $5 \times 10^{30}$  Bakterien, von denen ein Großteil nicht pathogen ist. Während der Evolutionsgeschichte haben Bakterien die Fähigkeit erworben, bioaktive Moleküle u.a. auch Antibiotika zu produzieren, die in einem Fitnessvorteil gegenüber anderen Bakterien resultieren können. Parallel konnten sich im Laufe der Evolution auch eine Vielzahl an verschiedenen Resistenzmechanismen etablieren (Finley *et al.*, 2013, Gaze *et al.*, 2013, Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013). Beispielsweise besteht ein Resistenzmechanismus darin, dass es zu einer, durch die Antibiotika ausgelösten, erhöhten Mutationsrate kommt (sog. mutators), welche durch unterschiedliche Veränderungen während der Mismatch-Reparatur verursacht werden (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013). Dabei ist es auch möglich, dass Gene übertragen werden, welche nicht direkt mit dem verwendeten Antibiotikum in Verbindung gebracht werden können, u.a. durch die Lokalisierung der Gene auf demselben mobilen genetischen Element (Gaze *et al.*, 2013). Dadurch besteht die Gefahr der Übertragung mehrerer resistenzbildender Gene, was dazu führen kann, dass mehrere Resistenzen gleichzeitig bei Bakterien vorhanden sein können (multidrug resistant bacteria, MDR). Wiederum andere Antibiotika lösen bei Bakterien erhöhte Mutationsraten durch das Hervorrufen oxidativer Schäden, das Auslösen der SOS-Antwort, die Umverteilung des Nukleotid-Pools oder auch generellen Stressantworten aus (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013). Des Weiteren kann die Produktion radikaler Sauerstoffspezies (radical oxygen species, ROS) Schäden auf zellulärer Ebene herbeiführen und Proteine, Lipide, aber auch die DNA schädigen. Dies hat wiederum die Aktivierung der SOS-Antwort zur Folge, wodurch es zu einer gesteigerten Expression spezieller Polymerasen kommt, welche unspezifisch über DNA-Schäden hinweglesen und dadurch die Mutationsrate erhöhen. Eine weitere wichtige Rolle beim Erwerb von Resistenzgenen spielt der horizontale Gentransfer (HGT) (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013).

So besteht die Gefahr, dass es durch den anthropogenen Einfluss zu Übertragungen von Resistenzen in klinisch relevante Pathogene kommt. Um dem entgegen zu wirken, müssen Verbesserungen im Abfall- und Abwassermanagement gemacht werden, besonders im Hinblick auf Antibiotika-Rückstände und Antibiotika resistente Bakterien (ARB). Hierfür ist ein „OneHealth“ Ansatz nötig, der die unterschiedlichen Bereiche zusammenführt, um gemeinsam nach einer effektiven Lösung für die Verhinderung der Verbreitung und Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen zu suchen (Finley *et al.*, 2013).

## 1.2. Auswirkungen des Antibiotikaverbrauchs auf die Resistenzlage

Allgemein berichtet die ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) in ihrem „AMR surveillance“ Bericht aus dem Jahr 2018 von einer sehr diversen antimikrobiellen

Resistenzlage in Europa (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018). Dabei werden u.a. die der ESKAPE-Gruppe zugeordneten Bakterien betrachtet, zu denen *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* spp. gehören. Diese sind in Krankenhäusern immer häufiger anzutreffen und weisen zunehmend Resistenzen gegen viele antimikrobielle Substanzen auf (Rice, 2008). Auch die WHO hat eine Liste mit solchen Risikobakterien erstellt, die u.a. auch die ESKAPE-Gruppe umfasst (Tacconelli *et al.*, 2017) (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Liste klinisch relevanter fakultativ pathogener Bakterien. Gezeigt ist die priorisierte Auswahl Antibiotika resistenter Bakterien der WHO, die dazu dienen soll, die Forschung und Entwicklung neuer und wirksamer Antibiotika-Behandlungen entsprechend den Vorgaben zu forcieren (Tacconelli *et al.*, 2017).**

<b>Priorität 1</b>	<b>KRITISCH</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem resistent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenem resistent
<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenem resistent, ESBL-Produzent
<b>Priorität 2</b>	<b>HOCH</b>
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomycin resistent
<i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin resistent, Vancomycin-resistent
<i>Helicobacter pylori</i>	Clarithromycin resistent
<i>Campylobacter</i> spp.	Fluoroquinolon resistent
<i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolon resistent
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cephalosporin resistent, Fluoroquinolon resistent
<b>Priorität 3</b>	<b>MITTEL</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicillin unempfindlich
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicillin resistent
<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolon resistent

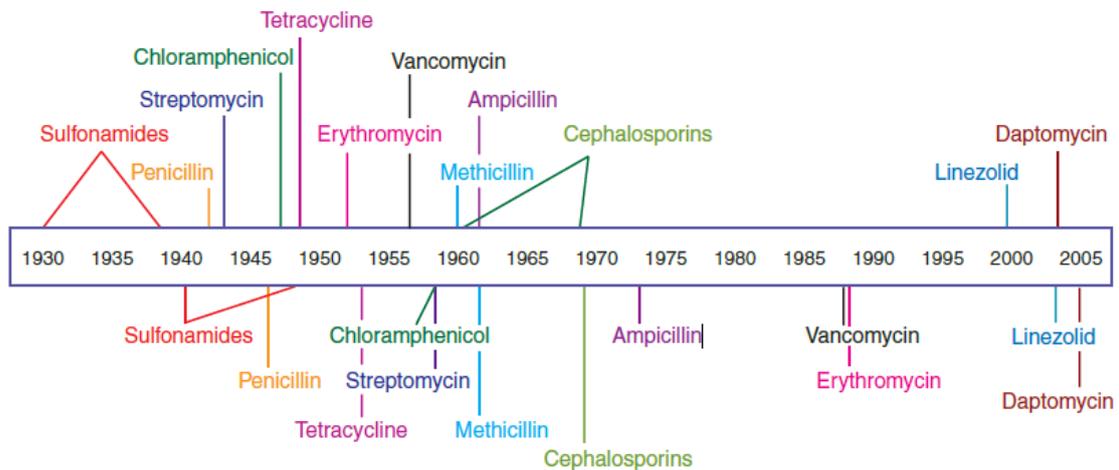
Bei der Resistenzentwicklung spielen unter anderem die Bakterienspezies, als auch die am häufigsten verwendeten Antibiotika-Klassen eine entscheidende Rolle. Dadurch lässt sich durch die geographische Lage u.a. ein Nord-Süd, als auch einem West-Ost-Gefälle aufzeigen.

Im Jahr 2018 waren 58,3% der gemeldeten *E. coli* Isolate und 37,2% der *K. pneumoniae* Isolate gegen mindestens eine antimikrobielle Gruppe resistent. Resistenzen gegen mehrere antimikrobielle Gruppen traten häufig auf. Bei den meisten Kombinationen aus Gram-negativen Bakterienarten und antimikrobiellen Gruppen waren die Veränderungen der Resistenzprozentsätze zwischen 2015 und 2018 moderat. Im Fall von *Streptococcus pneumoniae* zeigte sich eine stabile Resistenzsituation, jedoch mit großen länderübergreifenden Schwankungen. Bei *S. aureus* setzte sich der in den Vorjahren gemeldete Rückgang des Prozentsatzes der Methicillin-resistenten (MRSA) Isolate im Jahr 2018 fort. Aufgrund des immer noch hohen Aufkommens von MRSA in mehreren Ländern, sowie dem häufigen Auftreten von kombinierten Resistenzen gegen andere antimikrobielle Gruppen bleibt MRSA ein wichtiger Erreger in der EU/EWR. Eine besonders besorgniserregende Entwicklung war der Anstieg des bevölkerungsgewichteten Durchschnittsprozentsatzes für Vancomycin-resistente *E. faecium* (VRE) von 10,5% im Jahr 2015 auf 17,3% im Jahr 2018. Eben diese Entwicklungen unterstreichen die Notwendigkeit einer genauen Überwachung. Die für 2018 gesammelten Daten zeigen, dass die antimikrobielle Resistenz (AMR) nach wie vor eine ernsthafte Herausforderung darstellt. Trotz der politischen Priorisierung von Antibiotika-Resistenz als Bedrohung für die öffentliche Gesundheit ist klar, dass die Maßnahmen der öffentlichen Gesundheit zur Bewältigung der Situation nach wie vor unzureichend sind. Desweiteren ist es von größter Wichtigkeit, dass eine direkte und effektive Behandlung von Infektionen mit Antibiotika weiterhin gewährleistet werden kann (Bell *et al.*, 2014, European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

### **1.3. Die allgemeine Bedeutung der Problematik der Antibiotika-Resistenz**

Durch den massiven Einsatz von Antibiotika im medizinischen Bereich, sowie in der Veterinärmedizin und der Landwirtschaft, hat sich die Problematik der Resistenzentwicklung zu einem länderübergreifenden Problem entwickelt. Auch die World Health Organization (WHO) beschreibt das Auftreten und die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen als globale Herausforderung, was verstärkt zu einem Problem im Gesundheitswesen heranwachsen kann (European Centre for Disease Prevention and Control, 2009, World Health Organization, 2014, World Health Organization, 2018). Verschlimmert wird dieser Prozess durch die rückläufige Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe und der teilweise schnellen Resistenzbildung durch die Bakterien (Clatworthy *et al.*, 2007, European Centre for Disease Prevention and Control, 2009, Alexander *et al.*, 2015, Alexander *et al.*, 2016, Hembach *et al.*, 2017, Jäger *et al.*, 2018a) (Abbildung 1).

## Antibiotic deployment

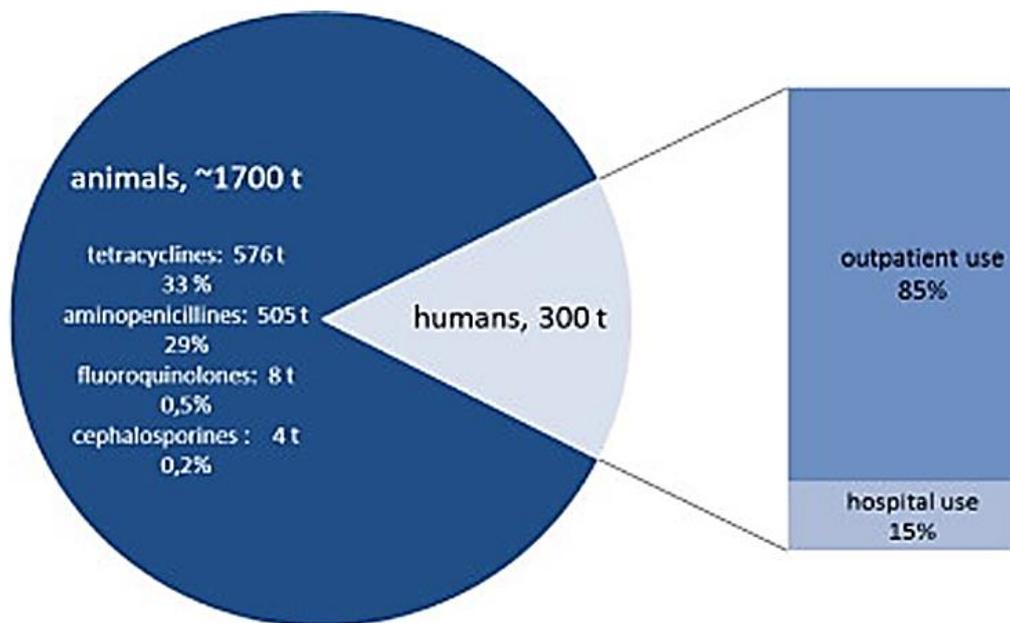


## Antibiotic resistance observed

**Abbildung 1: Chronologische Darstellung der Entwicklung und Markteinführung unterschiedlicher Antibiotika (oben) und die Detektion des ersten resistenten Bakteriums gegen das entsprechende Antibiotikum (unten) (Clatworthy *et al.*, 2007).**

In einer Veröffentlichung von Bell *et al.*, 2014 wird darauf hingewiesen, dass bakterielle Infektionen langfristig behandelbar bleiben müssen. In der Studie konnte ein Zusammenhang zwischen dem Antibiotika-Verbrauch in der europäischen Bevölkerung und der Resistenzentwicklung bei Bakterien festgestellt werden. Hierfür wurden 243 Studien analysiert, von denen  $\frac{2}{3}$  eine positive Korrelation zwischen Antibiotika-Verbrauch und – Resistenz zeigten. Größtenteils lag der Fokus der analysierten Studien auf den Bakterien *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* und Enterobakterien (z.B. *E. coli*). Bei den Antibiotika zählten  $\beta$ -Laktam Antibiotika, Makrolide, Sulfonamide und Quinolone zu den am häufigsten untersuchten Gruppen (Bell *et al.*, 2014). In der Publikation konnte neben einer positiven Korrelation des Tetracyclin Verbrauchs und Tetracyclin-resistenter *S. pneumoniae* auch eine positive Korrelation im Fall der Resistenzlage und des Quinolon Verbrauchs hergestellt werden. Weitere Korrelationsanalysen mit demographischen oder geographischen Parametern zeigten im Fall des Antibiotika-Verbrauchs und der damit verbundenen Resistenzentwicklung nur geographische Korrelationen. Für die demographischen Parameter konnte keine Korrelation mit einzelnen Bevölkerungsschichten nachgewiesen werden. Die geographischen Parameter zeigten bei südeuropäischen Ländern eine deutlich stärkere positive Korrelation zwischen Antibiotika-Verbrauch und Resistenzentwicklung. Um eine rückläufige Resistenzentwicklung zu erzielen, appellieren die Autoren für einen gewissenhaften Umgang mit Antibiotika. So hoffen sie, dass es durch die Reduktion der Quinolon-Behandlung bei *E. coli* Infektionen zu einem entsprechenden Resistenzrückgang kommen könnte (Bell *et al.*, 2014).

Jedoch werden Antibiotika nicht nur im medizinischen Bereich eingesetzt. Auch in der Landwirtschaft, in Aquakulturen und in unterschiedlichen Industriezweigen (z.B. Pharmaindustrie) finden diese Anwendung und tragen auf unterschiedlichste Weise zur Antibiotika-Resistenzentwicklung bei. So kommen z.B. in Deutschland 85% aller genutzten Antibiotika bei Tieren zur Anwendung. Tierische Ausscheidungen werden in der Landwirtschaft wiederum als Dünger für die Felder verwendet, wodurch es zur Austragung von Antibiotika und Antibiotika-resistenten Bakterien in die Umwelt kommt. Einerseits können einige der Antibiotika sich im Boden anreichern, da sie sich nur langsam abbauen, andererseits können die Antibiotika durch Ausschwemmungen auch in aquatische Habitate eingetragen werden (Wellington & Van Elsas, 2013, Jechalke *et al.*, 2014). Dadurch können die Antibiotika-Konzentrationen in der Umwelt, je nach Eintragungsort, stark variieren. Die restlichen 15% der verwendeten Antibiotika finden ihren Einsatz im humanmedizinischen Bereich, wobei 85% davon dem ambulanten Bereich zugeschrieben werden müssen (Meyer *et al.*, 2013) (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Darstellung der Antibiotikaverbrauchsanteile in Deutschland (Meyer *et al.*, 2013).**

So können anthropogene Einflüsse auf die Umwelt, je nach Siedlungsgebiet, unterschiedlich ausgeprägt sein. In ländlichen Gegenden können landwirtschaftlich genutzte Flächen eine wichtige Bedeutung haben. Über die Ausbringung unterschiedlicher Stoffe auf die Felder, wie Gülle, Dünger oder Pestizide oder Abläufe aus der Viehzucht können neben Nährstoffen, Pestiziden, Antibiotika, Metallen und Salzen auch fakultativ pathogene Bakterien in die Umwelt gelangen (Khatri & Tyagi, 2015). Andere Studien konnten mittels qPCR-Analysen einen Unterschied in der Belastungssituation anhand der verschiedenen Siedlungsgebiete feststellen (Chen & Zhang, 2013). In einer weiteren Studie konnten im ländlichen Raum

Carbapenemase Produzenten identifiziert werden, jedoch keine extensiv resistenten Isolate (extensively drug-resistant; XDR). Carbapenem-Antibiotika werden zurzeit größtenteils für die Behandlung von nosokomialen Infektionen mit gramnegativen Bakterien und vor allem bei ESBL-resistenten Bakterien eingesetzt (Müller *et al.*, 2018). Diese Carbapenemase Produzenten können u.U. durch Abschwemmungen von mit Gülle behandelten Feldern stammen. Im urbanen, von Kliniken beeinflussten Gebiet konnten sowohl MDR, als auch XDR Bakterien in der Kläranlage, als auch im Oberflächenwasser gefunden werden (Müller *et al.*, 2018). Weist ein Bakterium Resistenzen gegen mehrere Antibiotikaklassen auf, wird es als MDR bezeichnet. Ist es gegen mehrere Antibiotika resistent und weist zusätzlich eine hohe Wahrscheinlichkeit auf gegen alle oder fast alle zugelassenen Antibiotika resistent zu sein, wird der Begriff „extensively drug resistant“(XDR) verwendet (Magiorakos *et al.*, 2012).

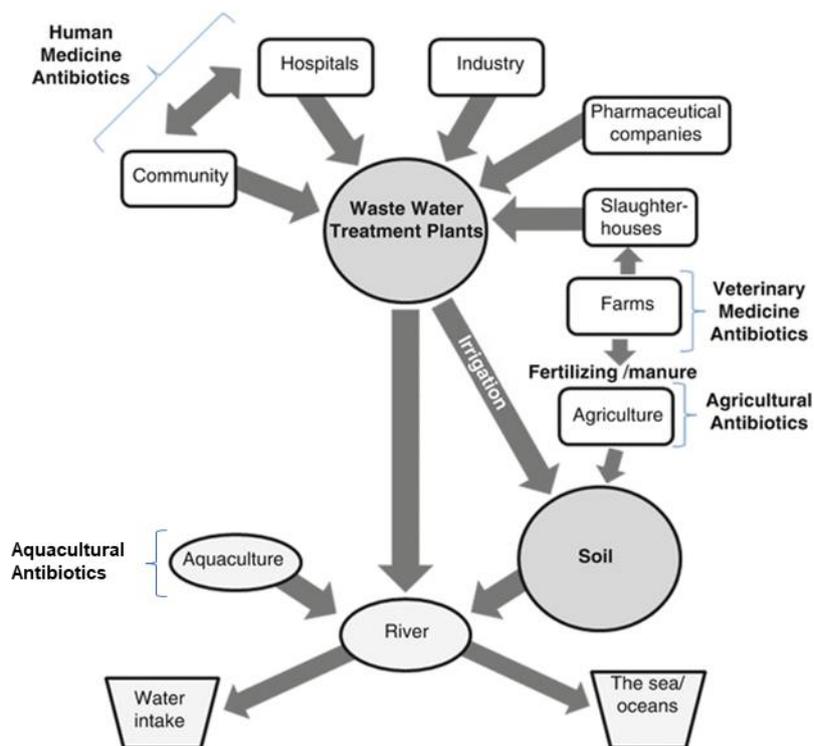
Besonders kritisch ist der globale Anstieg an Carbapenemase produzierenden *Enterobacteriaceae*, denn durch die schwierige Behandlungssituation wird oftmals im Falle einer Infektion mit Carbapenem-resistenten Bakterien auf das Reserveantibiotikum Colistin zurückgegriffen, was in einem erhöhten Verbrauch dieses Polymyxins resultiert. Des Weiteren besteht durch die Eintragung der entstandenen und selektierten MDR Bakterien in die Umwelt ein potentiell Risiko einer kritisch zu wertenden Kolonisierung des Menschen durch Kontakt mit Ab- und Oberflächenwasser (Müller *et al.*, 2018). Sogar eine Kolonisierung mit Bakterien, die bereits ein solches Resistenzgene tragen, über das Trinkwasser kann laut der Autoren nicht ausgeschlossen werden. Die Zunahme an Resistenzen gegen Reserveantibiotika wie z.B. Carbapeneme, Glykopeptide und Polymyxine, hat schon in Einzelfällen zu nicht mehr behandelbaren Infektionen beim Menschen geführt. XDR Isolate konnten in ländlichen Gebieten noch nicht detektiert werden, was u.a. Krankenhäuser als Hauptquelle dieser hoch-Risiko Bakterien nahelegt (Müller *et al.*, 2018). Eine Studie zu MDR Bakterien von Narciso-da-Rocha und Manaia, (2016) verwendet neben dem Agardiffusionstest zur Resistenzanalyse u.a. molekularbiologische Methoden. Sie konnten zeigen, dass das Hauptreservoir an Antibiotikaresistenzen in der Umwelt bei *Actinobacteria*, *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* liegt. So gehörten alle Isolate, die gegen 4 Antibiotika-Klassen resistent waren diesen Phyla an. Die Analyse auf Gattungsebene konnte *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Burkholderia* und *Cupriavidus* identifizieren (Narciso-da-Rocha & Manaia, 2016)(Narciso-da-Rocha & Manaia, 2016). Diese weisen ein ubiquitäres Vorkommen auf und sind potentiell pathogen. Weitere detektierte Gattungen, die jedoch mit Wildtieren assoziiert sind, waren *Clitronophage*, *Chryseobacterium* und *Pedobacterium*. Die gefundenen MDR Isolate zeigten

jedoch keine Überlappungen mit Resistenzen, die aus klinisch relevanten Pathogenen bekannt sind (Narciso-da-Rocha & Manaia, 2016).

In einer weiteren Studie, die sich mit Bakterien mit Mehrfach-Antibiotika-Resistenzen (Multidrug Resistance, MDR) beschäftigt, wurden 31787 Antibiogramme aus Krankenhäusern aus dem Niederländisch/Deutschen Grenzgebiet mit den jeweiligen landesüblichen Interpretationsmethoden ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass 73,7 % der Antibiogramme keine Mehrfach-Resistenzen aufwiesen. Nach dem niederländischen System konnten jedoch 24,5 %, nach dem deutschen System nur 12,9 % als mehrfach resistente Isolate eingestuft werden (Köck *et al.*, 2018). Daher müssen harmonisierte Methoden nicht nur im medizinischen Bereich, sondern auch allgemein in der Forschung angewandt werden, um eine internationale vergleichbare Datenlage zu erzeugen und einen generellen Überblick über das Ausmaß zu erhalten. Des Weiteren ist es sinnvoll, um der Resistenzentwicklung entgegenzuwirken, eine Sensibilisierung bei der Vergabe von Antibiotika in den diversen Einsatzgebieten voranzutreiben. Sowohl eine Unterbrechung der Verbreitungswege von ARB und die Resistenzentwicklung bei Bakterien müssen gestoppt werden, indem entsprechende Maßnahmen auf internationaler, als auch auf nationaler Eben getroffen werden.

#### **1.4. Kläranlagen als „HotSpots“ der bakteriellen Resistenzentwicklung**

Aus den unterschiedlichsten Bereichen, wie der Agrarwirtschaft, Industrie, Krankenhäusern und dem kommunalen Bereich gelangen Abwässer mit unterschiedlich starken Belastungen an Antibiotika, Antibiotika-resistenten Bakterien (ARB) und Antibiotika-Resistenzgenen (ARGs) in Kläranlagen. Durch die Einleitung dieser unterschiedlich beeinflussten Abwässer in die Kläranlagen gilt diesen eine besondere Aufmerksamkeit, da diese, als zentrale Systeme, eine gute Möglichkeit der gerichteten Intervention und Kontrolle der Belastungssituation bieten (Abbildung 3). So können hier Belastungen ermittelt werden und zielgerichtet Maßnahmen ergriffen werden, um eine Reduktion der Eintragung in die Umwelt zu erzielen. Aufgrund der zentralen Rolle, als auch der hohen Belastung in Kläranlagen werden diese meist als „Hotspot“ für die Verbreitung von ARB und ARGs bezeichnet und rücken in den Fokus der Forschung (Michael *et al.*, 2013, Rizzo *et al.*, 2013, Alexander *et al.*, 2015, Berendonk *et al.*, 2015, Alexander *et al.*, 2016, Cytryn *et al.*, 2017, Hembach *et al.*, 2017, Jäger *et al.*, 2018a, Jäger *et al.*, 2018b). Ein Hauptaugenmerk wird dabei auch auf anschließende aquatische Systeme gelegt, die u.a. für die landwirtschaftliche Bewässerung oder zur Trinkwasseraufbereitung genutzt werden können. Auch deshalb ist es nötig, durch angepasste Überwachungsmechanismen und Kontrollsysteme entsprechende Maßnahmen für eine gute Wasserqualität zu ergreifen (World Health Organization, 2014). Dabei bieten sich Kläranlagen als zentraler Punkt in der Wasserwirtschaft an, um hier kontrollierend einzugreifen.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Zuläufe, die zu diversen Belastungssituationen an Kläranlagen beitragen und mögliche Verbreitungswege des geklärten Abwassers in Anlehnung an Cytryn *et al.*, 2017. Das in der Abbildung als „water intake“ bezeichnete Wasser steht für die für die Wasserversorgung verwendete Wasser (Cytryn *et al.*, 2017).**

Kläranlagen haben eine wichtige Rolle, da sie ein anthropogenes Reservoir für Antibiotika darstellen (Rizzo *et al.*, 2013). Dies resultiert u.a. daraus, dass Antibiotika, welche Einsatz bei Menschen und Tieren finden, zu ca. 50% unverändert wieder ausgeschieden werden und über die unterschiedlichen Abwässer in die Kläranlage, bzw. so auch in die Umwelt gelangen können. So werden beispielsweise beim Menschen ~ 40% einer Fluorquinolon-Dosis unverändert wieder ausgeschieden und potentiell der Kläranlage zugeführt (Andersson & Hughes, 2012) (Tabelle 2). So können dort ggf. sub-inhibitorische Antibiotika-Konzentrationen auftreten, die bei den Bakterien Stressantworten auslösen können und so u.U. die Risiken einer Weitergabe von ARGs und die Entwicklung von ARBs, welche ein deutliches reduziertes therapeutisches Potential aufweisen, erhöhen. So kommt es bei nicht-letalen Konzentrationen (sub-MHK) von Antibiotika nicht zur Abtötung sensibler Bakterien. Diese werden jedoch in ihrem Wachstum verlangsamt (Andersson & Hughes, 2012, Berditsch *et al.*, 2015). Die durch solche Faktoren induzierte SOS-Antwort bei Bakterien kann dazu führen, dass es zu einer gesteigerten Frequenz des HGT kommt oder aber die Mutationsrate deutlich erhöht wird. Dabei ist es jedoch auch von Bedeutung, ob der Resistenzerwerb zu Fitnessseinbußen führt. Andersson & Hughes, (2012) nehmen an, dass sich eine Mutation nur etablieren kann, solange die Fitnesskosten geringer sind als die Wachstumsreduktion, die durch das Antibiotikum in

sub-inhibitorischen Konzentrationen bei sensitiven Bakterien ausgelöst wird. Die entsprechenden Umgebungsbedingungen nehmen somit einen direkten Einfluss auf die Art der selektierten Resistenz. So werden bei letalen Antibiotika-Dosen nur starke Resistenzen selektiert, unabhängig deren Fitnesskosten. Bei niedrigen Antibiotika-Dosen spielen die Fitnesskosten eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund ist jedoch anzunehmen, dass Resistenzen mit niedrigen Fitnesskosten längerfristig in einer Population Bestand haben, auch dann, sollte der Selektionsdruck zurückgehen (Gullberg *et al.*, 2011, Andersson & Hughes, 2012, Rizzo *et al.*, 2013).

**Tabelle 2: Auflistung des prozentualen Anteils der Ausgangssubstanz, welche nach Durchgang durch den Patienten unverändert im Urin ausgeschieden wird (Andersson & Hughes, 2012).**

<b>Antibiotic class</b>	<b>Fraction of dose excreted in human urine in active form</b>
Fluorquinolones	40 %
Aminoglycosides	80 – 90 %
Tetracycline	40 %
Macrolides	20 – 30 %
Penicillins	50 %
Cephalosporins	70 – 90 %
Trimetoprim	50 %

Kommunale Kläranlagen wurden bereits als Quellen für anorganische und organische Schadstoffe, sowie Antibiotika-resistente Bakterien (ARB) und -Resistenzgene (ARGs) identifiziert (Michael *et al.*, 2013, Rizzo *et al.*, 2013, Hembach *et al.*, 2017). Auch Novo *et al.*, (2013) beschrieben Kläranlagen als „Hotspots“ der Antibiotika-Resistenzentwicklung, da zum einen Antibiotika-Rückstände und weitere, im Abwasser präsenzte Substanzen einen Selektionsdruck aufbauen können, wodurch resistente Bakterien einen Fitnessvorteil haben und sich in der Population durchsetzen können. Hauptsächlich besteht die vorherrschende Gemeinschaft aus *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Actinobacteria*, welche durch biotische und abiotische Faktoren, wie organisches Material, Schwermetalle, Temperatur, gelöste Sauerstoffkonzentration, Salzgehalt und die Durchflussrate beeinflusst werden können (Novo *et al.*, 2013). Hinzu kommt die hohe Eintragungslast an ARBs und ARGs aus den unterschiedlichen Kläranlagenzuläufen. Des Weiteren üben während der Abwasserreinigung, neben den vorhandenen Antibiotika-Rückständen, auch weitere vorhandene Substanzen u.U. einen Selektionsdruck aus, welche Stressreaktionen bei Bakterien auslösen können und so zu einer gesteigerten Mutationsrate, als auch zu einer erhöhten Gentransferrate beitragen können (Finley *et al.*, 2013, Novo *et al.*, 2013, Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013).

Ziel der Abwasserreinigung ist primär die Entfernung von Stickstoff-, sowie Phosphor-Verbindungen. Über erweiterte adsorptive Maßnahmen können auch Spurenstoffe eliminiert werden. Aktuell sind Kläranlagen noch nicht für die Elimination von mikrobiellen Verschmutzungen ausgelegt, weshalb, unabhängig der Kläranlageneffizienz, ARBs und ARGs im Kläranlagenauslauf zu finden sind, die über diesen Weg in die Umwelt gelangen (Novo *et al.*, 2013). Kläranlagen allgemein und im Besonderen die biologische Reinigungsstufe stellt ein geeignetes Habitat für die Resistenzentwicklung dar. Zum einen durch die hohe Zelldichte, als auch durch das hohe Nährstoffangebot für Bakterien.

### **1.5. Möglichkeiten der Überwachung der aktuellen Resistenzlage in Kläranlagen**

In der Literatur werden einheitliche und geeignete Nachweissysteme für die Standardisierung und Harmonisierung von Messdaten gefordert, um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Studien zu gewährleisten (Berendonk *et al.*, 2015, Rocha *et al.*, 2018, Pärnänen *et al.*, 2019, Rocha *et al.*, 2019). Für den klinischen Bereich haben sich solche Systeme schon etabliert. Umweltproben stellen die Wissenschaft jedoch vor Herausforderungen, da hier die hohe Diversität innerhalb der Population und die nicht Kultivierbarkeit vieler vorhandener Bakterienspezies zum Tragen kommt. So ist nur ca. 1% der in der Umwelt vorkommenden Bakterienstämme kultivierbar und somit das Wissen um die wirkliche Diversität und die Resistenz-Zusammensetzung limitiert (Finley *et al.*, 2013). Ein auf der Kultivierung der Bakterien basierender Ansatz vergleicht den Anteil der resistenten Bakterien mit dem aller Bakterien (Berendonk *et al.*, 2015). Kultur-basierte Methoden erlauben einen einfachen und kostengünstigen Nachweis von entsprechenden Bakterien und Resistenzen. Nachteile sind zum einen die Weiterverarbeitung der Proben innerhalb von 24 h nach der Probenahme, zum anderen die Auswahl vordefinierter Bakterien durch die entsprechenden Nährböden (Hiller *et al.*, 2019). Darum werden i.d.R. spezifische Indikatorbakterien, wie *E. coli* oder Enterokokken herangezogen.

Alternativen, die eine gute Abschätzung der Belastungssituation geben, sind kulturunabhängige Methoden wie die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR). Bei qPCR Untersuchungen kann die gesamte DNA der Probe auf fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotika-Resistenzgene untersucht werden. Die Vorteile liegen hier u.a. an der schnellen Produktion von Ergebnissen und der geringen Fehleranfälligkeit. Darüber hinaus ermöglicht diese Technik den Gesamtnachweis von ARGs über alle Bakterienspezies hinweg, erfasst mobile DNA Fragmente und auch freie DNA (Hiller *et al.*, 2019), welche in der Umwelt nach dem Zelltod noch einige Zeit nachgewiesen werden können (Li *et al.*, 2014). Dies kann zu einer Überschätzung der Konzentration der Untersuchungsparameter führen (Li *et al.*, 2014). Hier bietet Propidiummonoazid (PMA) eine Möglichkeit, dieser Problematik

entgegenzuwirken. Mittels PMA kann eine Lebend/ Tot-Differenzierung vorgenommen werden, wodurch die durch die freie DNA oder durch tote Bakterien verursachten falsch positiven Signale eliminiert werden und so ein realistischeres Bild der Belastungssituation gezeigt werden kann (Nocker *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2014, Hiller *et al.*, 2019). Aktuell wird in der Literatur die Notwendigkeit von einheitlichen und harmonisierten Vorschriften für Kultivierungsmethoden, DNA-Extraktionen, sowie einer sinnvollen und geeigneten Auswahl an Primersystemen für Resistenzgene und Indikatorbakterien gefordert, die für eine mögliche Überwachung der Resistenzeintragung in die Umwelt, als auch der dortigen Resistenzevolution und für die Überwachung von Kläranlagen genutzt werden können (Hiller *et al.*, 2019, Pärnänen *et al.*, 2019).

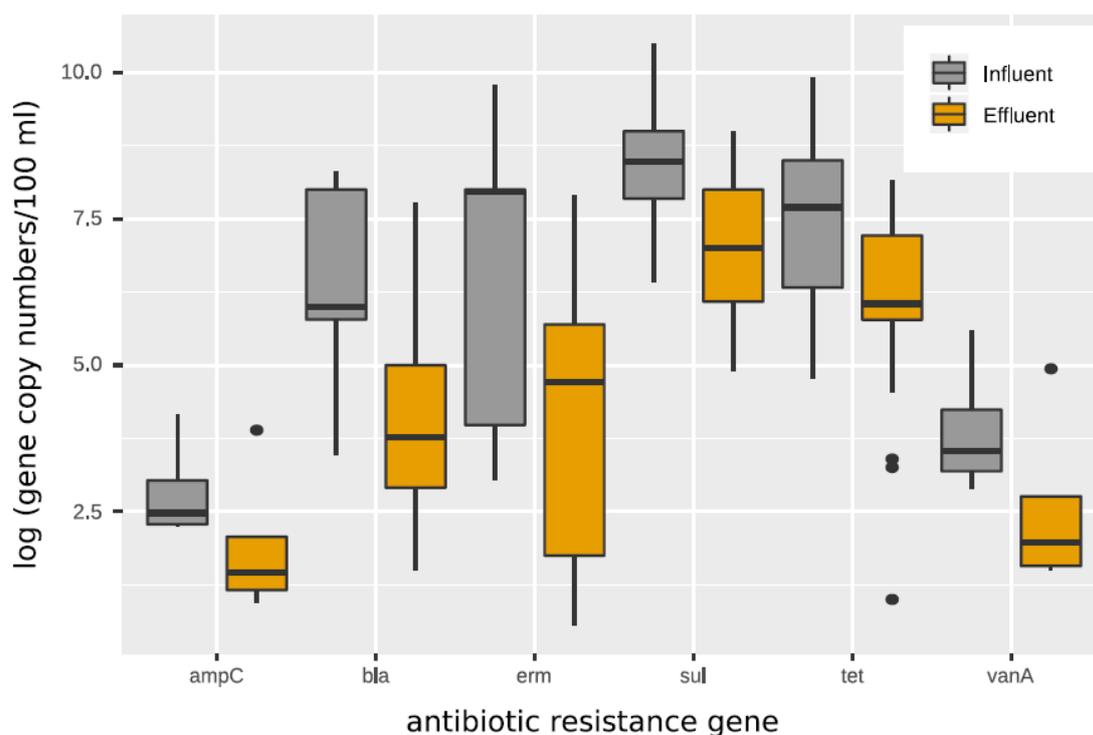
## **1.6. Methoden zur Elimination von Antibiotika resistenten Bakterien und Antibiotika Resistenzgenen in Kläranlagen**

Insbesondere der Schutz der Umwelt vor mikrobiologischen Verunreinigungen, u.a. durch fakultativ pathogene Bakterien mit klinischer Relevanz, ist in Deutschland unter dem § 37 des Infektionsschutzgesetz (IfSG) festgeschrieben 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". Auch im § 41 (1) IfSG wird darauf verwiesen, dass durch die Abwasserbeseitigung keine Gefahren für die menschliche Gesundheit durch Krankheitserreger entstehen. Des Weiteren besagt § 5 (5) des IfSG, dass auch der Status des Rohwassers berücksichtigt werden muss, ausgehend vom mikrobiologischen Zustand des Gewässers und ggf. eine Desinfektion erfordert, besonders im Hinblick auf eine mögliche Wiederverwendung des Wassers. In der für die Gewässerqualität zuständigen Wasserrahmenrichtlinie sind allerdings keine Regelungen für das Auftreten und die Überwachung von Krankheitserregern oder Antibiotika-Resistenzen im Gewässer festgelegt. Der unter § 37 (1) IfSG aufgeführte Besorgnisgrundsatz leitet dazu an Untersuchungen durchzuführen, um die mikrobiologische Wasserqualität festzustellen und ggf. verbessernd einzugreifen.

Einige ARB können durch konventionelle Abwasserbehandlungsverfahren entfernt werden (Guardabassi *et al.*, 2002, Da Costa *et al.*, 2006), aber es gibt immer noch eine große Anzahl, die im Abwasser überleben können (Pruden *et al.*, 2006, Hembach *et al.*, 2017). In der Folge werden ARB und ARGs freigesetzt und in der Umwelt weiter verbreitet (Kim & Carlson, 2007, Czekalski *et al.*, 2012, Alexander *et al.*, 2015). Die hygienische Qualität der von Kläranlagenabwässern betroffenen Vorfluter ist, insbesondere bei der Wiederverwendung von Wasser, von hoher Relevanz. So wurde beispielsweise in der Richtlinie für die Behandlung von kommunalem Abwasser empfohlen, "behandeltes Abwasser bei Bedarf wieder zu

verwenden" unter der Voraussetzung, dass die negativen Auswirkungen auf die Umwelt so gering wie möglich gehalten werden (EU Directive, 1991).

Daher ist es wichtig, die täglichen Frachten an ARB und ARGs, welche durch eine Kläranlage in die aquatische Umwelt gelangen, zu bestimmen, da das gereinigte Abwasser ggf. zur Bewässerung in der Landwirtschaft eingesetzt werden kann. Die Häufigkeiten von ARB und ARGs in unterschiedlichen Kläranlagen-Ausläufen variieren jedoch stark. Es konnten Werte für ARGs bis hin zu  $2,33 \times 10^6$  Genkopien/100 mL, bzw. für ARB zwischen  $5,0 \times 10^2$  –  $6,1 \times 10^5$  KBE/100 mL gemessen werden (Munir *et al.*, 2011, Rizzo *et al.*, 2013, Rizzo *et al.*, 2014, Hembach *et al.*, 2017, Jäger *et al.*, 2018b, Hiller *et al.*, 2019).



**Abbildung 4: Zusammenfassung und Überblick über die Häufigkeiten der ARGs (ampC-, tet-, sul-, ermB-, vanA- und bla-Gene) aus 18 Studien, die in Zufluss- und Abflussproben konventioneller Kläranlagen nachgewiesen wurden, dargestellt als Tukey-Boxplots (Hiller *et al.*, 2019).**

Abbildung 4 aus der Publikation von Hiller *et al.*, (2019) gibt einen zusammenfassenden graphischen Überblick über die Häufigkeiten von ARGs in Kläranlagenzu- und -ausläufen bei konventioneller Abwasserbehandlung. Dabei wurden die Gene *tetA*, *tetB*, *tetM*, *tetC*, *tetO*, *tetQ* und *tetW* unter der tet-Gruppe zusammengefasst. Sul1 und sul2 bilden die sul-Gruppe, die erm-Gruppe beinhaltet *ermB* und *ermF*. Die  $\beta$ -Laktam-Resistenzen, aufgeführt in der bla-Gruppe, bestehen aus den Genen *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M32</sub>, *bla*<sub>SHV-34</sub> und *bla*<sub>OXA-58</sub>. Die in Abbildung 4 gezeigten Daten stammen alle aus qPCR Experimenten unterschiedlicher Studien. Die Analysen und Zusammenfassung der einzelnen Studien in diesem Review zeigen die höchsten Resistenzwerte für die Breitbandantibiotika Tetracyclin und Sulfonamid, die anderen

Resistenzen kommen in deutlich geringeren Häufigkeiten vor, wie z.B. Resistenzen gegen das Reserveantibiotikum Vancomycin, aber auch gegen das Breitbandantibiotikum Ampicillin. Da dieses zur Antibiotika-Klasse der Penicilline gehört, könnte die Verwendung anderer Penicilline die geringe Abundanz erklären. Die bla-Gruppe umfasst sowohl Breitbandantibiotika, als auch spezifische Antibiotika und Reserveantibiotika und weist dennoch eine geringere Häufigkeit auf als die Breitbandantibiotika Tetracyclin und Sulfonamid. Hier spielt die Abbaubarkeit der Beta-Laktamverbindungen in der Kläranlage eine Rolle, die die eigentliche Abundanz im Abwasserweg von Verursacher bis zur Kläranlage nicht erfasst. Ebenso spielt die Verwendung der Antibiotika seit 1935 (Sulfonamid) und seit 1950 (Tetracyclin) vermutlich eine entscheidende Rolle für die entsprechenden Häufigkeiten und den Selektionsdruck innerhalb der aquatischen Systeme. Die Gene der erm-Gruppe konnten sowohl in hohen, als auch in niedrigen Abundanzen detektiert werden und zeigten hier keinerlei Korrelationen mit dem Antibiotikaverbrauch in der Human- und Veterinärmedizin. Korrelationen sind jedoch für die tet- und sul-Gruppe und den entsprechenden Antibiotikaverbräuchen in der Veterinär- und Humanmedizin festzustellen (Hiller *et al.*, 2019).

Im Hinblick auf den Schutz von Trinkwasser-Reservoirs (Flüssen, Talsperren, Grundwasser) ist eine bestmögliche Reinigung des Abwassers die höchste Prämisse, wenn ein direkter oder indirekter Einfluss besteht. Besonders deutlich wird die Relevanz einer Hygienisierung von Abwasser bei der Betrachtung der Veröffentlichung Schwartz *et al.*, (2003), in der das Vancomycin Resistenzgen (*vanA*) in Biofilmen innerhalb der Trinkwasseraufbereitung und –verteilung in autochthonen Bakterien nachgewiesen werden konnte. Die eigentlichen Trägerorganismen, Enterokokken, konnte in diesen Biofilmen jedoch nicht detektiert werden, was auf eine Weitergabe des Gens über einen horizontalen Gentransfer hindeuten kann. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für das  $\beta$ -Laktam Resistenzgen gegen Ampicillin (*ampC*) gezeigt werden. Auch hier war der qPCR-basierte Nachweis in der Biofilmprobe für *Enterobacteriaceae*, den eigentlichen Trägerbakterien, negativ, jedoch fiel das Ergebnis für das *ampC*-Gen positiv aus (Schwartz *et al.*, 2003).

Auch im Hinblick auf eine allgemeine Risikobewertung ist eine Erfassung der Belastungssituation mit ARB und ARGs an Kläranlagen von großer Bedeutung. Aus den bisher angeführten Punkten ist die Ergreifung entsprechender Maßnahmen zur Reduzierung von ARB und ARGs, sowie deren Verbreitungswege zu unterbrechen, erforderlich. Hierzu müssen innovative Technologien identifiziert werden, die in der Lage sind, die bakterielle Belastung zu reduzieren und das Risiko von Kläranlagenabwässern für die anschließende aquatische Umwelt, sowie dessen Wiederverwendung und dadurch auch das Risiko für die menschliche Gesundheit zu minimieren.

Die Wissenschaft beschäftigt sich mit einer Vielzahl unterschiedlicher technischer innovativer Verfahren zur Reinigung des Abwassers und der Entfernung von Spurenstoffen, als auch der Elimination von ARB und ARGs (Alexander *et al.*, 2016, Michael-Kordatou *et al.*, 2018, Hembach *et al.*, 2019, Jiménez *et al.*, 2019, Michael *et al.*, 2019) (Abbildung 5).

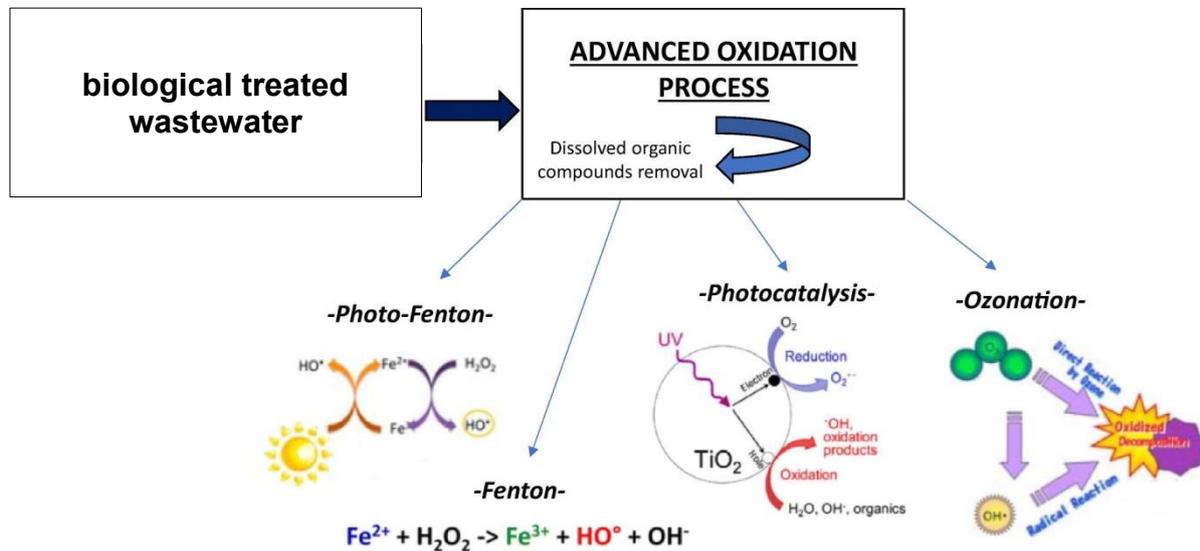


Abbildung 5: Potentielle innovative Abwasserbehandlungen basierend auf unterschiedlichen Oxidationsprozessen in Anlehnung an (Jiménez *et al.*, 2019).

### 1.6.1. Das Ozonverfahren

Ein technisches Verfahren, welches zur Reinigung die Erzeugung von Hydroxyl- und Sauerstoffradikalen nutzt, ist das Ozonverfahren. Dieses wird schon längere Zeit in der Trinkwasseraufbereitung eingesetzt. Dort dient es der Desinfektion, der Entfärbung, Geschmacks- und Geruchskontrolle, als auch der Entfernung von Pharmazeutika, Pestiziden und weiteren organischen Kontaminationen (Ternes *et al.*, 2002, Von Gunten, 2003, Broséus *et al.*, 2009). Durch das breite Wirkungsspektrum des Ozonverfahrens gegenüber organischen Mikroverunreinigungen findet es sowohl im kleinen, als auch in voll ausgebautem technischen Maßstab in der Abwassertechnik Anwendung (Von Gunten, 2003, Broséus *et al.*, 2009). Die Wirkungsweise von Ozon beruht bei anorganischen Komponenten, wie Fe(II), H<sub>2</sub>S, Nitrit, Mn(II) und Cyanid, auf der Übertragung von Sauerstoff. Bei organischen Verbindungen reagiert Ozon mit Doppelbindungen, neutralen Aminen und aktivierten aromatischen Systemen, aber auch mit Kohlenstoffbindungen (C-C), Aminosäuren von Peptidoglycan-Strukturen, Lipiden und Proteinen in der Zellwand. Jedoch wird zunächst nicht von einem tieferen Eindringen von Ozon ins Zellinnere ausgegangen (Dodd, 2012, Sharma *et al.*, 2016). Durch die Wirkungsweise des Ozons kann es zur Inaktivierung von Bakterien beitragen. Jedoch wird hierbei davon ausgegangen, dass dies erst bei höheren Konzentrationen eintritt (Dodd, 2012, Sharma *et al.*, 2016). Darüber hinaus kann Ozon zu einer Denaturierung von Proteinen führen, was ein weiterer wichtiger Punkt ist, da die im Wasser vorhandenen Nukleasen durch Ozon in ihrer Aktivität gehemmt werden und die u.U. aus abgetöteten

Bakterien freigesetzte DNA, welche auch Resistenzgene enthalten kann, nicht weiter abgebaut werden kann (Rieder *et al.*, 2008). Neben der Beschreibung der Ozonung als effizienter Prozess zur Entfernung organischer Mikroschadstoffe wird dieser auch als effektiver Prozess zur Inaktivierung von Bakterien durch die Bildung von hoch reaktiven Radikalen angesehen (Hollender *et al.*, 2009, Zimmermann *et al.*, 2011, Dodd, 2012, Lüddeke *et al.*, 2015, Zhuang *et al.*, 2015). Faktoren wie Temperatur, pH-Wert oder der DOC- Wert beeinflussen die Leistung der Ozonung. So sinkt einerseits die Löslichkeit und Stabilität von Ozon bei steigender Temperatur, andererseits steigt die Reaktionsgeschwindigkeit um das 2-3-fache bei einer Erhöhung von 10°C (Okafor, 2011). Des Weiteren wird die Ozonkonzentration durch den DOC-Wert beeinflusst, da das organische Material als Reaktionspartner für die Radikale dient (Sharma *et al.*, 2016). Die Effektivität von Ozon auf Bakterien beruht auf der Lyse der bakteriellen Zellwand, der oxidativen Degeneration von Nukleinsäuren und der Zerstörung von Kohlenstoff-Stickstoff-Verbindungen, was zur Depolymerisation von Proteinen führt. Dabei hängt die Reaktion neben den physikalischen Eigenschaften des Organismus auch von der Kontaktzeit und der Konzentration ab (Okafor, 2011). Jedoch wirken sich auch sog. „Shielding Effekte“, ausgelöst durch Zellaggregate oder Biofilme, negativ auf die Ozoneffizienz aus (Zimmermann *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Bildung von Biofilmen zu einer deutlichen Erhöhung der nötigen Ozonkonzentration kommt (Hota *et al.*, 2009). Andere Studien konnten eine Dosis-abhängige Wirkung von Ozon auf die DNA-Struktur und deren Integrität zeigen (Öncü *et al.*, 2011). Untersuchungen zur Reaktivität von Ozon mit den einzelnen DNA-Bausteinen konnte zeigen, dass lediglich 43% der Nukleotide in oxidiertem Zustand vorliegen müssen, um die DNA-Struktur aufzulösen. Thymin weist die höchste Reaktivität mit Ozon auf ( $3,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), gefolgt von Guanin ( $1,6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Die Reaktionsgeschwindigkeiten von Cytosin und Adenin sind eine Log-Stufe bzw. drei Log-Stufen geringer. Durch die Basenpaarung ist es möglich, dass es zu einem Zusammenbruch der DNA-Struktur kommt, sobald Thymin und Guanin in oxidiertem Form vorliegen (Cataldo, 2006). Aufgrund der natürlichen DNA-Struktur, geprägt durch Wasserstoffbrücken und die Doppelhelix-Struktur, ist die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu zwei Log-Stufen langsamer als der Durchschnittswert der einzelnen freien Nukleotiden (Cataldo, 2006). Bisherige Studien zur Elimination von Referenz-Bakterien mittels Ozonbehandlung zeigen einen Rückgang um mehrere Log-Stufen nach der Behandlung (Dodd, 2012, Zhuang *et al.*, 2015). Jedoch zeigen verschiedene Bakterienspezies eine unterschiedliche Anfälligkeit gegenüber der Ozonung. Es konnte gezeigt werden, dass es zur Selektion einer toleranteren Subpopulation kommt, welche sich durch einen höheren GC-Gehalt im Genom auszeichnet (Alexander *et al.*, 2016). In der Studie von Alexander *et al.* (2016) wurden Pseudomonaden, einschließlich *P. aeruginosa*, mit einem GC-Gehalt von über 60% (Lee *et al.*, 2006, Hyatt *et al.*, 2010) als ozonstabiler bezeichnet. Zu den ozonsensiblen

Bakterien zählen in der Studie u.a. Enterokokken, welche einen GC-Gehalt von unter 40% aufweisen (Kristich *et al.*, 2007, Brede *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2012, Lam *et al.*, 2012). Ausgehend von diesen Erkenntnissen könnte sich der bakterielle genetische Hintergrund als wichtig für die Ermittlung einer effektiven Ozonkonzentration zur Elimination von fakultativ pathogenen Bakterien herausstellen. Hierbei ist jedoch darauf zu achten, dass die Möglichkeit besteht, dass höhere Konzentrationen bei der Ozonbehandlung neben den Transformationsprodukten auch unerwünschte Produkte wie Bromat hervorrufen. Dieser potentiell krebserregende Stoff kann während der Ozonbehandlung von bromidhaltigem Wasser entstehen (Von Gunten & Hoigne, 1994, Von Gunten, 2003).

### **1.6.2. Das UV-Verfahren**

Ein weiteres, bereits in der Trinkwasseraufbereitung eingesetztes technisches Verfahren, stellt die UV-Behandlung dar, die zur Inaktivierung von Bakterien, Viren und Parasiten eingesetzt wird, da bei dieser Art der Behandlung keine störenden Nebenprodukte entstehen (Hijnen *et al.*, 2006). Für die Trinkwasserdesinfektion wurde vom Deutschen Gas- und Wasserverband eine Mindestbestrahlung von 400 J/ m<sup>2</sup> festgelegt (DVGW, 1997). Die keimtötende Wirkung von UV-Strahlung basiert auf Veränderungen der DNA, RNA und Proteinen durch die Absorption der Strahlung der entsprechenden Wellenlänge (Jungfer *et al.*, 2007, Süß *et al.*, 2009). Dadurch kommt es zu DNA-Schäden und zur Inhibition der Zellreplikation. Bei letalen UV-Dosen kommt es letztendlich zum Verlust der Reproduzierbarkeit (Rizzo *et al.*, 2014). Jedoch konnte in Studien gezeigt werden, dass durch UV-Strahlung der horizontale Gentransfer (HGT) durch mobile genetische Elemente (MGE) beschleunigt wird (Aminov, 2011), was als ein treibender Faktor für die Resistenzentwicklung in aquatischen Habitaten betrachtet wird (Chao *et al.*, 2013). Weitere Studien hingegen zeigen im *E. coli* Modell, dass bei niedrigen UV-Dosen die Frequenz des konjugativen Transfers nur minimal variiert, die Bakterienzahl aber reduziert werden konnte, ohne die Zellpermeabilität zu beeinflussen. Bei höheren Dosen (> 10 J/m<sup>2</sup>) konnte der ARG Transfer sogar unterdrückt werden (Guo *et al.*, 2015, Sharma *et al.*, 2016). Jedoch ist hier zu berücksichtigen, dass bei diesen UV-Intensitäten die Zellzahl von *E. coli* deutlich reduziert wurde und dass der Schwellenwert, um die Transferrate zu bestimmen, bei 10<sup>4</sup> KBE/ mL liegt, welcher in diesem Fall deutlich unterschritten wurde (Guo *et al.*, 2015). Jedoch ist dadurch auch ein konjugativer Transfer des ARG tragenden Plasmids sehr unwahrscheinlich. Daher könnte sich eine UV-Behandlung als geeignete Methode zur Kontrolle vom Transfer von ARGs herausstellen, da der genetische Austausch nicht gefördert wird (Guo *et al.*, 2015, Sharma *et al.*, 2016). Unbestritten sind jedoch der DNA-schädigenden Effekte der UV-Bestrahlung und die damit verbundene Aktivierung verschiedener Reparaturmechanismen (Jungfer *et al.*, 2007, Süß *et al.*, 2009, Kraft *et al.*, 2011). So werden durch eine UV-Bestrahlung strukturelle Veränderungen und Strangbrüche in der DNA induziert, einschließlich Pyrimidin-Dimere, wie Thymin-Dimere, Cyclobutan-

Pyrimidin-Dimere (CPDs) und Pyrimidin-Pyrimidin (6-4)-Photoprodukte (6-4-PPs) (Mitchell & Karentz, 1993). Diese mutagenen Läsionen verändern die DNA-Struktur und hemmen Polymerasen und stoppen die Replikation (Kraft *et al.*, 2011). CPDs entstehen durch die Verbindung der Kohlenstoff-Doppelbindung der Pyrimidine. Dabei stellen Thymin-Dimere die am häufigsten auftretenden CPDs dar, wohingegen nur rund  $\frac{1}{3}$  der DNA-Läsionen auf 6-4-PPs zurückgeführt werden können. 6-4-PPs resultieren aus der Verknüpfung der C6-Position des 5'-Pyrimidin mit der C4-Position des 3'-Pyrimidins (Matsumura & Ananthaswamy, 2002). Auch hier greifen bakterielle molekulare Mechanismen wie die Photoreaktivierung und das Dunkelreparatur-System, um entstandene DNA-Läsionen zu beheben (Jungfer *et al.*, 2007, Süß *et al.*, 2009)

### 1.6.3. Das Photo-Fenton-Verfahren

Zu einer weiteren oxidativen Verfahrenstechnik in der Abwasserbehandlung, mit dem Ziel der Reduzierung von chemischen und mikrobiologischen Verunreinigungen, gehört die Photo-Fenton-Technik. Dabei wird durch Nutzung eines Photo-katalytischen Prozesses  $\text{Fe}^{2+}$  in Verbindung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert. Bei diesem Vorgang entstehen hoch reaktive Hydroxylradikale, die mit den vorhandenen Kohlenstoffdoppelbindungen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen reagieren. Die generierten reaktiven Sauerstoffspezies reagieren u.a. auch mit der bakteriellen Zellmembran und können deren Integrität stören, was zum Verlust des selektiven Stofftransports durch die Bakterienmembran führen kann (Ortega-Gómez *et al.*, 2012).

Es sind bereits vereinzelte Untersuchungen zu potentiellen Prozesskombinationen von Photo-Fenton mit anderen reaktiven Sauerstoffspezies, wie  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oder Kombinationen mit UV-A durchgeführt worden, die vielversprechende Reduktionsraten für *Enterococcus faecalis* um 2,5 log-Stufen aufweisen. Eine Studie untersuchte die Reduktionsleistung nach einer Abwasserbehandlung mit einer Kombination aus  $\text{H}_2\text{O}_2$ , UV-A und Photo-Fenton, welche nach 80 Minuten zu Reduktion um ca. 5 log-Stufen führte (Ortega-Gómez *et al.*, 2012).

Weitere Belege für die Effektivität dieser Verfahrenstechnik sind u.a. die Inaktivierung von *E. coli* K12 nach 60 Minuten (Rincón & Pulgarin, 2006), sowie Untersuchungen zu Antibiotika resistenten *E. faecalis*. In der Studie wurden im Auslauf des Systems Ofloxacin-resistente *E. faecalis* wesentlich häufiger detektiert als Trimethoprim-resistenter *E. faecalis*. Am Ende der Behandlung wurden aber sowohl die Ofloxacin-, als auch die Trimethoprim-resistenten Enterokokken vollständig eliminiert (Michael *et al.*, 2013, Rizzo *et al.*, 2013).

### 1.6.4. Das $\text{TiO}_2$ -Photokatalyse Verfahren

Ein weiteres Verfahren zur Abwasserbehandlung stellt die heterogene  $\text{TiO}_2$ -Photokatalyse dar. Hier werden unter Verwendung eines Halbleiters und UV-Strahlung freie Elektronen generiert, die mit den unterschiedlichen Bestandteilen des Abwassers reagieren. Durch

Redoxreaktionen kommt es zur Bildung von Hydroxyl- und Sauerstoffradikalen aus Wasser und gelöstem Sauerstoff (Kondrakov *et al.*, 2016).

Kultivierungsexperimente zeigten einen unterschiedlichen Einfluss der TiO<sub>2</sub>-Photokatalyse Technik auf MDR *E. coli* und MDR Enterokokken. Nach einer einstündigen Behandlung konnten der MDR *E. coli* Stamm um die Hälfte reduziert werden, wohingegen es im Fall des MDR Enterokokken Stamms zu einer vollständigen Inaktivierung kam (Fiorentino *et al.*, 2015). Eine weitere Studie weist ebenfalls auf eine effektive Reduktion der organischen Verunreinigungen, als auch der bakteriellen Belastung im Abwasser, in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hin. Jedoch konnte in dieser Studie eine Wiederverkeimung nach drei Tagen festgestellt werden. Dennoch erwies sich dieses Verfahren, laut Autoren als bester Kompromiss bei der Entfernung von organischen Verunreinigungen und der Reduktion der bakteriellen Belastung, auch wenn eine Wiederverkeimung durch die Bakterien nicht zu vermeiden war (Moreira *et al.*, 2018).

### **1.7. Reparaturmechanismen nach innovativen Abwassertechnologien**

Die unter Kapitel 1.6. beschriebenen Abwasserbehandlungstechniken können bei Bakterien unterschiedliche Stressantworten auslösen, um die verschiedenen, u.a. durch Radikale herbeigeführten, Schäden zu reparieren. So können zum einen Reparaturenzyme wie die Glutathion-S-Transferase oxidative Schäden beheben (Peters *et al.*, 2014). Weitere mögliche bakterielle Schutzmaßnahmen sind die gesteigerte Bildung von Superoxiddismutasen und Katalasen, welche zu einem Rückgang der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen (Dourado *et al.*, 2015). Schäden an der DNA, die durch die Radikale verursacht wurden, können mithilfe des *recA* vermittelten Rekombination-Systems behoben werden, um beschädigte DNA Abschnitte zu ersetzen (Händel *et al.*, 2016).

Durch die UV-Bestrahlung verursachten Schäden können von Bakterien mittels Photoreaktivierung durch die Photolyase oder durch den sog. Dunkelreparatur-Mechanismus, mithilfe des *recA*-Systems, regeneriert werden, welcher schon bei sub-letalen Dosen initiiert wird. Das Induzieren der Reparatur- bzw. Regenerationsmaschinerie ist jedoch Zeit- und Bakterienspezies abhängig (Rizzo *et al.*, 2014). Bakterien besitzen mindestens drei unterschiedliche Dunkelreparatur-Mechanismen, die jedoch alle über die Expression des *recA*-Gens reguliert werden (Jungfer *et al.*, 2007). Innerhalb der bakteriellen SOS-Antwort ist *recA* an einer Vielzahl an Prozessen, wie der homologen Rekombination, der DNA-Reparatur und Zellteilung beteiligt, u.a. durch die Bildung des Komplexes aus RecA und der DNA, welcher eine wichtige Rolle spielt (Stohl *et al.*, 2003, Jungfer *et al.*, 2007, Süß *et al.*, 2009).

Eine weitere Möglichkeit der Bakterien, Stresssituation erfolgreich entgegenzuwirken, ist der Übergang in einen metabolisch stark reduzierten Zustand, den sogenannten viable but not

culturable (VBNC) – oder auch “Dormancy“ genannten Zustand (Schwartz *et al.*, 2006, Jungfer *et al.*, 2007, Villarreal *et al.*, 2013, Jäger *et al.*, 2018a).

### **1.8. Motivation dieser Arbeit**

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den Untersuchungen und Optimierung erweiterter Abwasserbehandlungstechnologien an kommunalen Kläranlagen. Gezielt wird die Maximierung der Entfernung von kritischen Bakterien und Antibiotikaresistenzen angestrebt, da dies gezielt zu einer Verringerung der Gesamtbelastung in der nachfolgenden Umwelt beiträgt. Ziel ist es, den finalen Kläranlagenauslaufs mikrobiologisch soweit zu kontrollieren, dass nur noch ein minimales bakterielles Risikopotential vorhanden ist. Darüber hinaus sollen die erweiterten Verfahrenstechniken das Risiko von Mutationsereignissen, horizontalem Gentransfer und selektiven Prozessen minimieren. Es werden unterschiedliche Abwasserbehandlungstechnologien betrachtet, die eine angemessene Abwasserqualität erreichen sollen. Insbesondere die Ozonung steht hier im Fokus, da Ozon bereits häufiger zur Beseitigung chemischer Mikroverunreinigungen untersucht und teilweise auch eingesetzt wird. Hierzu wurden molekularbiologische Methoden zum Nachweis der verschiedenen Untersuchungsparameter verwendet. Mittels qPCR Analysen sollten die Belastungen quantifiziert und geeignete Behandlungstechniken identifiziert und optimiert werden. Zum einen wurden hier die absoluten Reduktionswerte erfasst, indem eine Normierung auf 100 mL Abwasservolumen vorgenommen wurde. Zum anderen konnte über eine Normierung auf 100 ng DNA auch die relative Häufigkeit in einer Gesamtpopulation in den Proben bestimmt werden. Mit diesen Daten können Veränderungen innerhalb der Abwasserpopulation dargestellt werden. Darüber hinaus bieten die molekularbiologischen Ansätze die Möglichkeit einer Unterscheidung der lebenden und toten Bakterien mithilfe von speziellen Reagenzien, wie Propidiummonoazid (PMA), um so nur die Bakterien zu erfassen, die die entsprechende Behandlungstechnologien überleben konnten (Nocker *et al.*, 2006, Nocker *et al.*, 2007b, Nocker *et al.*, 2007a, Bae & Wuertz, 2009, Nocker *et al.*, 2010). Eine lebend/ tot-Differenzierung wurde auch bei Metagenomanalysen angewendet, um die Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Population zu zeigen. Die Effekte der erweiterten Verfahrenstechniken auf die bakterielle DNA wurden mittels eines immunologischen Testverfahren untersucht.

Die vorliegende Doktorarbeit gliedert sich in drei Bereiche, die sich zunächst **lokal** auf die Untersuchungen an einer Großkläranlage konzentrieren. In einem **regionalen** Untersuchungsprogramm wurden Szenarien zur Antibiotikaresistenzsituation in verschiedenen anthropogen beeinflussten aquatischen Kompartimenten dargestellt. Schließlich wurden eigene Ergebnisse in den Zusammenhang mit **europäischen** Untersuchungen gestellt; dies erfolgte im Rahmen des JPI StARE-Projektes der EU.

### Lokal:

Untersuchungen einer Großkläranlage und erweiterte Abwassertechnologien

- Resistenzlage während des Klärprozesses für Priorisierung
- Auswirkungen einer Ozon-, sowie einer Kombination aus Ozon- und UV-Behandlung mittels molekularbiologischen Untersuchungen (qPCR)
- Untersuchungen zur Lebend/Tot Differenzierung nach erweiterten Verfahrenstechniken
- Untersuchungen potentieller DNA-Schäden, ausgelöst durch erweiterte Verfahrenstechniken
- Auswirkung weitere innovativer Abwasserbehandlungen in Kooperation mit NIREAS (Universität Zypern) mittels qPCR (Solar-Photo-Fenton; UV-Bestrahlung in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

### Regional:

Einfluss unterschiedlicher Kläranlagen auf das aufnehmende Gewässer

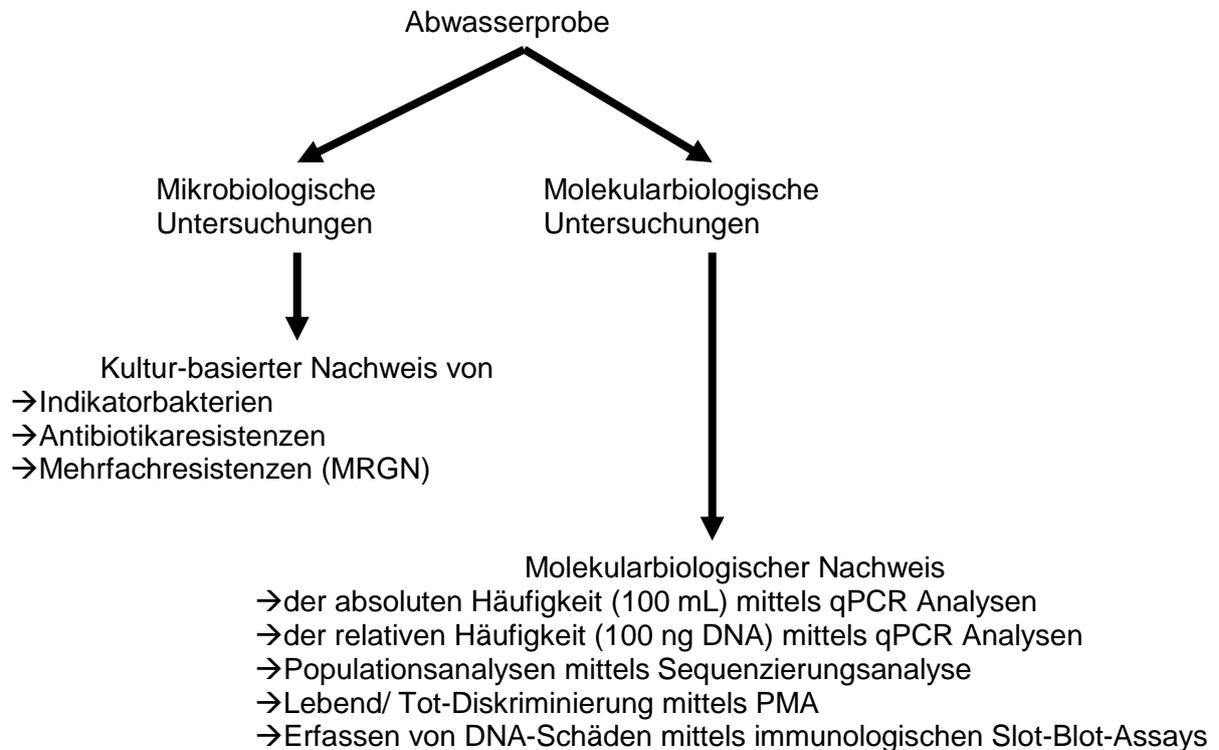
- mikro- und molekularbiologische Untersuchungen verschiedener räumlicher Szenarien
- Einfluss von urban und ländlich geprägten Siedlungsgebieten
- Auswirkungen der verschiedenen Kläranlagen auf die Resistenzentwicklung anhand von Mehrfach-Resistenz-Analysen

### Europa:

Erfassung der Resistenzlage auf europäischer Ebene und Erstellung einheitlicher Protokolle

- Erfassung einer internationalen Überwachungsstudie mittels Hochdurchsatz qPCR (qPCR-Array; Pärnänen *et al.*, 2019)
- Erfassung der Antibiotikarückstände in den untersuchten Kläranlagen (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2020)
- Erstellung von internationalen harmonisierten Untersuchungsprotokollen zur molekularbiologischen Überwachung von ARGs (Rocha *et al.*, 2018)

Die hier aufgeführten Analysemethoden wurden für die Untersuchung der verschiedenen Probenahmepunkte und Untersuchungsszenarien herangezogen. Im Fall der Lokalen Untersuchungen wurden der Schwerpunkt auf die molekularbiologischen Untersuchungen gelegt, wohingegen die regionalen Untersuchungen durch mikrobiologische Untersuchungen ergänzt wurden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Probenaufbereitung

Stichproben der entsprechenden Beprobungsstandorte (Abbildung 6, Kapitel 3.1) wurden in sterilen Probengefäßen gesammelt. Für die lokalen Untersuchungen wurden hierfür sterile Schott-Flaschen (2 L) verwendet. Die Proben wurden direkt nach der Probenahme aufbereitet. Im Fall der regionalen Untersuchungen kamen sterile Plastikcontainer (500 mL) (VWR) zum Einsatz, um einen gefahrlosen Versand der Proben zu gewährleisten. Hier erfolgte die Aufbereitung innerhalb von 24 Stunden nach Probenahme. Hierfür wurden die Proben zum einen mittels der Vakuumfiltration auf Polycarbonat-Membranen (Whatman; Ø 47 mm; 0,2 µm; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) filtriert. Je nach Probenahmestelle lag das filtrierte Volumen zwischen 25 mL (Ablauf mechanische Reinigung), 150 mL (Nachklärbecken, bzw UV-Behandlung), 150-300 mL (für die Ozonbehandlung und die Kombination aus Ozon und UV-Behandlung). Ein Teil der Membranen wurde anschließend einer Lebend/ Tot-Differenzierung mittels Propidiummonoazid (PMA) (Kapitel 2.5) unterzogen und wie die nicht PMA-behandelten Proben bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

### 2.2. Untersuchungen zum Wiederverkeimungspotential

Um das Wiederverkeimungspotential der im Abwasser vorhandenen Bakterien zu ermitteln, wurden jeweils 1 L behandeltes Abwasser Wasserproben nach der biologischen Reinigung und nach der Ozonung in sterile Schott-Flaschen abgefüllt (Abbildung 6, Kapitel 3.1) und anschließend, ohne Zusatz von Nährmedien oder weiteren Additiven, für 72 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln, ohne Schütteln inkubiert. Direkt vor der Weiterverarbeitung nach 72 h wurde die Probe geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien in den Replikaten zu erhalten. Anschließend wurden die Proben mit den hier aufgeführten Analysemethoden untersucht.

### 2.3. Kultur-basierte Untersuchungsmethoden

Im Fall der Kultur-basierten Untersuchungen wurden unterschiedliche Selektivagarplatten verwendet. Für die Bestimmung der Kolonie bildenden Einheit (KBE) pro 100 mL wurden die, der Probenahmestelle entsprechenden Volumina auf Nitrocellulosemischester-Membranen filtriert und auf den Agarplatten platziert. Im Fall der Untersuchungen zur Belastungssituation in unterschiedlich geprägten Siedlungsgebieten wurden für einen umfassenden Überblick die folgenden Systeme verwendet.

*Die kultivierungsbasierten Untersuchungen umfassen folgende Nachweissysteme:*

- **Extended Spectrum Beta-Laktam (ESBL)-resistente Bakterien** (*E. coli*, KEC (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*), *Acinetobacter spp.* und *Pseudomonas spp.*) mittels ESBL Selektivagarplatten bei 42°C für 24 Stunden. (MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland)

- *E. coli* mittels Difco™ m FC-Agar zum Nachweis coliformer Bakterien bei 37°C für 24 Stunden. (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Intestinale Enterokokken mittels Slanetz-Bartley-Agar bei 37°C für 48 Stunden und anschließend weitere Inkubation auf Galle-Äskulin-Selektivagar bei 44°C für 20 Minuten. (VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA)
- *Staphylokokken spp.*, inkl. Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mittels MRSA-Selektivagar (in Abbildungen gekennzeichnet als Staphylokokken\*) bei 42°C für 24 Stunden. (MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland)
- *P. aeruginosa* mittels Cetrimidagar bei 42°C für 48 Stunden. (VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA)
- Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) mittels VRE-Selektivagar bei 42°C für 24 Stunden. (MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland)
- *Acinetobacter spp.* mittels Acinetobacter-Selektivagar bei 37°C für 24 Stunden. (MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland)

#### **2.4. Untersuchungen zur Multiresistenz bei Gram-negativen Bakterien (MRGN-Testung)**

Unterschiedliche Verdünnungen bzw. Volumina wurden, spezifische für jede Probenahmestelle, auf ESBL-Selektivagarplatten (MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland) ausgebracht.

- ESBL-resistente Bakterien (*E. coli*, KEC (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*), *Acinetobacter spp.* und *Pseudomonas spp.*) mittels ESBL Selektivagarplatten bei 42°C für 24 Stunden (Müller *et al.*, 2018).

Von den ESBL-Agarplatten wurden Bakterien stichprobenartig gepickt. Nach Möglichkeit wurde von jedem vorhandenen Kolonieausprägungstyp (siehe ESBL Kolonie Farbgebung des Herstellers) mindestens ein Isolat gepickt. Diese auf ESBL vorselektierten Kolonien wurden anschließend in Vollmedium ohne Zusätze (LB-Medium; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) über Nacht angereichert. Am nächsten Tag erfolgte die Herstellung von Glyzerinkulturen der gepickten Isolate, sowie ein erneutes Ausplattieren auf dem ESBL-Agarsystem zur Überprüfung der gepickten Koloniefärbung und zusätzlich auf einem selbst hergestellten Vollmedium Nährboden (LB-Agar), um potentielle Kontaminationen durch das Picken sichtbar zu machen. Die gewünschten Kolonien wurden anschließend im Multiresistenztest nach KRINKO verwendet. Die Typisierung der Bakterien erfolgte hierbei aufgrund der durch den Plattenhersteller angegebenen Farbgebung der Kolonien auf dem jeweiligen Selektivagar. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden insgesamt 29 Isolate aus den verschiedenen Probenahmestellen der unterschiedlichen Siedlungsgebiete gepickt und als Glyzerinkulturen für die Mehrfachresistenzanalysen aufbewahrt.

Für die Untersuchungen zur Mehrfachresistenz der vorselektierten ESBL-resistenten Bakterien wurde zunächst MH-Medium (Merck, Darmstadt, Deutschland) hergestellt und

autoklaviert. Dieses wurde für die Erstellung der Übernachtskulturen (ÜNK) aus den Glycerinkulturen benötigt. Die Inkubation der ÜNK wurde bei 37°C, 120 rpm und über Nacht durchgeführt.

Zur Prüfung auf multiresistente Bakterien wurde das Protokoll für den EUCAST-Blättchendiffusionstest verwendet. Für jede Übernachtskultur wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Die jeweilige Bakteriensuspension wurde so verdünnt, dass eine optische Dichte von 0,1 als Basiswert für die Inokulation der Agarplatten vorlag. Nun wurde ein steriles Wattestäbchen mit der Bakterienlösung getränkt und leicht am Rand des Gefäßes ausgedrückt, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Mithilfe des Stäbchens wurden anschließend die MH-Agarplatten gleichmäßig als Bakterienrasen inokuliert. Danach wurden die Antibiotikablättchen (MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland) auf den mit Bakterien inokulierten Agar ausgebracht (Tabelle 3).

Nach einer Inkubation von 16 – 20 h bei 37°C ließ sich der Durchmesser des Hemmhofs mit Hilfe einer Messlehre ablesen. Ein gebildeter Hemmhof zeigt die Sensibilität des Bakteriums gegenüber dem Antibiotikum an, während das Ausbleiben eines Hemmhofs die Resistenz anzeigt. Mit Hilfe des "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 9.0, 2019 <http://www.eucast.org>" wurde bewertet, ob eine Resistenz gegen das jeweilige Antibiotikum vorlag. Hierbei wurden nach der Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI) zu Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten Gram-negativen Stäbchen gearbeitet und die getesteten Bakterien nach ihrer Multiresistenz klassifiziert (Wendt *et al.*, 2012). Eine Multiresistenz gegen eine Antibiotikagruppe lag vor, sobald das Bakterium gegenüber mindestens einem Antibiotikum der Gruppe eine Resistenz vorwies.

**Tabelle 3: Auflistung der für die KRINKO relevanten getesteten Antibiotika im Multiresistenztest (Wendt *et al.*, 2012).**

<b>Einstufung der Mehrfachresistenz nach KRINKO</b>				
<b>Cephalosporin</b>		<b>Fluoroquinolon</b>		
5µg Cefotaxime CTX	10µg Ceftazidime CAZ	5µg Ciprofloxacin CIP	5µg Levofloxacin LEV	
<b>Carbapenem</b>		<b>Penicillin</b>		
10µg Imipenem IMI	10µg Meropenem MEM	30µg Piperacillin PRL	30/6µg Piperacillin/Tazobactam PTZ	30µg Temocillin TEM

## 2.5. Lebend/ Tot-Diskriminierung mittels Propidiummonoazid (PMA)

PMA ist eine Substanz, die in Zellen mit beeinträchtigten Membranen bzw. Membranpotentialen selektiv eindringt (Biswal *et al.*, 2014). Sobald sich PMA in der Zelle

befindet interkaliert dieses in die DNA und kann kovalent mit dieser verbunden werden, was jede nachfolgende PCR-Amplifikation inhibiert. Durch die Verwendung von PMA vor der DNA-Extraktion kann die Evaluierung von Desinfektionsverfahren auf die lebensfähigen Zellen mit intakter Zellmembran beschränkt werden und eine mögliche Überschätzung der molekularbiologisch ermittelten Abundanz vermieden werden. Das Protokoll für die PMA-Behandlung ist in Übereinstimmung mit früheren Studien (Nocker *et al.*, 2006, Nocker *et al.*, 2007b, Nocker *et al.*, 2007a, Nocker *et al.*, 2009, Villarreal *et al.*, 2013, Alexander *et al.*, 2016, Jäger *et al.*, 2018a) einschließlich des Phast-Blue-Photo-Activation Systems (GenIUL, Barcelona, Spanien), welches benötigt wird, um die Verbindung zwischen PMA und der DNA zu stabilisieren. Nach der Filtration der Abwasserproben auf Polycarbonatmembranen werden diese in ein 1,5 mL farbloses und transparentes Reaktionsgefäß (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und anschließend mit 300 µL der vorbereiteten PMA-Lösung (25µM; Biotium, Hayward, California, USA) bedeckt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 4 °C im Dunkeln erfolgt die UV-Licht gesteuerte Reaktion des PMA mit der DNA mit Hilfe des Phast-Blue-Photo-Activation Systems bei maximaler Intensität für 15 Minuten. Nach Abschluss der PMA-Behandlung erfolgt die DNA-Extraktion mittels des Spin Kits for Soil (MP Biomedical, Illkirch, Frankreich).

## **2.6. Durchführung der DNA-Extraktion**

Die Extraktion der DNA wurde mit dem Fast Spin Kit for Soil (MP Biomedical, Illkirch, Frankreich) durchgeführt. Hierfür wird ein mechanischer Zellaufschluss zu Beginn des Extraktionsverfahrens gewählt. Dazu wurden die einzelnen Membranen direkt in das Lysematrix E Reaktionsgefäß gegeben, mit Pufferlösungen aus dem Extraktions-Kit bedeckt und für den mechanischen Zellaufschluss im Ribolyser (MP Biomedical, Illkirch, Frankreich) bei Stufe 6 für 40 Sekunden geschüttelt. Die weiteren Schritte wurden entsprechend der Herstellerangaben im Protokoll durchgeführt. Um eine ausreichende Menge an DNA der einzelnen Proben zu erhalten, wurden die DNA-Extrakte mehrerer Membranen zusammengeführt. Für die späteren Auswertungen wurden das filtrierte Gesamtvolumen und die Gesamtelutionsmengen aus dem Extraktionsprozess berücksichtigt. Die anschließende DNA-Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Qubit TM 3.0 (Thermofisher scientific, Nidderau, Deutschland) durchgeführt.

## **2.7. Molekularbiologische Untersuchungen**

### **2.7.1. Quantifizierung der Belastungssituationen mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR)**

Die qPCR Untersuchungen wurden mittels eines Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detektionssystems (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt und mit Hilfe der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Analyse-Software (Bio-Rad CFX Manager Software)

ausgewertet. Zur Überprüfung der spezifischen Amplifikation des entsprechenden Genabschnitts folgt im Anschluss eines jeden Amplifikationslaufs eine Schmelzkurvenanalyse, bei der schrittweise (0,5 °C/Sekunde) die Temperatur von 60 °C auf 95 °C erhöht wird. Des Weiteren wurde von einzelnen Replikaten eine weitere Überprüfung des Amplifikats durchgeführt, indem die Auftrennung des Replikats in einer Gelelektrophoreseeinheit (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit einem 2 %-igen Agarosegel durchgeführt wurde. Die Auswertung des Gels erfolgte am Lumi-Imager (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland; Lumi-Imager Software (LumiAnalyst 3.1)).

Die extrahierte DNA der Proben wurde eingesetzt, um unterschiedliche taxonomischen Gene, sowie der verschiedenen Antibiotika-Resistenzgene mittels quantitativer PCR (qPCR) zu untersuchen (Tabelle 6-9). Jede DNA Probe wurde als technisches Triplikat gemessen. Bei den Analysen wurde stets eine NTC (No Template Control) für jeden verwendeten Parameter gemessen. Der Ansatz der jeweiligen Probe bestand aus 8,2 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA), jeweils 0.4 µl Primer (10µM, forward und reverse Primer) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 1 µl DNA Template (DNA-Probe), um ein Reaktionsvolumen von 20 µl zu erhalten. Die verwendete 96 Well Platte wurde nach Beladung bei 1080 rpm für 1 min zentrifugiert. Das folgende Temperaturprofil wurde für alle Messungen benutzt mit Ausnahme des *bla<sub>CMY-2</sub>* Gens, bei dem die Elongation bei 62°C für 1 Minute durchgeführt wurde. Die Auswahl der Primersysteme basiert auf den verwendeten Primersystemen des HyReKa-Projekts. Die dort verwendete Einteilung in taxonomische Parameter, sowie häufig, intermediär und selten vorkommende Resistenzen wurde übernommen. Die Primersysteme sind in den Tabellen 6-9 aufgeführt.

**Tabelle 4: Standardthermoprofil für die Untersuchungsparameter der qPCR Analysen aller Primersysteme, mit Ausnahme von *bla<sub>CMY-2</sub>*, welches 62 °C für die Anlagerung und Elongation benötigt, sowie das Sondensystem *bla<sub>VIM2</sub>*.**

Aktivierung der Polymerase	95°C 10 min		
Denaturierung:	95°C 15 sec	}	40x
Anlagerung und Elongation:	60°C 1 min		
Schmelzkurve:	65°C	↓	0.5°C pro 5 sec
	95°C		

Eine weitere Ausnahme bildet das Antibiotika-Resistenzgen *bla<sub>VIM2</sub>*. Hier wurde ein Primer-Sondensystem zur Detektion verwendet. Der Ansatz bestand aus 7,4 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl Taqman Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA), jeweils 0,6 µl Primer (10µM, forward und reverse Primer), 0,4 µl Sonde (10 µM) und 1 µl DNA Template, um ein Reaktionsvolumen von 20 µl zu erhalten.

Das Temperaturprofil setzte sich wie folgt zusammen.

**Tabelle 5: Thermoprofil für der Untersuchungsparameter *bla<sub>VIM2</sub>*, welcher als Sondensystem in der qPCR Analyse getestet wird.**

Aktivierung der Polymerase	50°C 2 min		
Denaturierung	95°C 10 min		
Denaturierung:	95°C 15 sec	}	40x
Anlagerung und Elongation	60°C 1 min		

**Tabelle 6: Molekularbiologische Untersuchungsparameter zur Detektion von fakultativ pathogenen Bakterien unter Verwendung von Primern spezieller Gene zur Identifikation unterschiedlicher Bakterienspezies oder -gruppen.**

	Zielgen		Primer	Amplicon	T [°C]	Referenz	Literatur
Taxonomie	<i>ddl</i>	For	CACCTGAAGAAACAGGC	475bp	60	<i>E. faecalis</i> ATCC51299	(Depardieu <i>et al.</i> , 2004)
		Rev	ATGGCTACTTCAATTTACAG				
	<i>yccT</i>	For	GCATCGTGACCACCTTGA	59bp	60	<i>E. coli</i> DSM1103	(Clifford <i>et al.</i> , 2012)
		Rev	CAGCGTGGTGGCAAAA				
	<i>ecfX</i>	For	AGCGTTCGTCCTGCACAAGT	81bp	60	<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	(Clifford <i>et al.</i> , 2012)
		Rev	TCCACCATGCTCAGGGAGAT				
	<i>gltA</i>	For	ACGGCCGAATATGACGAATTC	68bp	60	<i>K. pneumoniae</i> DSM 30104	(Clifford <i>et al.</i> , 2012)
		Rev	AGAGTGATCTGCTCATGAA				
	<i>secE</i>	For	GTTGTGGCTTTAGGTTTATTATACG	94bp	60	<i>A. baumannii</i> DSM 30007	(Clifford <i>et al.</i> , 2012)
		Rev	AAGTTACTCGACGCAATTCG				
	23S <i>rDNA</i>	For	AGAAATTCCAAACGAACTTG	93bp	60	<i>E. faecium</i> DSM 20477	(Volkman <i>et al.</i> , 2004)
		Rev	CAGTGCTCTACCTCCATCATT				
16S <i>rDNA</i>	For	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	195bp	60	<i>E. coli</i> Top10 (pNORM)	(Stalder <i>et al.</i> , 2014)	
	Rev	ATTACCGCGGCTGCTGG					

**Tabelle 7: Molekularbiologische Nachweissysteme für die untersuchten, häufig vorkommenden Antibiotika-Resistenzgenen (nach HyReKA).**

	Zielgen	Primer	Amplicon	T [°C]	Referenz	Literatur	
Antibiotika-Resistenzgene häufig vorkommend	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	For	TTCCTGTTTTTGCTCACCCAG	112bp	60	<i>E. coli</i> Top10 (pNORM)	(Stalder <i>et al.</i> , 2014)
		Rev	CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG				
	<i>ermB</i>	For	TGAATCGAGACTTGAGTGTGCAA	71bp	60	<i>S. hyointestinalis</i> DSM20770	(Alexander <i>et al.</i> , 2015)
		Rev	GGATTCTACAAGCGTACCTT				
	<i>tetM</i>	For	GGTTTCTCTTGGATACTTAAATCAATCR	88bp	60	<i>E. coli</i> DH5a	(Peak <i>et al.</i> , 2007)
		Rev	CCAACCATAYAATCCTTGTTTCRC				
	<i>sul1</i>	For	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	161bp	60	<i>E. coli</i> Top10 (pNORM)	(Czekalski <i>et al.</i> , 2012)
		Rev	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG				
<i>int1</i>	For	GCC TTG ATG TTA CCC GAG AG	196bp	60	<i>E. coli</i> Top10 (pNORM)	(Barraud <i>et al.</i> , 2010)	
	Rev	GAT CGG TCG AAT GCG TGT					

**Tabelle 8: Molekularbiologische Nachweissysteme für die untersuchten, intermediär vorkommenden Antibiotika-Resistenzgenen (nach HyReKA).**

	Zielgen	Primer	Amplicon	T [°C]	Referenz	Literatur	
Antibiotika-Resistenzgene intermediär vorkommend	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	For	CGTTAATCGCACCATCACC	172bp	62	<i>K. pneumoniae</i> NRZ-01013	(Kurpiel & Hanson, 2011)
		Rev	CGTCTTACTAACCGATCCTAGC				
	<i>qnrS</i>	For	GACGTGCTAACTTGCGTGAT	118	60	<i>E. coli</i> Top10 (pNORM)	(Marti & Balcázar, 2013)
		Rev	TGGCATTGTTGGAAACTTG				
	<i>bla<sub>ctx-M32</sub></i>	For	CGTCACGCTGTTGTTAGGAA	155bp	60	<i>E. coli</i> Top10 (pNORM)	(Stalder <i>et al.</i> , 2014)
		Rev	CGCTCATCAGCACGATAAAG				
	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	For	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	177bp	60	<i>K. pneumoniae</i> TGH Isolat 2	(Monteiro <i>et al.</i> , 2012)
		Rev	GTAAMRATGCTTGGTTTCGC				
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	For	CGCTTTGCGATGTGCAG	551bp	60	<i>E. coli</i> DSM 22664	(Paterson <i>et al.</i> , 2003)	
	Rev	ACCGCGATATCGTTGGT					

**Tabelle 9: Molekularbiologische Nachweissysteme für die untersuchten, selten vorkommenden und als besonders kritisch zu wertende Antibiotika-Resistenzgene (nach HyReKA).**

	Zielgen		Primer	Amplicon	T [°C]	Referenz	Literatur
Antibiotika-Resistenzgene selten und als besonders kritisch zu werten	<i>mecA</i>	For	CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA	91bp	60	<i>S. aureus</i> A1	(Volkman <i>et al.</i> , 2004)
		Rev	TGGTCTTTCTGCATTCTGGA				
	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	For	TTGGCCTTGCTGTCCTTG	82 bp	60	<i>K. pneumoniae</i> TGH Isolat 1	(Monteiro <i>et al.</i> , 2012)
		Rev	ACACCAGTGACAATATCACCG				
	<i>bla<sub>VIM2</sub></i>	For	GAGATTCCCACGCACTCTCTAGA	93bp	60	<i>P. aeruginosa</i> (Pa49)	(van der Zee <i>et al.</i> , 2011)
		Rev	AATGCGCAGCACCAGGATAG				
		probe	ACGCAGTGCGCTTCGGTCCAGT				
	<i>vanA</i>	For	TCTGCAATAGAGATAGCCGC	376bp	60	<i>E. faecium</i> B7641	(Klein <i>et al.</i> , 1998)
		Rev	GGAGTAGCTATCCCAGCATT				
	<i>bla<sub>KPC-3</sub></i>	For	CAGCTCATTCAAGGGCTTTC	196bp		<i>K. pneumoniae</i> TGH Isolat	(Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009)
	Rev	GGCGGCGTTATCACTGTATT					
	<i>mcr-1</i>	For	GGGCCTGCGTATTTAAGCG	183bp	60	<i>E. coli</i> NRZ-14408	(Hembach <i>et al.</i> , 2017)
		Rev	CATAGGCATTGCTGTGCGTC				

Tabelle 10: Geradengleichungen aller Untersuchungsparameter zur Berechnung der Zelläquivalente.

	Untersuchungsparameter	Steigung	y-Achsenabschnitt	R <sup>2</sup>	Effizienz [%]
Taxonomie	<i>Eubacteria (16S rDNA)</i>	-3,406	36,36	0,997	96,6
	<i>E. coli (yccT)</i>	-3,361	35,797	0,994	98,4
	<i>P. aeruginosa (ecfX)</i>	-3,282	35,276	0,999	101,7
	<i>K. pneumoniae (gltA)</i>	-3,387	38,844	0,998	97,4
	<i>A. baumannii (secE)</i>	-3,38	35,679	1	97,6
	<i>Enterokokken (23S rDNA)</i>	-3,585	35,283	1	90,1
	<i>E. faecalis (ddl)</i>	-3,472	35,447	0,999	94,1
häufig vorkommend	Integrase 1 ( <i>intl1</i> )	-3,472	36,364	1	94,1
	Erythromycin Resistenz ( <i>ermB</i> )	-3,328	35,901	1	99,7
	Tetracyclin Resistenz ( <i>tetM</i> )	-3,424	38,747	0,998	95,9
	Sulfonamid Resistenz ( <i>sul1</i> )	-3,387	39,802	0,999	97,4
	β-Laktam Resistenz ( <i>TEM</i> )	-3,03	38,559	0,999	100,8
	Quinolon Resistenz ( <i>qnrS</i> )	-3,448	35,589	0,999	95
intermediär vorkommend	β-Laktam Resistenz ( <i>CMY-2</i> )	-3,591	34,026	0,998	89,9
	β-Laktam Resistenz ( <i>ctx-M</i> )	-3,504	34,255	1	92,9
	β-Laktam Resistenz ( <i>ctx-M32</i> )	-3,517	37,83	1	92,5
	β-Laktam Resistenz ( <i>OXA-48</i> )	-3,54	36,913	0,998	91,6
selten und als besonders kritisch zu wertend	β-Laktam Resistenz ( <i>mecA</i> )	-3,327	34,887	1	99,8
	β-Laktam Resistenz ( <i>NDM-1</i> )	-3,293	35,877	0,99	101,2
	β-Laktam Resistenz ( <i>VIM2</i> )	-3,538	36,98	0,999	91,7
	β-Laktam Resistenz ( <i>KPC-3</i> )	-3,457	38,837	0,999	94,6
	Vancomycin Resistenz ( <i>vanA</i> )	-3,541	33,078	1	91,6
	Colistin Resistenz ( <i>mcr-1</i> )	-3,386	35,349	0,999	97,4

Die Berechnung der Zelläquivalente beruht auf einer absoluten Quantifizierung durch die qPCR. Klinische Isolate, die das jeweilige Antibiotikaresistenzgen oder das spezie-spezifische Markergen enthielten, dienten als Referenz zur Erstellung einer Kalibriergeraden. Durch die bekannten Genomgrößen der Referenzbakterien war es möglich, die Zellkopien zu berechnen. Folgende Gleichung wurde mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht für ein Basenpaar von etwa 650 g/ mol, der Avogadro-Zahl mit  $6,022 \times 10^{23}$  Molekülen/ mol und einem Umrechnungsfaktor von  $10^9$  ng/ g verwendet.

Anzahl an Kopien = (Menge an DNA [ng] \*  $6.022 \times 10^{23}$  [Moleküle/ mol]) / (Fragment-/ Genomlänge [bp] \*  $1 \times 10^9$  [ng/ g] \* 650 [g/ mol an bp]), nach Andrew Staroscik, 29 January 2004 (<https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

Eine serielle Verdünnungsreihe mit extrahierter DNA aus Referenzbakterien diente der Berechnung der Kalibrierungskurven. Der Bestimmungskoeffizient aller Standardkurven lag in allen Experimenten über 0,994, was auf eine minimale Variabilität innerhalb des linearen Datenbereichs hinweist. Unter Verwendung dieser Kurven wurden die gemessenen Ct-Werte eines Antibiotikaresistenzgens oder die der taxonomischen Genmarker aus einer Wasserprobe einer Zellzahl zugeordnet.

Der Hauptanteil an Mikroorganismen in einer natürlichen Population besteht aus weitestgehend nicht charakterisierten 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. Für die Erstellung der entsprechenden Kalibrierungskurven erfolgte unter Verwendung von extrahierter DNA aus den verschiedenen Referenzbakterien, die mit Hilfe des oben genannten DNA-Extraktionskits isoliert wurde. Für jeden der untersuchten Parameter wurde eine Regressionsgerade erstellt, indem eine Verdünnungsreihe der extrahierten DNA des entsprechenden Referenzstamms verwendet wurde, um die genspezifischen Zelläquivalente zu berechnen (Tabelle 10). Für die Berechnung der entsprechenden Zelläquivalente aus den qPCR-Daten wurden Kalibriergeraden verwendet, welche zuvor in der Abteilung erstellt wurden (Hembach *et al.*, 2017). Die Berechnung der Zelläquivalente erfolgte auf Basis der Genom-/Plasmidgrößen der Referenzbakterien. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Bezeichnung Zelläquivalente verwendet, da die Kalibriergeraden mit Hilfe entsprechender Referenzbakterien angefertigt wurden. Hierbei ist es möglich, dass einzelne Gene innerhalb der genomischen DNA des entsprechenden Referenzbakteriums in höherer Kopienzahl vorliegen können, wodurch eine Aussage zur Genhäufigkeit nicht getroffen werden kann. Für eine solche Interpretation wäre ein Ansatz mit Plasmiden nötig, in welchem eine definierte Anzahl an Genkopien vorhanden sind. Bei der Verwendung von Referenzbakterien wird deshalb von Zelläquivalenten gesprochen.

Die Ct-Werte der Abwasserproben wurden an die entsprechende Regressionsgerade angepasst und auf 100 mL, bzw. 100 ng Probenvolumen normiert.

Gleichung zur Berechnung der Zelläquivalente:

$$\text{Exp}^{((x-y\text{-Achsenabschnitt})/(\text{Steigung}))} = \text{Anzahl der Zelläquivalente, mit } x = \text{Ct-Wert des untersuchten Gens. Die entsprechenden Angaben zu den einzelnen Genen sind in Tabelle 10 aufgelistet.}$$

$\text{Exp}^{((x-(y\text{-Achsenabschnitt}))/(\text{Steigung}))} / \text{gemessene DNA Konzentration [ng/}\mu\text{L]} \times 100 = \text{Anzahl der Zelläquivalente} / 100 \text{ ng DNA, mit } x = \text{Ct-Wert des untersuchten Gens.}$

$\text{Exp}^{((x-(y\text{-Achsenabschnitt}))/(\text{Steigung}))} / (\text{Elutionsvolumen} / \text{filtriertes Abwasservolumen}) \times 100 = \text{Anzahl der Zelläquivalente} / 100 \text{ mL Abwasservolumen, mit } x = \text{Ct-Wert des untersuchten Gens.}$

## **2.8. Populationsanalysen mittels einer Illumina Shotgun Metagenomdatenanalyse**

DNA-Proben des Ozonzulaufs (Ablauf Nachklärbecken) und des Ozonablaufs wurden mittels einer Shotgun Metagenomdatenanalyse untersucht, um detaillierte Einblicke in die Auswirkung der Ozonbehandlung auf die bakterielle Population zu erhalten. Auch der Einfluss einer PMA-Behandlung wurde anhand der Metagenomanalyse untersucht. Vor der Sequenzierung wurde 1  $\mu\text{g}$  genomischer DNA der untersuchten Proben nach Herstellerprotokoll TruSeqDNA (Illumina, San Diego, CA, USA) für die Metagenomanalyse vorbereitet. Hierbei wurde die genomische DNA durch eine Ultraschallbehandlung in etwa 200 bp (Basenpaare) lange Abschnitte fragmentiert. Dabei wurde ein Covaris S2 Instrument (Woodingdeau Brighton, UK) mit folgenden Einstellungen verwendet: 175 W Spitzeninzidenz, 10% relative Einschaltdauer, 200 Zyklen pro Impuls, 430 Sekunden. Die Größen und Konzentrationen der Sequenzierungsbibliotheken wurden an einem Bioanalyzer 2100 (DNA1000 chips, Agilent, Santa Clara, CA, USA) gemessen. Es wurde eine „paired-end“ Sequenzierung (2x 100 bp) auf 2 Bahnen (lanes) auf einer Illumina HiSeq 1500 Plattform unter Verwendung des TruSeq PR Cluster Kit v3-cBot-HS und des TruSeq SBS Kit v3-HS durchgeführt. Eine Clustererkennung und „base-calling“ wurden mit RTA v 1.13 durchgeführt und die Qualität mit Casava v 1.811 (Illumina) bewertet. Die Sequenzierung resultierte in 21 Mio. Paaren 100 bp langer Reads (Lesevorgänge) für jede Probe und einen mittleren Phred-Qualitätswert von  $> 35$ . Die Rohdaten wurden unter Verwendung des fastq-mcf-Tools des ea-utils-Softwarepakets getrimmt und gefiltert (Aronesty, 2011), um unzureichende sowie Illumina-Adaptersequenzen zu entfernen. Die so erhaltenen Daten wurden mit MetaPhlan2 (Truong *et al.*, 2015) analysiert, um die taxonomische Populationszusammensetzung zu bestimmen. Des Weiteren wurde ein sog. Unähnlichkeitskoeffizient nach Yue-Clayton berechnet (Yue & Clayton, 2005). Ein Koeffizient mit dem Wert 0 weist auf eine vollständige Übereinstimmung zwischen den Populationsstrukturen der beiden Proben hin, wohingegen ein Wert von 1 eine komplett unterschiedliche Populationszusammensetzung darstellt. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Andreas Dötsch am Institut für funktionelle Grenzflächen des KITs durchgeführt und anschließend wurden die Rohdaten von Herrn Dr. Dötsch nach dem oben beschriebenen Verfahren analysiert.

## **2.9. Antikörper basiertes Nachweissystem zur Detektion unterschiedlicher DNA Schäden**

Für die Analyse der DNA-Schäden mit Antikörpern wurden die Proben direkt mit RNA-Protect (ThermoFisher scientific, Nidderau, Deutschland) im Verhältnis 1:2 gemischt, um einen weiteren Abbau der geschädigten Bakterien zu verhindern. Triplikate jeder Probenahmestelle wurden analysiert. Hierfür wurden 200 µL der Proben in die Vertiefung einer Slot-blot-Apparatur (Bio-dot SF Apparatur, Bio-Rad, München, Deutschland) gegeben und auf eine positiv geladene Nylonmembran (Bio-Rad, München, Deutschland) geblottet. Die Zellyse wurde direkt auf der Nylonmembran durchgeführt. Dazu wurde die Membran auf 3 Filterpapieren (12 x 9 cm, Bio-Rad, München, Deutschland) platziert, welche mit einer Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH, pH 13) getränkt waren. Zusätzlich wurden zur Probe 500 µL Denaturierungslösung gegeben, welche anschließend über eine Dauer von 20 Minuten mittels einer Vakuumpumpe entfernt wurde. Insgesamt wurde der Denaturierungsschritt dreimal wiederholt. Anschließend folgte eine zweimalige Neutralisation mittels der Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl (pH 7,2), 1 mM EDTA (pH 8)), gefolgt von einem Waschschrift mit 300 µL TBS-Puffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5)). Im Anschluss wurde die Membran aus der Apparatur genommen und auf ein sauberes und trockenes Filterpapier gelegt und für 15 Minuten getrocknet. Die anschließende Immunreaktion wurde in Hybridisierungsröhrchen bei ständiger Rotation (Minioven, Appligene S.A.R.L., Heidelberg, Germany) durchgeführt. Zunächst erfolgt die Blockierungsreaktion mit 5% Magermilchlösung bei RT für eine Stunde. Anschließend wurde die Membran zweimal mit TTBS-Puffer (TBS-Puffer mit Tween 20 im Verhältnis 1/100) ebenfalls bei RT für 5 Minuten gewaschen. Danach erfolgte die Bindung des Primär-Antikörpers (entweder CPD- oder 6-4-PP-Antikörper; Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan) (1:2000 Verdünnung mit Magermilchlösung) für 30 Minuten bei 37 °C. Auf diesen Schritt folgte ein zweimaliges Waschen mit TTBS-Puffer bei RT für je 5 Minuten. Anschließend wurde der Sekundär-Antikörper (IgG-AP; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) (1:2000 Verdünnung in Magermilchlösung) zugegeben und bei RT 1 Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschriften mit TTBS für je 5 Minuten, gefolgt von 2 weiteren Waschschriften mit TBS für ebenfalls je 5 Minuten. Im nächsten Schritt erfolgte das Equilibrieren der Membran mit Hilfe des Detektionspuffers (Kit-Angaben, 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) für weitere 5 Minuten bei RT. Letztlich wurde die Membran aus dem Hybridisierungsröhrchen auf eine Klarsichtfolie überführt und mit 1 mL CSPD ready-to-use Reagenz aus dem Detektions-Kit angefärbt (CSPD ready to use, DIC High Prime DNA labeling and detection Starter Kit II, Roche). Die Färbung wurde im Dunkeln bei 37 °C für 10 Minuten durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auswertung der auf die Membran

geblotteten Proben am Lumi-Imager (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland; Lumi-Imager Software (LumiAnalyst 3.1)).

### **3. Ergebnisse**

Der Ergebnisteil gliedert sich, wie bereits in der Einleitung unter Kapitel 1.8 beschrieben, in Untersuchungen an einem lokalen Standort, Untersuchungen an verschiedenen Standorten einer Region und Untersuchungen im Rahmen eines EU-Projekts.

#### **3.1. Lokale Untersuchungen an einer Großkläranlage**

##### *Konventioneller Betrieb*

Um gezielt Untersuchungen an einer ausgewählten lokalen Kläranlage durchführen zu können, die auch die Möglichkeit bietet erweiterte Reinigungstechniken zu untersuchen, wurde die nachfolgend beschriebene Kläranlage als exemplarische Versuchskläranlage ausgewählt. Die untersuchte Großkläranlage Zweckverband Kläranlage (ZVK) Steinhäule in Neu-Ulm erstreckt sich auf einer Fläche von 25 Hektar. Abwasser von ca. 440.000 Einwohnerwerten werden täglich gereinigt, was je nach Niederschlagsmenge einem Volumen zwischen 80.000 bis 225.000 m<sup>3</sup> (ca. 40 Mio. m<sup>3</sup>/ Jahr) entspricht. Ungefähr 50 % des Abwassereintrags stammen aus der Industrie und dem Gewerbe. Täglich entstehen ca. 20 – 40 Tonnen Schlamm (Trockensubstanz), die der thermischen Verwertung zugeführt werden.

Während der ersten Reinigungsschritte an der Großkläranlage durchlief das ungeklärte Abwasser einen belüfteten Sand- und Fettfang, eine Feinrechenanlage und das Vorklärbecken. Die hier untersuchten Proben wurden aus dem Ablauf des Vorklärbeckens genommen (Abbildung 6). Die Probenahmestelle wurde im Folgenden als „mechanische Reinigung“ bezeichnet. Die nachfolgende biologische Klärung setzt sich in der untersuchten Großkläranlage aus der biologischen Reinigung (Belebungsbecken) und einer chemischen Reinigung (Phosphorelimination mittels Aluminium-/ Eisensalze) zusammen. Hierbei werden zunächst biologische Verunreinigungen und organisch gebundene Stoffe entfernt, wie Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor. In der anschließenden chemischen Reinigung werden Fällmittel zugegeben, die den restlichen, in der biologischen Reinigung nicht entfernten Phosphor binden. Dieser wird im Nachklärbecken aus dem Abwasser entfernt. Der Ablauf des Nachklärbeckens diente hier als Probenahmestelle (Abbildung 6). Während des darauffolgenden Reinigungsschritts mittels Pulveraktivkohle werden zunächst im Kontaktreaktor Arzneimittel, Chemikalien, Hormone, etc. durch die Pulveraktivkohle adsorbiert. Anschließend wird die Aktivkohle über ein Sedimentationsbecken abgeschieden. Das Abwasser wird anschließend, um weitere übrig gebliebene Feststoffe zu entfernen, durch eine Sandfilteranlage geleitet. Das gereinigte Abwasser wird nun in den Fluss eingeleitet (Abbildung 6).

### *Erweiterte Verfahrenstechniken*

In den konventionellen Klärprozess wurde über einen Bypass eine Ozon-Pilot-Anlage (OCS-GSO30, Wedeco, 480 L Volumen) in halb-technischem Maßstab zur Untersuchung der weiteren Verbesserung der Abwasserqualität installiert. Als Zulauf wurde Abwasser aus dem Nachklärbecken nach der biologischen Klärung verwendet, das anschließend mit 1 g Ozon/ g DOC bei einer Flussrate von ca. 7 m<sup>3</sup>/ h (entspricht einer Kontaktzeit von ca. 4 Minuten) in der Pilot-Anlage behandelt wurde. Für die UV-Behandlung wurde eine Intensität von 400 J/ m<sup>2</sup> verwendet. Zuvor wurde die Trübung der Abwasserprobe bestimmt, um die entsprechende Bestrahlungsdauer einzustellen. Hierfür wurde eine von der Firma Xylem eigens hergestellte Apparatur verwendet (collimated beam device, Quecksilber-Niederdrucklampe (254 nm)). Die Untersuchungen zur UV-Behandlung wurden in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der Firma Xylem GmbH durchgeführt. Diese genannte Bestrahlungsintensität kam auch bei den Kombinationsversuchen zum Einsatz, bei denen zunächst die Ozonbehandlung durchgeführt wurde, gefolgt von der UV-Behandlung

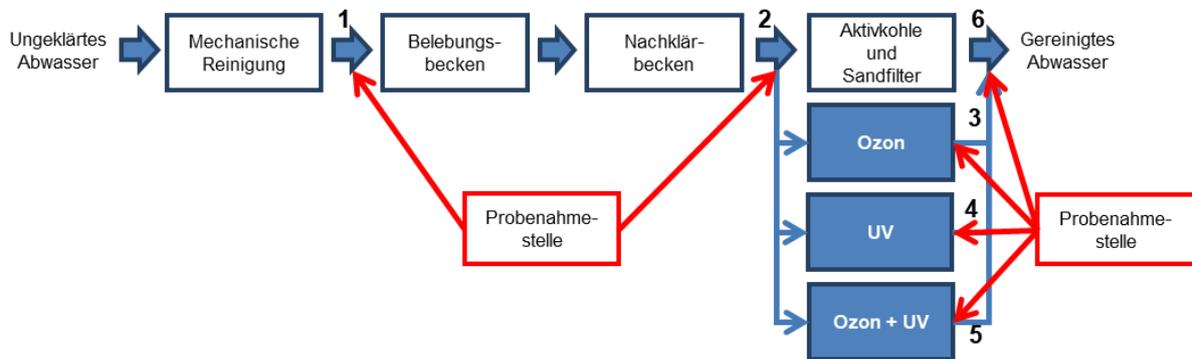
### *Probennahmen und Statistik*

Im Fall der Untersuchungen zur Erfassung der Belastungssituation und dem Effekt einer Ozonbehandlung wurden insgesamt 10 qualifizierte Stichproben genommen. Die Proben wurden jeweils an einem Tag in den Monaten Mai 2015, Juli 2015, September 2015, Oktober 2015 genommen. Im März 2016 und September 2016 wurden 3 Tage in Folge beprobt, was zu einer Gesamtanzahl von insgesamt 10 Einzelproben führt.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Kombination von Abwassertechniken konnten insgesamt vier Probenahmen durchgeführt werden. Diese fanden im September 2016, März 2017, Juli 2017 und Oktober 2017 statt. Neben den molekularbiologischen Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen, wurden zusätzlich immunologische Analysen zum Auftreten von DNA-Schäden durchgeführt. Untersucht wurden hier die Ozonbehandlung, die UV-Behandlung, sowie die Kombination aus beiden erweiterten Verfahrenstechniken.

Wie in Abbildung 6 und in Tabelle 11 gezeigt, wurden unterschiedliche konventionelle und erweiterte Reinigungsstufen untersucht. Zum einen wurden die Belastungssituation nach der mechanischen Reinigung (1), der biologischen Reinigung (2) und nach der Ozonbehandlung (3) untersucht. Hierbei wurden mithilfe von molekularbiologischen Methoden die absoluten Häufigkeiten, als auch die relativen Abundanzen der verschiedenen bakteriellen Untersuchungsparameter (Taxonomie und Antibiotikaresistenzen) analysiert. Darüber hinaus wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Reduktionseffizienzen der eingesetzten erweiterten Behandlungsmethoden untersucht. Hierbei wurden zum einen die allgemeine

Reduktion im konventionellen Reinigungsprozess der Kläranlage an den Probenahmestellen 1, 2 und 6 untersucht (Abbildung 6 und 9). Zum anderen wurden die Reduktionsleistungen der erweiterten Verfahren an den Probenahmestellen 3, 4 und 5 analysiert (Abbildung 6 und 11). Als Vergleichswert für die Reduktions-Effizienz der erweiterten Maßnahmen wurden die Wässer direkt nach der biologischen Reinigungsstufe (Probenahmestelle 2) verwendet.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Probenahmestellen für die lokalen Untersuchungen an der Großkläranlage. Die Probenahmestellen sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Als Probenmaterial dienen die Abläufe der entsprechenden Reinigungsstufen oder erweiterten Verfahrenstechniken. Gezeigt sind alle an der Großkläranlage untersuchten Probenahmestellen.

**Tabelle 11:** Auflistung der untersuchten Probenahmestellen, die in Abbildung 6 aufgeführt sind.

Probenahmepunkt	Probenahmebezeichnung
1	Ablauf mechanische Reinigung
2	Ablauf Nachklärbecken (NKB)
3	Ablauf Ozonung
4	Ablauf UV-Behandlung
5	Ablauf Kombination (Ozon und UV)
6	Kläranlagenablauf

### 3.2. Die Belastungssituation mit fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs nach der mechanischen Abwasseraufbereitung

#### 3.2.1. Absolute Quantifizierung von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung

Die allgemeine bakterielle absolute Belastung im Ablauf der mechanischen Reinigung, der Probenahmestelle 1 (Abbildung 6), wurde durch die qPCR-Quantifizierung des 16S rDNA Gens für *Eubacteria* angezeigt und betrug durchschnittlich  $2,21 \times 10^{10}$  Zelläquivalente/ 100 mL.

Spezifische qPCR Systeme für taxonomische Parameter wurden gewählt, um fakultativ pathogene Bakterien zu quantifizieren. Für *E. coli* (*yccT*) wurde ein mittlerer Wert von  $1,28 \times 10^7$

Zelläquivalenten/ 100 mL, für Enterokokken (23S rDNA) von  $1,25 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 mL und für *P. aeruginosa* (*ecfX*) ein Messwert von  $1,59 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL ermittelt. In Klammern sind die spezifischen Zielgene benannt, die für die Detektion ausgewählt wurden (Kapitel 2.7) Die Untersuchungen zur Unterscheidung zwischen der lebenden und toten Fraktion der Population mittels einer PMA-Behandlung (siehe Kapitel 2.5) führte im Ablauf der mechanischen Reinigung zu keinen deutlichen Unterschieden in den nachgewiesenen Abundanzen der taxonomischen Untersuchungsparameter. So konnte nach der PMA-Behandlung für das allgemeine bakterielle ribosomale Markergen, 16S rDNA, ein absoluter Wert von  $1,69 \times 10^{10}$  Zelläquivalenten/ 100 mL für *Eubacteria* gemessen werden. Auch die weiteren spezifischeren taxonomischen Markergene wiesen im Vergleich zu den nicht PMA-behandelten Proben keine deutlichen Unterschiede auf. Hier konnten Häufigkeiten von  $1,09 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 mL für *E. coli*,  $8,21 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 mL für Enterokokken und von  $2,06 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL für *P. aeruginosa* nach PMA-Behandlung erzielt werden (Abbildung 7A).

Bei der Betrachtung der untersuchten Antibiotikaresistenzgene im Ablauf der mechanischen Reinigung konnten auch hier hohe Belastungen für alle gewählten Parameter gemessen werden. Auch das Integrase 1 Gen (*intl1*), das einen Hinweis auf den horizontalen Gentransfer von Integrons und damit auch von ARGs gibt, konnte mit einer absoluten Häufigkeit von  $5,39 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 mL detektiert werden. Eine Lebend/ Tot-Diskriminierung mit Hilfe von PMA lieferte einen fast identischen mittleren Wert von  $5,24 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 mL und unterstreicht, dass der Nachweis der Gene auf der Anwesenheit von lebenden Trägerorganismen beruht (Abbildung 7A). Das Quinolonresistenz vermittelnde Gen *qnrS* konnte im Ablauf der mechanischen Reinigung in vergleichbar hohen Häufigkeiten von  $4,03 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 mL ohne PMA Behandlung und mit  $9,50 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 mL mit PMA Behandlung quantifiziert werden. Die Differenz der Messung lag jedoch im Rahmen der Standardabweichung und ist daher nicht signifikant.

Im Fall der untersuchten Gene, die zur nachfolgenden Technikbewertung herangezogen werden, wurde die höchste Belastung im Ablauf der mechanischen Reinigung für das Erythromycin-Resistenzgen *ermB* mit  $2,95 \times 10^9$  Zelläquivalenten/ 100 mL gemessen. Das Sulfonamid-Resistenz vermittelnde Gen *sul1* wies hier eine absolute mittlere Häufigkeit von  $2,47 \times 10^8$  Zelläquivalenten/ 100 mL auf. Das  $\beta$ - Laktam-Resistenzgens *bla<sub>TEM</sub>* konnte mit einer Häufigkeit von  $9,60 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 mL detektiert werden. Mit einer vorherigen PMA-Behandlung konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Die Messwerte erreichten hier Werte von  $2,11 \times 10^9$  Zelläquivalenten/ 100 mL für das Resistenzgen *ermB*,  $2,26 \times 10^8$  Zelläquivalenten/ 100 mL im Fall des Sulfonamid-Resistenzgens *sul1* und  $8,63 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 mL für das Resistenzgen *bla<sub>TEM</sub>*. Im Fall des  $\beta$ - Laktam-

Resistenzgens *bla<sub>ctx-M32</sub>* lagen die Messwerte im Ablauf der mechanischen Reinigung bei  $2,86 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 mL und nach einer PMA-Behandlung bei einem annähernd identischen Wert von  $2,75 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 mL.

Die klinisch relevanten Resistenzgene, die für eine Risikobewertung herangezogen werden müssen, sind die Resistenzgene gegen Methicillin in Staphylokokken *mecA* und Vancomycin *vanA* in Enterokokken. Diese beiden Resistenzdeterminanten konnten ebenfalls im Ablauf der mechanischen Reinigung nachgewiesen werden, zeigten jedoch vergleichsweise geringere absolute mittlere Belastungen von  $7,59 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL für die Methicillin-Resistenz *mecA* und von  $9,90 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 ml für das Vancomycin-Resistenz vermittelnde Gen *vanA*. Nach der PMA-Behandlung lagen die Messwerte bei  $4,27 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 ml für *mecA* und  $6,15 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL für das Resistenzgen *vanA* vergleichbar hoch (Abbildung 7A).

**Fazit: Nach der mechanischen Reinigung konnten hohe Belastungen mit fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs festgestellt werden. Da es sich hierbei um keine Bakterien reduzierende Reinigungstechnologie handelt, zeigte eine PMA-Behandlung keine Effekte bei der Lebend/ Tot-Diskriminierung. Demzufolge werden hohe absolute Zellzahlen an fakultativ pathogen und Antibiotika-resistenten Bakterien mit diversen Abwässern in die Kläranlage eingetragen.**

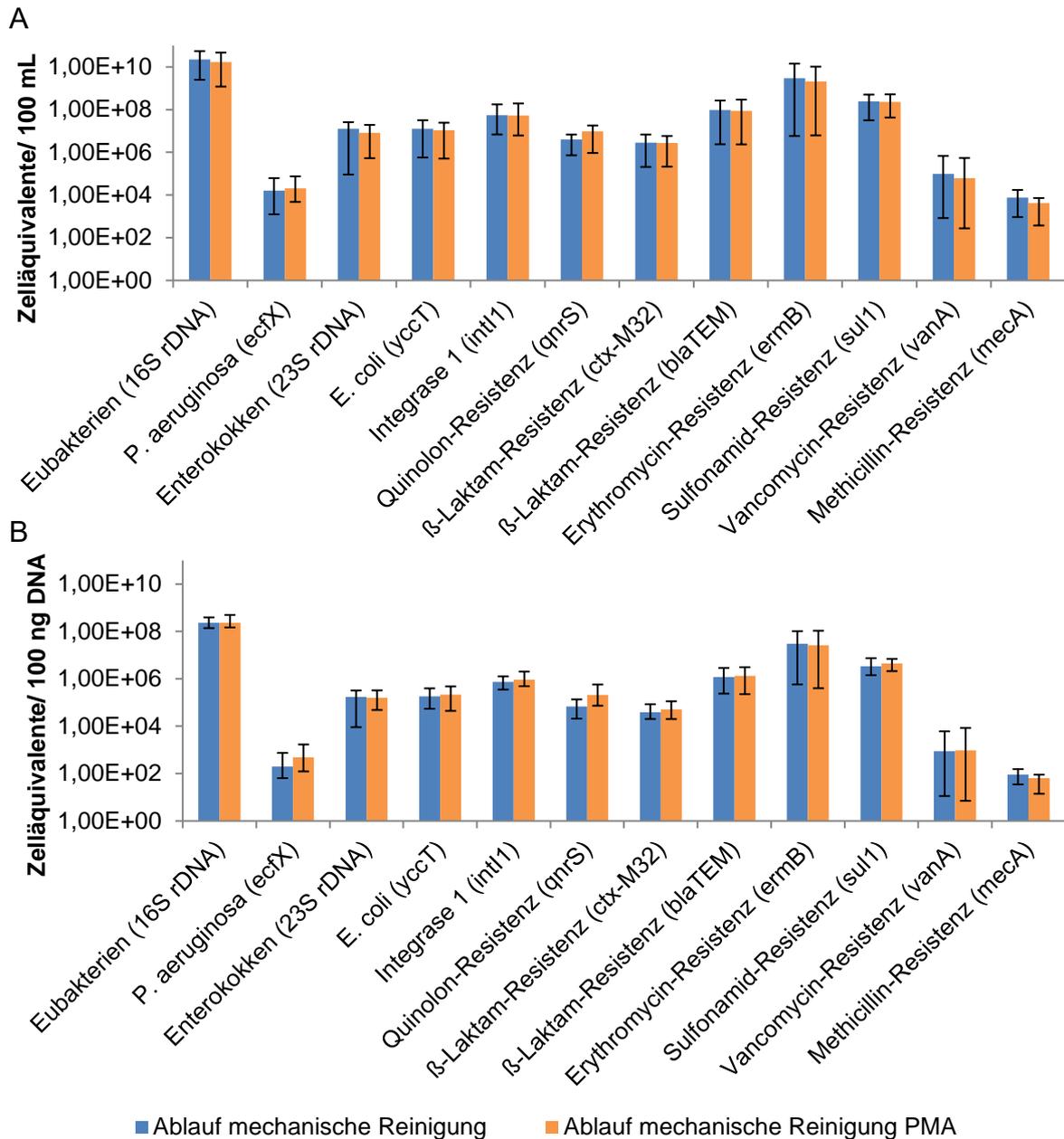


Abbildung 7: Belastungssituationen im Ablauf der mechanischen Reinigung. In A) sind die absoluten Belastungen, dargestellt durch die qPCR Ergebnisse, die auf 100 mL Abwasservolumen normiert wurden, gezeigt. In B) ist die relative Belastungssituation im Ablauf der mechanischen Reinigung, dargestellt durch die qPCR Ergebnisse der untersuchten Markergene gezeigt. Eine Normierung der Daten erfolgte auf 100 ng DNA. In blau sind die nicht mit PMA behandelten Messungen gezeigt. In orange sind die Ergebnisse der Lebend/ Tot-Differenzierung mittels PMA dargestellt.

### 3.2.2. Relative Häufigkeiten von ARB und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung

Alternativ zu der absoluten, Volumen-bezogenen Bewertung von bakteriellen Belastungssituationen, ist der Bezug auf die relativen Abundanzen (hier: normiert auf 100 ng DNA) aufzuführen (siehe Kapitel 2.7). Bei diesem Ansatz wurde der Bezug zur Gesamtpopulation hergestellt, d.h. der relative Anteil eines Parameters in der Gesamtheit der extrahiert DNA der vorherrschenden Population. Dadurch ist es möglich, spezifische und

selektive Verschiebungen innerhalb einer vorherrschenden Population durch z.B. Behandlungsprozessen zu erkennen.

Hier lag die allgemeine mittlere relative Belastung der *Eubacteria* (16S rDNA) bei  $2,37 \times 10^8$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA und bei einer vergleichbaren relativen Abundanz von  $2,31 \times 10^8$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA nach einer PMA-Behandlung. Für das *E. coli* spezifische Gen *yccT* lag die relative Häufigkeit im Ablauf der mechanischen Reinigung bei  $1,84 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA und konnte durch das Behandeln mit PMA einen vergleichbaren mittleren Wert von  $2,14 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA erreichen. In diesem Bereich konnte auch das Enterokokken spezifische Gen *23S rDNA* detektiert werden. Die relative Häufigkeit im Ablauf der mechanischen Reinigung lag bei  $1,71 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA. Durch die PMA Behandlung wurde dieser Werte nur minimal reduziert, so dass hier ein Wert von  $1,57 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA nach der PMA-Behandlung messbar war. Für das taxonomische Markergen von *P. aeruginosa* (*exfX*) lag die relative mittlere Abundanz im Ablauf der mechanischen Reinigung bei  $2,01 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA. Durch das Entfernen der DNA toter, bzw. geschädigter Bakterien stieg der relative Anteil von *P. aeruginosa* leicht an, sodass hier  $4,83 \times 10^2$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA, nachweisbar waren, was jedoch noch im Rahmen der Standardabweichungen lag (Abbildung 7B).

Das untersuchte Integrase 1 Gen (*intl1*) wies eine relative Häufigkeit von  $7,37 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA im Ablauf der mechanischen Reinigung auf. Nach einer PMA Behandlung wurde ein annähernd gleicher Wert der relativen Häufigkeit von  $9,30 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA im Ablauf der mechanischen Reinigung erreicht. Im Fall der untersuchte Resistenzgene lag der Messwert der Quinolonresistenz bei  $6,86 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA. Die relative Abundanz nach der PMA Behandlung lag bei  $2,10 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA. Das untersuchte Resistenzgen *ermB* konnte innerhalb der Population des Ablaufs der mechanischen Reinigung mit  $3,00 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA detektiert werden. Im Fall der PMA Behandlung zeigte sich ein annähernd gleicher Messwert von  $2,60 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA im Ablauf der mechanischen Reinigung. Für das Sulfonamid-Resistenzgen *su1* zeigte sich eine relative Abundanz von  $3,41 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA. Nach der PMA-Behandlung war ein Wert von  $4,48 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA messbar. Die relative Häufigkeit des Gens *bla<sub>TEM</sub>* lag bei  $1,21 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA. In der PMA behandelten Proben konnte ein Wert von  $1,33 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA gemessen werden. Die relative Häufigkeit des Gens *bla<sub>ctx-M32</sub>* konnte mit  $3,91 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA detektiert werden. Die relativen Häufigkeiten innerhalb der überlebenden Population ließen sich mit  $5,12 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA detektieren. Im Fall des Methicillin-Resistenzgens *mecA* konnte eine relative Häufigkeit im Ablauf der mechanischen Reinigung von  $8,93 \times 10^1$

Zelläquivalenten/ 100 ng DNA gemessen werden. Die PMA Behandlung führte zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Rückgang auf  $6,49 \times 10^1$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA. Das Vancomycin-Resistenzgen *vanA* konnte im Ablauf der mechanischen Reinigung mit einer Häufigkeit von  $8,90 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA nachgewiesen werden, nach der PMA-Behandlung lag der Messwert bei  $9,56 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA (Abbildung 7B).

**Fazit: Die bei den absoluten Abundanzen gezeigten Trends konnten auch durch die relativen Häufigkeiten bestätigt werden. So konnte nach der mechanischen Reinigung eine hohe Belastungssituation festgestellt werden. Alle untersuchten Gene wiesen keine deutlichen Unterschiede durch die PMA-Behandlung auf. Auch eine Populationsveränderung konnte nach der mechanischen Reinigung nicht festgestellt werden. Generell kann bei dieser Reinigungsstufe der Fokus auf der Erfassung des absoluten Eintrags an fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs gelegt werden, um die Belastungssituation eines definierten Volumens innerhalb der Kläranlage zu erfassen.**

### **3.3. Die Belastungssituation mit fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs nach der biologischen Abwasseraufbereitung**

#### **3.3.1. Bestimmung absoluter Häufigkeiten der fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung**

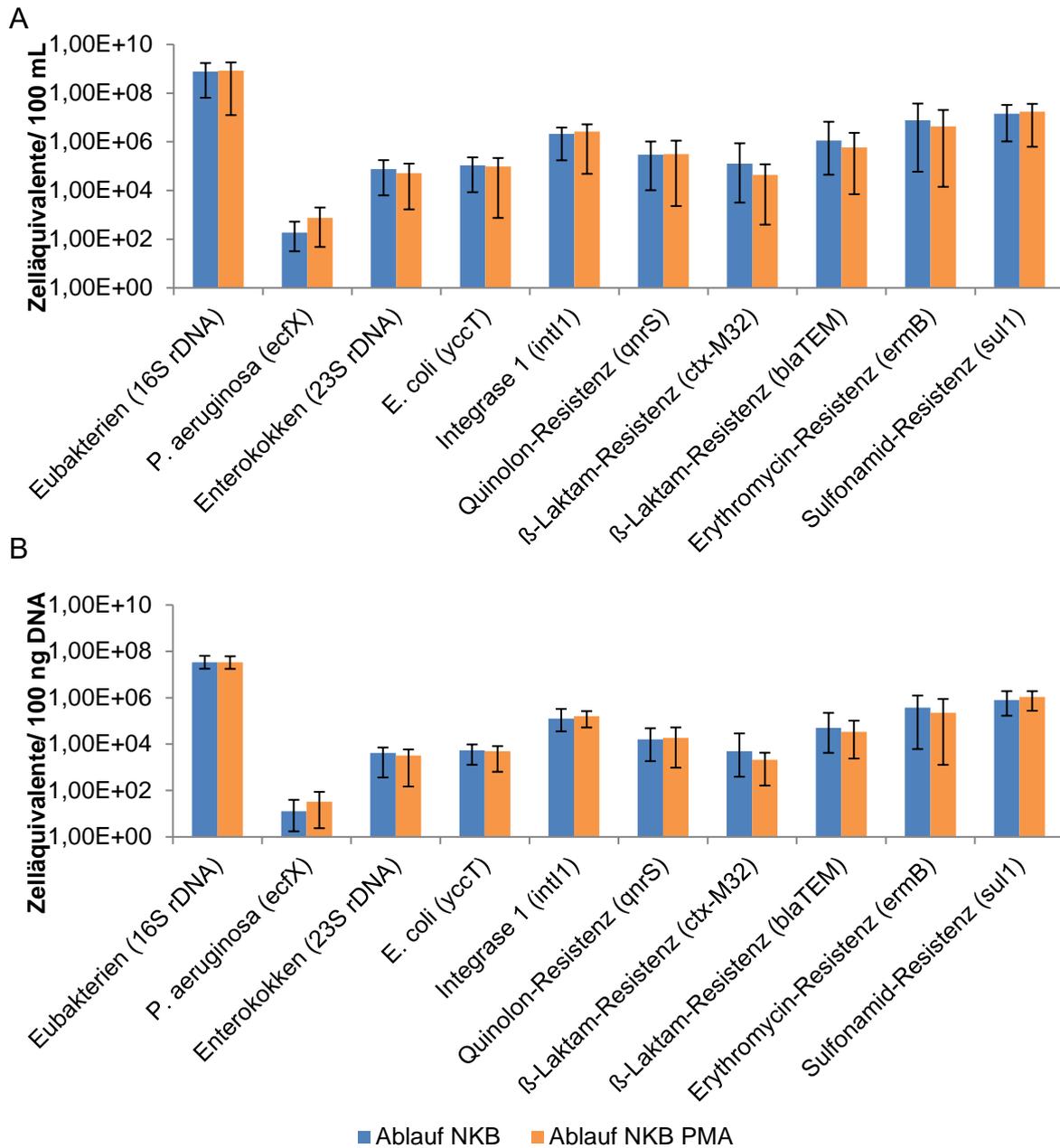
Nach der biologischen Reinigung des Abwassers war ein Rückgang der untersuchten taxonomischen Parameter zwischen 1,46 und 2,22 log-Stufen feststellbar. Die allgemeine absolute Belastung, dargestellt durch die Abundanz der *Eubacteria*, lag bei  $7,68 \times 10^8$  Zelläquivalenten/ 100 mL und somit 1,46 log-Stufen niedriger als nach der mechanischen Reinigung. Die Messung des *E. coli* spezifischen Markergens (*ycc7*) lag 2,08 log-Stufen niedriger, was einer Häufigkeit von  $1,07 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 mL entspricht. Für Enterokokken wurde ein mittlerer Wert von  $7,47 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL gemessen, der 2,22 log-Stufen geringer war als der Messwert der mechanischen Reinigung. Für *P. aeruginosa* konnte ebenfalls eine Reduktion von 1,98 log-Stufen detektiert werden, was einem Messwert von  $1,87 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 mL entspricht. Die taxonomischen Parameter wiesen alle einen Rückgang ihrer Abundanzen durch die biologische Reinigung der Kläranlage auf. Es konnten nur leichte, im Rahmen der Standardabweichungen liegende Schwankungen der taxonomischen Parameter zwischen den PMA unbehandelten und den PMA behandelten Proben festgestellt werden. Im Fall von *P. aeruginosa* konnte die größte Differenz zwischen der nicht PMA behandelten Probe und der PMA behandelten Probe gemessen werden. Hier kam es zu einem leichten Anstieg der Abundanz nach der PMA-Behandlung, der zurzeit nicht erklärbar ist. Insgesamt konnten Werte von  $8,23 \times 10^8$ ,  $9,62 \times 10^4$ ,  $5,09 \times 10^4$  und  $7,43 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 mL für *Eubacteria*, *E. coli*, Enterokokken und *P. aeruginosa* gemessen werden, die sich nur minimal von den nicht PMA behandelten Proben unterscheiden

(Abbildung 8A). Die Unterschiede zwischen den PMA behandelten Proben des Nachklärbeckens und der vorgeschalteten mechanischen Reinigung wiesen ähnliche Reduktionen auf wie die der nicht PMA behandelten Proben. Im Fall des 16S *rDNA* Gens lag die Differenz bei 1,31 log-Stufen, die Enterokokken wiesen eine Differenz von 2,21 log-Stufen auf. Im Fall von *E. coli* konnte eine Reduktion um 2,06 log-Stufen detektiert werden. *P. aeruginosa* wurde im Vergleich zur mechanischen Reinigung im Ablauf des Nachklärbeckens um 1,44 log-Stufen reduziert.

Bei der Betrachtung des *int11* Gens nach der biologischen Abwasserreinigung konnte ein Rückgang auf  $2,14 \times 10^6$  Zelläquivalente/ 100 mL verzeichnet werden. Hier wurde durch die Behandlung der Probe mit PMA ein annähernd gleicher Wert erreicht ( $2,66 \times 10^6$  Zelläquivalente/ 100 mL). Im Vergleich zur mechanischen Reinigungsstufe lagen die absoluten Messwerte hier um 1,40 bzw. um 1,29 log-Stufen niedriger. Für das Quinolonresistenz vermittelnde Gen *qnrS* zeigte der biologische Reinigungsprozess eine Reduktion auf  $2,93 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL ohne PMA-Behandlung (1,14 log-Stufen) und auf  $3,12 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL mit einer Lebend/ Tot-Diskriminierung an (1,48 log-Stufen). Das *ermB* Gen wurde während der biologischen Reinigung um 2,59 log-Stufen auf  $7,68 \times 10^6$  Zelläquivalente/ 100 mL reduziert. Nach der Behandlung der Probe mit PMA konnte ein Wert von  $4,29 \times 10^6$  Zelläquivalente/ 100 mL gemessen werden, was einer Reduktion von 2,69 log-Stufen im Vergleich zur mechanischen Reinigung entspricht. Das Sulfonamid-Resistenzgen *sul1* konnte während der biologischen Reinigung auf  $1,41 \times 10^7$  Zelläquivalente/ 100 mL verringert werden (1,24 log-Stufen) und nach einer zusätzlichen PMA-Behandlung einen Wert von  $1,72 \times 10^7$  Zelläquivalente/ 100 mL erreichen, was einer Reduktion von 1,12 log-Stufen entspricht. Ein Rückgang nach der biologischen Reinigung war auch für das Resistenzgen *bla<sub>TEM</sub>* auf eine mittlere Häufigkeit von  $1,13 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 mL, feststellbar (1,93 log-Stufen). Durch die PMA-Behandlung konnte eine weitere leichte Reduktion für dieses Gen auf  $5,91 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL gemessen werden (2,16 log-Stufen). Auch für das Resistenzgen *bla<sub>ctx-M32</sub>* konnte ein Rückgang auf  $1,28 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL ohne PMA-Behandlung und auf  $4,32 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL in der PMA behandelten Probe der biologischen Reinigung gemessen werden, was einer Reduktion von 1,35 bzw. 1,80 log-Stufen entspricht. Die zur Risikobewertung herangezogenen Gene *mecA* und *vanA* konnten nicht mehr in ausreichender Häufigkeit nachgewiesen werden (Abbildung 8A).

**Fazit: Nach der biologischen Reinigung war eine Reduktion der absoluten Belastung der fakultativ pathogenen Bakterien zwischen 1,31 und 2,22 log-Stufen und der ARGs zwischen 1,12 bis 2,69 log-Stufen im Vergleich zur mechanischen Reinigung festzustellen. Die Reduktion könnte u.a. durch die vorherrschende Abwasserpopulation herbeigeführt worden sein, die das Wachstum der eingetragenen fakultativ pathogenen**

Bakterien durch Konkurrenz um Nährstoffe negativ beeinflussen könnten. Die Reduktion könnte auch auf eine Fixierung und Austragung der Bakterien durch Belebtschlammflocken zurückzuführen sein. Bei der Betrachtung des Einflusses einer PMA-Behandlung waren nur minimale, nicht signifikante Effekte auf die fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs nachweisbar. Die geringen Auswirkungen einer PMA-Behandlung könnten u.U. durch potentielle, im Abwasser vorhandene, Prädatoren mit verursacht werden, welche die Bakterien als Nahrung nutzen und somit keine freie DNA oder geschädigte Zellen vorhanden sind. Potentielle Effekte treten für das *P. aeruginosa* spezifische Markergen *ecfX*, welches eine leichte Zunahme der Häufigkeit nach der PMA-Behandlung erfährt, sowie für die Resistenzgene *bla<sub>ctx-M32</sub>* und *bla<sub>TEM</sub>*, welche eine leichte Verringerung der Messwerte durch die PMA-Behandlung erfuhren. Diese Unterschiede liegen aber alle im Rahmen der Standardabweichungen der Messung und sind damit als nicht signifikant anzusehen. Eine Lebend/ Tot-Differenzierung erwies sich nach der biologischen Reinigung nicht als Voraussetzung, um eine Darstellung der absoluten Belastungssituation mit fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs aufzuzeigen.



**Abbildung 8: Belastungssituationen im Ablauf des Nachklärbeckens. In A) sind die absoluten Belastungen, dargestellt durch die qPCR Ergebnisse, die auf 100 mL Abwasservolumen normiert wurden, gezeigt. In B) ist die relative Belastungssituation im Ablauf des Nachklärbeckens, dargestellt durch die qPCR Ergebnisse der untersuchten Markergene gezeigt. Eine Normierung der Daten erfolgte auf 100 ng DNA. In blau sind die nicht mit PMA behandelten Messungen gezeigt. In orange sind die Ergebnisse der Lebend/ Tot-Differenzierung mittels PMA dargestellt.**

### 3.3.2. Quantifizierung relativer Häufigkeiten von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung

Eine Veränderung der Populationszusammensetzung, basierend auf den Auswertungen der Ergebnisse in Bezug auf die mittlere relative Abundanz (normiert auf 100 ng DNA), sollte die Verhältnisse der Bakterien zueinander innerhalb der Probe darstellen und Populationsverschiebungen zeigen. Ein Rückgang der mittleren relativen Abundanz der *Eubacteria* konnte im Vergleich zur mechanischen Reinigung festgestellt werden. So sank der

16S *rDNA* Wert auf  $3,35 \times 10^7$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA im Auslauf des Nachklärbeckens, was einer Reduktion von 0,85 log-Stufen entspricht. Nach der PMA-Behandlung konnte ein annähernd identischer Wert von  $3,33 \times 10^7$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA (0,84 log-Stufen Reduktion) gemessen werden. Im Fall des *E. coli* spezifischen Markergens *yccT* sank dessen relative mittlere Abundanz auf  $5,34 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA im Auslauf des NKBs, was einer Reduktion von 1,54 log-Stufen entspricht. Die PMA-Behandlung führte zu einer minimalen, nicht signifikanten Veränderung auf  $4,98 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA, die sich in einer Reduktion von 1,63 log-Stufen im Vergleich zur mechanischen Reinigung widerspiegelt. Die gemessenen relativen Häufigkeiten des Enterokokken spezifischen Gens (23S *rDNA*) lagen im Mittel bei  $4,14 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA. Durch die PMA-Behandlung wurde dieser Werte minimal, jedoch nicht signifikant, auf  $3,24 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA, reduziert. Dadurch wurden Reduktionen im Vergleich zur mechanischen Reinigungsstufe von 1,62, bzw. 1,69 log-Stufen erreicht. Im Auslauf des NKBs war eine Reduktion des taxonomischen Markergens *ecfX* um 1,20 log-Stufen auf  $1,28 \times 10^1$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA festzustellen. Durch das Entfernen der DNA toter Bakterien kam es zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der relativen Häufigkeit von *P. aeruginosa*, sodass im NKB  $3,27 \times 10^1$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA nachweisbar waren (Abbildung 8B), was einer Reduktion im Vergleich zur mechanischen Reinigung von 1,17 log-Stufen entspricht.

Bei der Betrachtung des Integrase 1 Gens (*intl1*) konnte eine Reduktion der mittleren relativen Häufigkeit um 0,76 log-Stufen auf  $1,27 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA ohne PMA-Behandlung und um 0,77 log-Stufen auf  $1,56 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA in der PMA behandelten Probe gemessen werden. Im Fall des untersuchten Resistenzgens, das die Quinolon-Resistenz vermittelt (*qnrS*), sank der mittlere Wert im Auslauf des NKBs auf  $1,61 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA und war somit 0,63 log-Stufen niedriger als der Messwert der mechanischen Reinigungsstufe. Nach der PMA Behandlung lag dieser bei  $1,87 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA, was einer Reduktion um 1,05 log-Stufen entspricht. Eine Reduktion des Resistenzgens *ermB* um 1,91 log-Stufen auf  $3,73 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA konnte durch die biologische Klärung erreicht werden. Im Fall der PMA-Behandlung zeigte sich eine leichte, nicht signifikante Reduktion des Messwerts auf  $2,21 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA, was einer Reduktion von 2,07 log-Stufen im Vergleich zur mechanischen Reinigung entspricht. Auch im Fall des Sulfonamid-Resistenzgens *sul1* zeigte sich eine Reduktion auf  $7,89 \times 10^6$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA nach dem biologischen Reinigungsprozess. In der PMA behandelten Probe konnte die relative mittlere Abundanz mit  $1,07 \times 10^6$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA bestimmt werden. Dies entspricht einer Reduktion von 0,64, bzw. 0,62 log-Stufen im Vergleich zum Ablauf der mechanischen Reinigung. Die relativen Häufigkeiten des Gens *bla<sub>TEM</sub>* lagen im Ablauf des NKBs bei  $5,10 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 ng

DNA. In der PMA behandelten Proben konnten Werte von  $3,36 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA gemessen werden. So konnten hier Reduktionen von 1,37 log-Stufen und 1,60 log-Stufen erreicht werden. Im Fall des Resistenzgens *bla<sub>ctx-M32</sub>* konnte nach der biologischen Reinigung ein relativer Anteil von  $4,97 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA detektiert werden, was einer Reduktion von 0,90 log-Stufen entspricht. Die relativen Häufigkeiten innerhalb der überlebenden Population lagen bei  $2,10 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA im Ablauf des NKBs und somit 1,39 log-Stufen niedriger als der Messwert im Ablauf der mechanischen Reinigung. Die zur Risikobewertung herangezogenen Gene *mecA* und *vanA* konnten nicht in ausreichender Häufigkeit nachgewiesen werden (Abbildung 8B).

**Fazit: Die relative Quantifizierung, bei der auf die DNA-Menge normiert wurde, wies einen vergleichbaren Trend auf wie die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung der untersuchten Parameter. Nach der biologischen Reinigung war eine Reduktion der relativen Belastung der fakultativ pathogenen Bakterien zwischen 0,84 und 1,69 log-Stufen und der ARGs zwischen 0,62 und 2,07 log-Stufen im Vergleich zum Ablauf der mechanischen Reinigung festzustellen. Bei der Betrachtung des Einflusses einer PMA-Behandlung konnten nur minimale, nicht signifikante Effekte bei den fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs nachgewiesen werden. Die deutlichsten Differenzen durch die PMA-Behandlung konnten für das *P. aeruginosa* spezifische Markergen *ecfX*, welches eine leichte Zunahme der Häufigkeit nach der PMA-Behandlung erfuhr, sowie und die  $\beta$ -Laktam-Resistenzgene *bla<sub>ctx-M32</sub>* und *bla<sub>TEM</sub>*, sowie das Erythromycinresistenzgen *ermB*, welche eine leichte Verringerung der Messwerte durch die PMA-Behandlung im Rahmen von Standardabweichungen erfuhren, festgestellt werden. Eine Lebend/ Tot-Differenzierung erwies sich nach der biologischen Reinigung nicht als Voraussetzung um eine Darstellung der relativen Belastungssituation und die dadurch mögliche Darstellung von Populationsveränderungen durch diese Reinigungsstufe aufzuzeigen.**

### **3.3.3. Betrachtung der Belastungssituationen während eines kompletten konventionellen Reinigungsprozesses an der lokalen Kläranlage**

In einer weiteren Experimentreihe wurde die allgemeine Reduktion im konventionellen Reinigungsprozess der Kläranlage untersucht, welche die zusätzliche Probenahmestelle der im konventionellen Betrieb befindlichen Sand- und Aktivkohle-Filtration beinhaltet (Probenahmestellen 1, 2 und 6) (Abbildung 6). Die Probenahme umfasste 4 Probenahme-Kampagnen, in denen jeder Parameter bei den molekularbiologischen Messungen als Triplikat gemessen wurden.

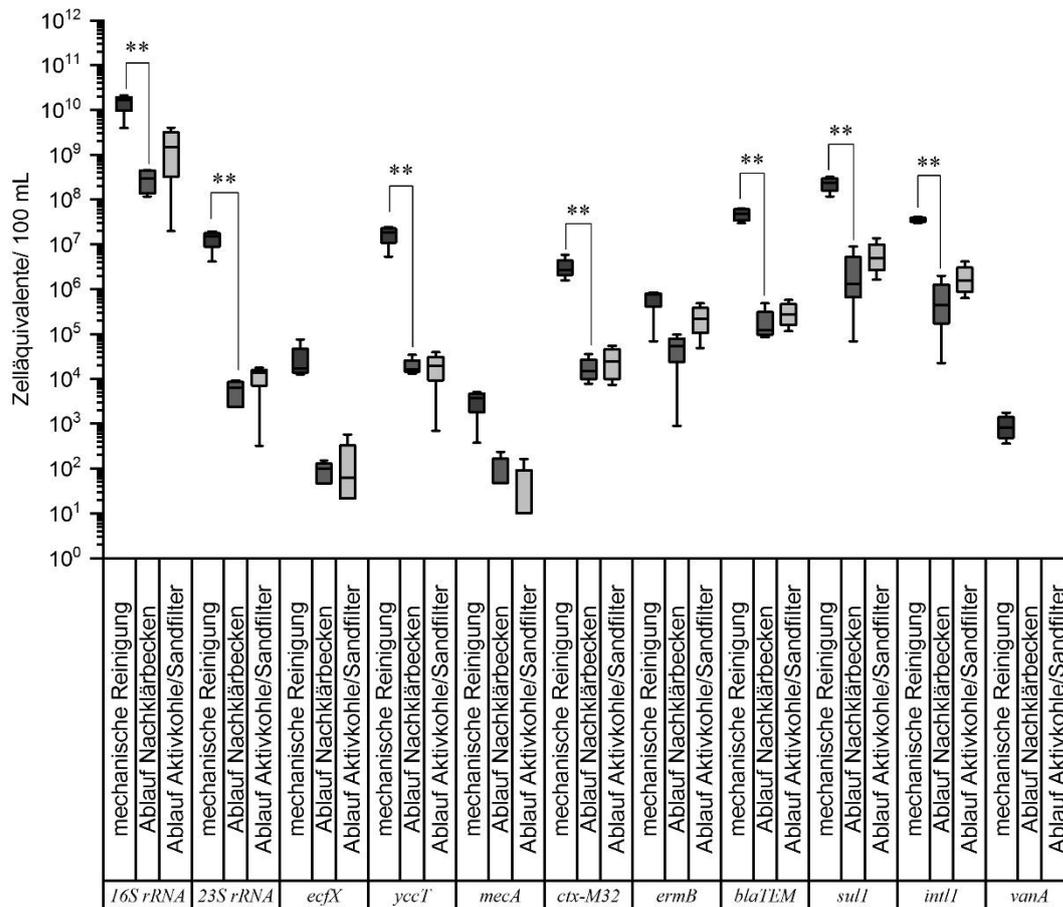
Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Proben in den Bereichen des Ablaufs der mechanischen Reinigung, des Nachklärbeckens nach biologischer Behandlung, sowie des

Ablaufs der Aktivkohle-/ Sandfiltration beprobt. Die hier gewonnenen Daten bestätigen die oben beschriebenen Reduktionen nach der biologischen Reinigungsstufe im Vergleich zur mechanischen Reinigungsstufe. Die in dieser Messreihe gewonnenen Daten der biologischen Reinigung zeigten im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen nur leichte Schwankungen. Ausnahmen bildeten das Erythromycin Resistenzgen *ermB*, welches nach der biologischen Reinigung in deutlich geringeren Abundanzen gefunden wurde, sowie das Antibiotika-Resistenzgen *bla<sub>ctx-M32</sub>*, welches ebenfalls in niedrigeren Häufigkeiten vorzufinden war. Für das Vancomycin Resistenzgen wurde in den vorangegangenen Untersuchungen eine höhere Abundanz detektiert.

In allen Fällen waren die gemessenen Zelläquivalente pro 100 mL in den Zulaufproben der Kläranlage am höchsten. Für alle getesteten Taxonomie- und Resistenzgene war eine Reduktion durch die konventionelle Behandlung in Größenordnungen von 1,1 - 3,4 log-Stufen zu beobachten. Bei den taxonomischen Markergenen wurde die höchste Reduktion bei den Enterokokken mit  $1,51 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 mL im Zulauf auf  $6,27 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 mL nach der biologischen Behandlung gemessen (d.h. 3,4 log-Stufen Reduktion). Die geringste Reduktion wurde bei *P. aeruginosa* beobachtet. Hier wurde eine Reduktion von nur 2,2 Log-Stufen, von  $1,70 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL auf  $9,89 \times 10^1$  Zelläquivalente/ 100 mL analysiert. Die Häufigkeit von *E. coli* wurde nach der biologischen Behandlung von  $1,88 \times 10^7$  auf  $1,64 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL reduziert, was zu einer Reduktion von 3,1 log-Stufen führte. Bei den ARGs wurde die höchste Reduktion für das  $\beta$ -Laktam-Resistenzgen *bla<sub>TEM</sub>* (2,6 log-Stufen) und das Vancomycin-Resistenzgen *vanA* (2,9 log-Stufen; < LOD) ermittelt, das nach der biologischen Behandlung nicht nachweisbar war. Genauer gesagt wurde das  $\beta$ -Laktam-Resistenzgen (*bla<sub>TEM</sub>*) von  $4,82 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 mL im Zulauf auf  $1,22 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL nach der biologischen Behandlung reduziert. Die *bla<sub>ctx-M32</sub>*- und *sul1*-Resistenzgene wurden nach der Behandlung von  $2,73 \times 10^6$  auf  $1,50 \times 10^4$  bzw. von  $2,35 \times 10^8$  auf  $1,33 \times 10^6$  Zelläquivalente/ 100 mL reduziert. Die geringste Reduktion zeigte das *ermB*-Gen, das eine Erythromycin-Resistenz kodiert, mit 1,1 log-Stufen. Hier wurde die Häufigkeit von  $7,51 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 mL im Zulauf auf  $5,37 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL nach der biologischen Behandlung reduziert (Abbildung 9). Weiterhin wurde deutlich, dass der *P. aeruginosa*-Genmarker (*ecfX*) und einige Antibiotika-Resistenzgene *mecA* und *ermB* durch die biologische Behandlung mit dem student's t-Test nicht signifikant reduziert wurden. Bei der Anwendung des Mann-Whitney-Tests zeigten *ecfX* und *mecA* eine signifikante Reduktion. Im Vergleich zu einer früheren Studie von Czekalski et al., (2012) wurden ähnliche Zelläquivalente pro 100 mL oder Genkopien für die *16S rDNA*, die die gesamte bakterielle Gemeinschaft repräsentiert, und das *sul1*-Gen, das für die Sulfonamidresistenz kodiert, gemessen. Andere Studien, wie Munir et al., (2011) und Alexander et al., (2015) zeigten einige Unterschiede in den Genhäufigkeiten. Diese Unterschiede können sich aus Punkten ergeben, wie z.B.

regionale Unterschiede, Einflüsse von Industrie und Krankenhäusern auf die Kläranlage, sowie unterschiedliche Abwasserbehandlungsprozesse in den Kläranlagen.

**Fazit: Während des konventionellen Reinigungsprozesses in der Kläranlage inklusive der Filtration mittels Aktivkohle und Sandfilter kam es zu einer Reduktion der absoluten Häufigkeiten von max. 3,4 log-Stufen. Dies ist jedoch nicht ausreichend für eine Hygienisierung des Abwassers, weswegen erweiterte und kombinatorische Verfahren untersucht werden müssen, die eine ausreichende Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs erzielen, um ein für Mensch und Umwelt möglichst risikofreies Abwasser zu erhalten.**



**Abbildung 9: Darstellung der qPCR-Analysen von taxonomischen und Antibiotikaresistenz-Markern während der konventionellen Abwasserbehandlung einer lokale, kommunalen Großkläranlage. Es wurden Daten des Ablaufs der mechanischen Reinigung, des Ablaufs des Nachklärbeckens (biologische Reinigung), sowie des Kläranlagenauslaufs nach Sandfiltration dargestellt. (t-Test; \*\*: p < 0,05, \*: p < 0,1) (Jäger et al., 2018b).**

### **3.4. Die Belastungssituation mit fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs nach einer Ozonbehandlung**

Im Fall der Untersuchungen zur Erfassung der Belastungssituation und dem Effekt einer Ozonbehandlung wurden insgesamt 10 qualifizierte Stichproben genommen. Die Proben wurden jeweils an einem Tag in den Monaten Mai 2015, Juli 2015, September 2015, Oktober 2015 genommen. Im März 2016 und September 2016 wurden 3 Tage in Folge beprobt, was zu einer Gesamtanzahl von insgesamt 10 Einzelproben führt (siehe Abbildung 6).

#### **3.4.1. Bestimmung absoluter Häufigkeiten von ARB und ARGs inkl. einer Lebend/Tot-Differenzierung**

Die Ozonbehandlung (1,0 g Ozon/ g DOC) führte zu einer nochmaligen Reduktion der Messwerte der taxonomischen Parameter im Vergleich zum Ablauf des Nachklärbeckens (NKB). So sank die gemittelte Häufigkeit der *Eubacteria* (16S rDNA) auf  $2,26 \times 10^7$  Zelläquivalente/ 100 mL. Das entspricht einer Differenz von 1,53 log-Stufen. Im Fall des *E. coli* spezifischen Markergens *yccT* wurde ein Wert von  $9,94 \times 10^2$  Zelläquivalente/ 100 mL erreicht, der somit 2,03 log-Stufen geringer ausfiel, als der Messwert des Ablaufs des NKB. Die gemittelten Messwerte der Enterokokken lagen bei  $1,85 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL, die von *P. aeruginosa* bei  $9,74 \times 10^1$  Zelläquivalenten/ 100 mL und waren damit um 1,61 log-Stufen bzw. um 0,28 log-Stufen niedriger als im Ablauf der biologischen Klärung. Durch eine Lebend/Tot-Diskriminierung mittels PMA konnten die Messwerte der taxonomischen Parameter gesenkt werden, lagen jedoch immer noch Bereich der Standardabweichungen. Aufgrund der hohen Varianzen geben diese Daten erste Hinweise auf die Notwendigkeit einer solchen Lebend/Tot-Differenzierung nach oxidativen Prozessen, die offensichtlich auch antibakterielle Wirkungen besitzen können. Nach der PMA-Behandlung der Ozon behandelten Proben lagen die Messwerte für *Eubacteria* bei  $6,33 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 mL und somit 2,11 log-Stufen niedriger als die Vergleichsprobe des NKBs. *E. coli* wurde mit einer Abundanz von  $3,97 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 mL detektiert, was einer Reduktion von 2,38 log-Stufen entsprach. Auch Enterokokken lagen mit einer Häufigkeit von  $3,29 \times 10^2$  Zelläquivalenten nach der PMA-Behandlung niedriger als ohne eine entsprechende Lebend/ Tot-Diskriminierung. Im Vergleich zur Probe des NKBs lag der Messwert hier um 2,19 log-Stufen niedriger. Im Fall von *P. aeruginosa* lag der Messwert bei  $3,62 \times 10^1$  Zelläquivalenten/ 100 mL (Abbildung 10A), was einer Reduktion um 1,31 log-Stufen entsprach. Im Durchschnitt lagen nach PMA-Behandlung die Zelläquivalentenzahlen um 0,40 bis 0,75 log-Stufen niedriger als die gleiche Probe, die nicht mit PMA behandelt wurde. Somit wurde dieser Anteil durch die Behandlung mit 1 g Ozon/ g DOC eliminiert oder soweit geschädigt, dass das PMA die intrazelluläre DNA für eine nachfolgende PCR blockieren konnte.

Die Ozonbehandlung führte beim Integrase 1 Gen zu einem mittleren Wert von  $7,53 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL, der um 1,45 log-Stufen niedriger ausfiel als der Messwert im NKB.

Durch die PMA Behandlung konnte ein leichter, nicht signifikanter Rückgang auf  $5,38 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL erzielt werden, der sich in einer Reduktion von 1,69 log-Stufen im Vergleich zur PMA behandelten Probe des NKBs zeigte.

Im Fall der untersuchten Resistenzgene zeigten die gemittelten Häufigkeiten des *qnrS* Gens durch die Ozonung eine Reduktion auf  $1,61 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL für die nicht PMA behandelte Probe und auf  $2,22 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL für die mit PMA behandelten Probe, was einer Reduktion von 1,26, bzw. 1,15 log-Stufen im Vergleich zur Probe des NKBs entsprach. Das Erythromycin-Resistenzgen *ermB* ließ sich durch die Ozonbehandlung auf einen Wert von  $6,52 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL reduzieren, eine Reduktion um 2,07 log-Stufen. Durch die PMA Behandlung wurde ein Messwert von  $1,94 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL erreicht und somit potentielle Signale, die durch die Rückstände toter Bakterien hervorgerufen werden könnten, eliminiert, was einer Reduktion von 2,34 log-Stufen entsprach. Im Fall des Sulfonamid-Resistenzgens *sul1* konnte dessen Abundanz auf  $4,53 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL nach der Ozonung gesenkt werden, eine Reduktion um 1,49 log-Stufen. Durch die PMA Behandlung konnten auch hier, DNA-Fragmente, die zu positiven Ergebnissen aus nicht aktiver biologischer Materie führen könnten, entfernt werden und ein Messwert von  $2,53 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL generiert werden. Dies entsprach einer Reduktion um 1,83 log-Stufen. Für das  $\beta$ -Lactam-Resistenzgen *bla<sub>TEM</sub>* war nach der Behandlung mit 1 g Ozon/ g DOC ein Wert von  $3,94 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 mL und nach einer PMA-Behandlung ein Wert von  $6,79 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL messbar. Im Vergleich zu den entsprechenden Proben des NKBs konnten so Reduktionen von 0,46 und 0,06 log-Stufen gemessen werden. Im Fall des Resistenzgens *bla<sub>ctx-M32</sub>*, welches auf einen Wert von  $6,60 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL nach der Ozonbehandlung reduziert werden konnte, zeigte nach der PMA-Behandlung eine leichte, aber nicht signifikante Zunahme der Abundanz auf  $1,08 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL. Dies spiegelt sich in den Reduktionen von nur 0,29, bzw. 0,40 log-Stufen im Vergleich zum NKB wider. Die zu den Risikogenen gezählten Gene *mecA* und *vanA* konnten in der mit Ozon behandelten Probe nicht nachgewiesen werden (Abbildung 10A).

**Fazit: Nach der Ozonbehandlung war eine weitere Reduktion der absoluten Häufigkeiten der fakultativ pathogenen Bakterien im Bereich von 0,28 bis 2,38 log-Stufen und der ARGs zwischen 0,06 und 2,34 log-Stufen im Vergleich zu den Belastungen des Ablaufs des Nachklärbeckens festzustellen. Es konnte jedoch keine vollständige Elimination aller Untersuchungsparameter nachgewiesen werden. Die  $\beta$ -Laktam-Resistenzgene *bla<sub>ctx-M32</sub>* und *bla<sub>TEM</sub>* konnten durch die Ozonung nicht weiter reduziert werden. Dies wies auf ein unterschiedliches Wirkungsspektrum von Ozon auf die verschiedenen Resistenzgene bzw. deren Trägerorganismen hin. Bei Betrachtung der Effekte der PMA-**

Behandlung konnten bei den taxonomischen Markergenen zwar Verringerungen der Häufigkeiten (max. 0,75 log-Stufen) festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass DNA von toten oder geschädigten Zellen für die molekularbiologischen Analysen blockiert wurde, jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Im Fall der untersuchten Resistenzgene konnten keine deutlichen Veränderungen festgestellt werden. Die Veränderungen bewegten sich im Rahmen der Standardabweichungen.

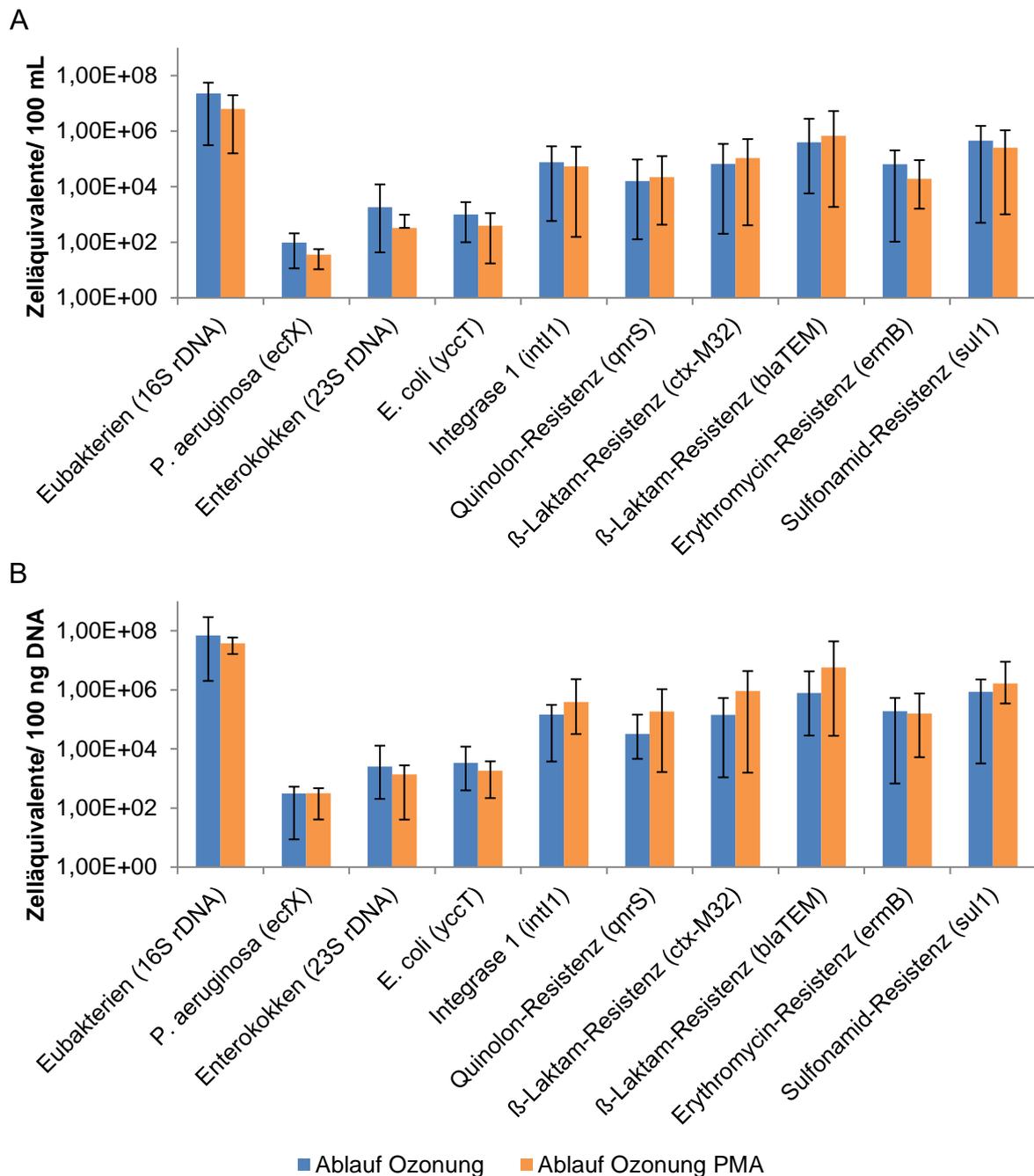


Abbildung 10: Belastungssituationen im Ablauf der Ozonbehandlung. In A) sind die absoluten Belastungen, dargestellt durch die qPCR Ergebnisse, die auf 100 mL Abwasservolumen normiert wurden, gezeigt. In B) ist die relative Belastungssituation im Ablauf der Ozonung, dargestellt durch die qPCR Ergebnisse der untersuchten Markergene gezeigt. Eine Normierung der Daten erfolgte auf 100 ng DNA. In blau sind die

nicht mit PMA behandelten Messungen gezeigt. In orange sind die Ergebnisse der Lebend/ Tot-Differenzierung mittels PMA dargestellt.

### 3.4.2. Quantifizierung relativer Häufigkeiten von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs inkl. einer Lebend/ Tot-Differenzierung

Mögliche populationsinterne Veränderungen, dargestellt durch die Normierung auf Anteile der DNA-Menge der Abwasserprobe, zeigten relativ betrachtet, dass es zu einer Erhöhung der Werte im Auslauf der Ozonung kam. Dies könnte auf die geringere Bakteriendichte nach der Ozonung zurückzuführen sein, da niedrigere DNA Konzentrationen in den Proben vorlagen. Im Vergleich zu absoluten Häufigkeiten, bei denen die absoluten Werte erfasst werden, können mit Hilfe der relativen Häufigkeiten Veränderungen in der Population gezeigt werden. So besteht die Möglichkeit, dass es zu einer relativen Zunahme von Resistenzgenen kommt, da entsprechende Gene absolut unverändert bleiben, jedoch innerhalb der Population kommt es zu einer Zunahme des entsprechenden Gens, da ggf. die Resistenz tragenden Bakterien überleben und so einen größeren relativen Anteil in der Population einnehmen. Dies ermöglicht die Identifikation von potentiellen Resistenzgenen, die einen selektiven Vorteil für die Trägerorganismen bringen. Die PMA Behandlung führte durch das Entfernen toter Bakterien zu einem realistischeren Bild der Belastungssituation. Die Schwankungen durch die PMA Behandlung sind im Fall der taxonomischen Parameter gering. Die Differenzen zwischen den PMA behandelten Proben und den nicht PMA behandelten Proben bei den untersuchten Resistenzgenen zeigten hier größere, jedoch nicht signifikante Differenzen. Bei der Betrachtung der taxonomischen Markergene wurde für das *16S rDNA* Gen ein Wert von  $6,89 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA gemessen, eine Reduktion im Vergleich zum Ablauf NKB von 0,31 log-Stufen und nach der PMA Behandlung von  $3,78 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA, eine Reduktion von 0,06 log-Stufen. Dies entspricht einer Differenz durch die PMA Behandlung von 0,25 log-Stufen. Auch im Fall des *E. coli* spezifischen Markergens *yccT* konnten vergleichbare Werte von  $3,33 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA im Ablauf der Ozonung und von  $1,82 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA nach der PMA Behandlung gemessen werden. Diese liegen im Vergleich zum Ablauf NKB um 0,21, bzw. um 0,44 log-Stufen niedriger. Das Enterokokken spezifische Gen, *23S rDNA*, war nach der Ozonung mit  $2,50 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA detektierbar, was einer Reduktion von 0,22 log-Stufen entsprach. Durch die PMA Behandlung wurde der Wert minimal reduziert (0,25 log-Stufen), so dass  $1,38 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA messbar waren, was einer Reduktion von 0,37 log-Stufen im Vergleich zu NKB entspricht. Das taxonomische Markergen *ecfX* (*P. aeruginosa*) wies nach der Ozonbehandlung eine relative Häufigkeit von  $3,12 \times 10^2$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA auf, einer Differenz von 1,39 log-Stufen im Vergleich zum NKB. Durch das Entfernen der DNA toter Bakterien mittels einer PMA-Behandlung konnte der relative Anteil von *P. aeruginosa* einen Wert von  $3,19 \times 10^2$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA erzielen, der ebenfalls

nahezu unverändert ist und somit einer Differenz zum Ablauf des NKBs von 0,99 log-Stufen entsprach (Abbildung 10B).

Bei den Untersuchungen des an der Weitergabe von Resistenzgenen beteiligten Integrase 1 Gens *int1* konnte im Ablauf der Ozonung eine relative Abundanz von  $1,44 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA und nach der PMA-Behandlung ein Wert von  $3,88 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA gemessen werden, was zu einer Differenz durch die PMA-Behandlung von 0,43 log-Stufen führt. Im Vergleich zum Ablauf NKB konnten durch die Ozonung nur minimale Reduktionen von 0,05 und 0,39 log-Stufen erreicht werden. Im Fall der untersuchten Resistenzgene zeigte sich nach der Ozonbehandlung eine mittlere relative Häufigkeit für das *qnrS* Gens von  $3,19 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA, was einer Differenz von 0,30 log-Stufen im Vergleich zum Ablauf des NKBs entsprach. In der PMA behandelten Ozonprobe wurde ein Wert von  $1,85 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA gemessen, was zu einer Differenz von 1,0 log-Stufen im Vergleich zum Ablauf des NKBs führte. Im Fall des *qnrS* Gens konnte eine Differenz durch die PMA-Behandlung von 0,76 log-Stufen erreicht werden. Der relative Anteil des Resistenzgens *ermB* konnte nach der Ozonbehandlung mit  $1,88 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA detektiert werden, was einer Differenz von 0,30 log-Stufen zum Ablauf des NKBs ausmachte. Im Fall der PMA Behandlung zeigte sich eine leichte Verschiebung des Messwerts auf  $1,57 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA, was in einer Differenz von 0,15 log-Stufen resultierte. Im Fall des  $\beta$ -Laktam-Resistenzgens *bla<sub>TEM</sub>* lag die relative Häufigkeit nach der Ozonbehandlung bei  $7,83 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA und somit lag die Differenz zwischen dem Ablauf des NKBs und der Ozonung bei 1,19 log-Stufen. Diese nahm innerhalb der lebenden Fraktion deutlich zu und erreichte einen Wert von  $5,76 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA, was einer Differenz von 2,23 log-Stufen entspricht. Auch die Wirkung der PMA-Behandlung wird hier deutlich, da ein maximaler Wert von 0,87 log-Stufen durch die PMA-Behandlung erreicht wurde. Auch für das *bla<sub>ctx-M32</sub>* Gen wurde eine Differenz durch die PMA-Behandlung von 0,80 log-Stufen ermittelt. Nach der Ozonbehandlung war die relative Häufigkeit des Gens *bla<sub>ctx-M32</sub>* auf  $1,43 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 ng DNA angestiegen, was einer Differenz von 1,46 log-Stufen im Vergleich zum Ablauf des NKBs entsprach. Innerhalb der überlebenden Population lag die gemessene Abundanz bei  $9,04 \times 10^5$  Zelläquivalenten/ 100 ng DNA, eine Differenz zwischen dem Ablauf der Ozonung und dem des NKBs von 2,63 log-Stufen. Nach der Ozonung konnten das Methicillin- und das Vancomycin-Resistenzgen nicht mehr in messbarer Häufigkeit detektiert werden (Abbildung 10B).

**Fazit: Im Fall der relativen Häufigkeiten zeigte sich für den taxonomischen Parameter von *P. aeruginosa* (*ecfX*) eine Zunahme im Vergleich zur Probe des Nachklärbeckens von ca. 1 log-Stufe. Das heißt der Anteil von *P. aeruginosa* in der Population hatte sich erhöht. Dies deutet auch auf eine Robustheit von *P. aeruginosa* hin und ist gleichzeitig**

als Selektion durch dieses Reinigungsverfahren zu bewerten. Eine Zunahme zeigte sich auch bei den untersuchten Resistenzgenen *bla<sub>ctx-M32</sub>* und *bla<sub>TEM</sub>* im Vergleich zum Ablauf des Nachklärbeckens.

Im Fall der allgemeinen bakteriellen Belastung (*16S rDNA*), der Enterokokken (*23S rDNA*) und *E. coli* (*yccT*) konnte keine deutlichen Veränderungen festgestellt werden. Dies bestätigte sich auch für alle weiteren Resistenzgene und das Integrase 1 Gen (*intl1*). Eine PMA-Behandlung führte bei den taxonomischen Markergenen, maximal zu leichten Reduktionen der relativen Häufigkeiten. Im Fall der Resistenzgene konnte, durch die PMA-Behandlung, eine Zunahme der gemittelten relativen Häufigkeiten innerhalb der lebenden Fraktion der Population festgestellt werden. Diese könnten durch das Entfernen der toten Bakterien und eine mögliche Selektion von Resistenzen durch die Ozonung innerhalb der lebenden Fraktion hervorgerufen worden sein. Diese hier dargestellten Ergebnisse geben erste Hinweise auf eine mögliche Selektion von Bakterienspezies und spezifischen Resistenzgenen durch die Ozonung. Zum einen könnten einzelne Bakterienspezies, wie *P. aeruginosa* durch ihren GC-Gehalt oder durch die Vielzahl an Mechanismen zum Schutz vor oxidativen Schäden, eine höhere Überlebenschance haben (Alexander *et al.*, 2016, Jäger *et al.*, 2018a). Diese Unterschiede in der Anfälligkeit von Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt ist auch ein Hinweis auf unterschiedliche Reaktivitäten des Ozons mit den DNA-Basen (siehe Kapitel 1.6.1) (Cataldo, 2006). 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, bedingt durch die höhere Geschwindigkeitskonstante.

Des Weiteren zeigten auch einzelne spezifische Resistenzgene unterschiedlich geringe Reduktionseffizienzen durch die Ozonbehandlung, was bei Trägern dieser Gene ebenfalls die Überlebenschancen steigern könnte, wodurch es zu einer Selektion dieser Bakterien und Resistenzträgern kommt. Aus diesem Grund ist nach einer solchen technischen Maßnahme notwendig die relative Häufigkeit der absoluten Abundanz gegenüberzustellen. Weiterhin ist eine Behandlung mit PMA sinnvoll, um solche Veränderungen innerhalb der überlebenden Population detaillierter einordnen zu können.

### 3.4.3. Untersuchungen weiterer Abwasserbehandlungstechniken durch Kombination unterschiedlicher erweiterter Verfahrenstechniken

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Reduktionseffizienzen der eingesetzten erweiterten Behandlungsmethoden untersucht, d.h. Ozonung und UV-Behandlung, wurden in insgesamt vier Probenahme-Kampagnen analysiert. Diese fanden im September 2016, März 2017, Juli 2017 und Oktober 2017 statt. Untersucht wurden die Ozonbehandlung bei 1 g Ozon/ g DOC, die UV-Behandlung bei einer Intensität von 400 J/m<sup>2</sup>, sowie die Kombination aus beiden erweiterten Verfahrenstechniken. Als Zulauf für diese erweiterten Behandlungen diente Abwasser aus dem Ablauf der biologischen Reinigung (siehe Abbildung 6).

Hierbei wurden die Effizienzen der erweiterten Verfahren (Probenahmestellen 3, 4 und 5) untersucht (Abbildung 6). Als Vergleichswert für die Effizienz dieser Maßnahmen wurde wiederum der Ablauf der biologischen Reinigungsstufe (NKB) (2) verwendet.

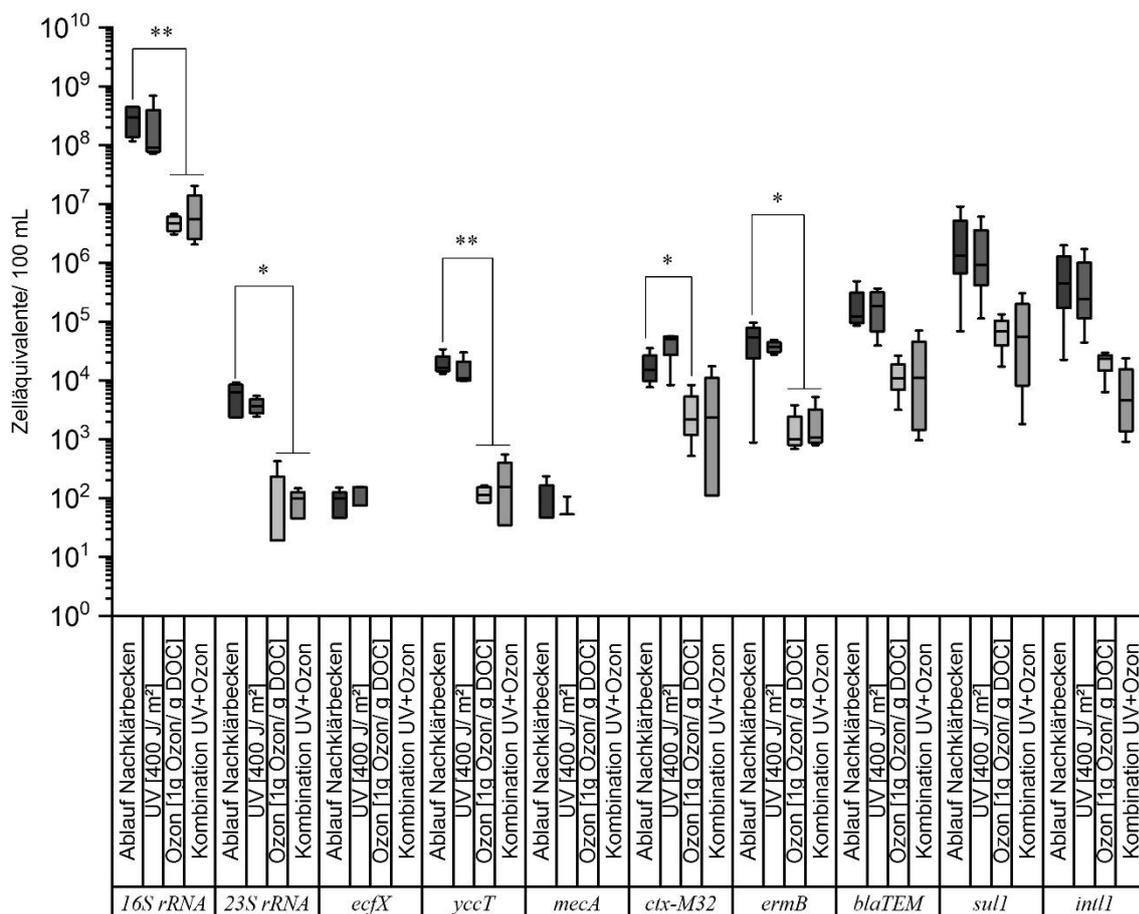


Abbildung 11: Darstellung der qPCR-Analysen von taxonomischen und Antibiotikaresistenz-Markern in mit innovativen Maßnahmen behandelten Abwasserproben einer kommunalen Kläranlage. Es wurden Daten des Ablaufs des Nachklärbeckens (Zulauf (biologische Reinigung)), der UV-behandelte Proben (400 J/m<sup>2</sup>), der ozonbehandelte Proben (1g Ozon/ g DOC) und die kombinierte Behandlung von UV und Ozon (Kombination) dargestellt. (t-Test; \*\*: p < 0,05, \*: p < 0,1) (Jäger et al., 2018b).

Im Falle der taxonomischen Markergene waren alle drei fakultativ pathogenen Bakterien im biologisch gereinigten Abwasser nachweisbar. Die Häufigkeit der lebensfähigen Fraktion

nach der PMA-Behandlung reichte von  $9,89 \times 10^1$  Zelläquivalenten/ 100 mL für *P. aeruginosa* (*ecfX*) bis zu  $1,50 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL für *E. coli* (*yccT*). Die Häufigkeit der Enterokokken (Enterokokken spezifische 23S *rDNA*) und die bakterielle Gesamtbelastung (*16S rDNA*) wurden mit  $6,27 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL bzw.  $2,94 \times 10^8$  Zelläquivalenten/ 100 mL bestimmt (Abbildung 11). Bei den Antibiotika-Resistenzgenen reichten die gemessenen Zelläquivalente/ 100 mL von  $1,33 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 mL für *sul1* bis zu  $1,50 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL für *bla<sub>ctx-M32</sub>*. Die Häufigkeiten von *int11*, *bla<sub>TEM</sub>* und *ermB* zeigten Werte von  $4,42 \times 10^5$ ,  $1,22 \times 10^5$  bzw.  $5,37 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL. Die Abundanz des Methicillin-Resistenzgens wurde mit  $4,70 \times 10^1$  Zelläquivalenten/ 100 mL bestimmt. Diese Ergebnisse dienen als Referenz für die Bestimmung der Reduktionseffizienz der verschiedenen Behandlungen.

Die **UV-Behandlung (400 J/ m<sup>2</sup>)** führte zu einer Reduktion der Abundanz aller taxonomischen Markergene von 0,1 log-Stufen (24,1%) für *P. aeruginosa*, 0,2 log-Stufen (27,4%) für *E. coli*, 0,2 log-Stufen (42,4%) für Enterokokken und 0,5 log-Stufen (69,3%) für das *16S rRNA*-Gen (Abbildung 11, Tabelle 24 (Anhang)). Ähnliche Reduktionseffizienzen waren für *sul1* (0,2 log-Stufen, 29,9%), *ermB* (0,2 log-Stufen, 30,2%) und *int11* (0,3 log-Stufen, 44,9%) nachweisbar. Die Zelläquivalente/ 100 mL wurden auf  $9,33 \times 10^5$ ,  $3,75 \times 10^4$  bzw.  $2,43 \times 10^5$  reduziert. Die Antibiotika-Resistenzgene *bla<sub>TEM</sub>* und *bla<sub>ctx-M32</sub>* zeigten dagegen eine Zunahme ihrer Häufigkeit nach der UV-Behandlung um 0,2 und 0,5 log-Stufen (Abbildung 11, Tabelle 24 (Anhang)).

**Fazit: Die UV-Behandlung als Abwasserbehandlungstechnologien zeigte sich hier als nicht ausreichend. Auch andere Studien berichten, dass die Reduktionseffizienzen der Genkopien/ 100 mL zwischen 0,5 - 3,0 log-Stufen variieren können, abhängig von den verwendeten Bestrahlungsintensitäten, sowie von den untersuchten Resistenzgenen. Es wird berichtet, dass das Tetracyclinresistenz vermittelnde Gen *tetA* und das eine Resistenz gegen Ampicillin vermittelnde Gen *ampC* im Vergleich zu *mecA*- oder *vanA*-Resistenzgenen toleranter gegen eine UV-Behandlung sind (McKinney & Pruden, 2012). Darüber hinaus könnte die komplexe Abwassermatrix aufgrund der hohen Trübung der Abwasserproben die Reduktionseffizienz beeinflussen, so dass das UV-Licht nicht in ausreichender Tiefe in das Abwasser eindringen konnte (Zhuang et al., 2015).**

Die **Ozonbehandlung (1,0 g Ozon/ g DOC)** führte für alle getesteten taxonomischen Markergene zu Reduktionseffizienzen zwischen 1,8 log-Stufen (98,4%) im Falle des *16S rDNA*-Gens bis unter die Nachweisgrenze. *E. coli* und Enterokokken zeigten eine Reduktion ihrer Häufigkeit um 2,2 log-Stufen (99,2%) auf  $1,14 \times 10^2$  Zelläquivalente/ 100 mL und um 2,5 log-Stufen (99,7%) auf  $1,91 \times 10^1$  Zelläquivalente/ 100 mL. Für *P. aeruginosa* lagen die qPCR-Messungen am Referenzpunkt unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 11, Tabelle 24 (Anhang)). Die Ozonbehandlung zeigte für alle getesteten Antibiotika-Resistenzgene

Reduktionen zwischen 0,8 log-Stufen (85,5%) und 1,7 log-Stufen (98,1%). Das Methicillin-Resistenzgen (*mecA*) war nach der Ozonbehandlung nicht nachweisbar. Die stärkste Reduktion wurde für das Erythromycin-Resistenzgen (*ermB*) mit 1,7 log-Stufen (98,1%) auf  $1,01 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 mL gemessen. Das Sulfonamid-Resistenzgen (*sul1*) wurde um 1,3 log-Stufen (94,9%) auf  $6,83 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL reduziert. Das Integrase 1 Gen (*intl1*) wies eine Reduktion um 1,3 log-Stufen (94,7%) auf. Die Häufigkeit des  $\beta$ -Laktam-Resistenzgens (*bla<sub>TEM</sub>*) wurde auf  $1,10 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL reduziert (Reduktion um 1,0 log-Stufen (91%)). Die Abundanz des Cefotaxim-Resistenzgens (*bla<sub>ctx-M32</sub>*) zeigte eine Reduktion der Abundanz auf  $2,17 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 mL (Reduktion um 0,8 log-Stufen (85,5%)) (Abbildung 11, Tabelle 24 (Anhang)).

**Fazit: Durch die Ozonbehandlung konnten alle untersuchten Antibiotika-Resistenzgene reduziert werden. Jedoch lagen die Reduktionseffizienzen nur im Fall der taxonomischen Markergene bei ca. 99%. Im Fall der untersuchten Resistenzgene konnten Reduktionseffizienzen zwischen 85,5% und 98,1% erreicht werden. Im Gegensatz zu den chemischen Mikroverunreinigungen, von denen diskutiert wird, dass diese bei der Ozonbehandlung um mindestens 80 % reduziert werden müssen, sollte die mikrobiologische Belastung um einen Prozentsatz von mindestens 99 % reduziert werden, um eine Wiederverkeimung zu vermeiden (Abegglen & Siegrist, 2012, National Blue Ribbon Commission for Onsite Non-Potable Water Systems, 2017). Ein Vorteil der Ozonbehandlung ist ihre Anwendbarkeit zur gleichzeitigen mikrobiologischen Reduktion, als auch zur Reduktion von Mikroverunreinigungen.**

Die **Kombination von UV- und Ozonbehandlung** ergab hohe Reduktionseffizienzen für alle getesteten Bakterien. Die Häufigkeit von *E. coli* konnte von  $1,50 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL auf  $1,57 \times 10^2$  Zelläquivalente/ 100 mL reduziert werden (2,0 log-Stufen, 99,0%) und die Enterokokken wurden von  $6,27 \times 10^3$  auf  $9,92 \times 10^1$  Zelläquivalente/ 100 mL reduziert (1,8 log-Stufen, 98,4%). Die allgemeine bakterielle Belastung (*16S rRNA*-Gen) wurde um 1,7 log-Stufen (98,1%) reduziert und *P. aeruginosa* war nach der kombinierten Behandlung nicht nachweisbar (Abbildung 11, Tabelle 24 (Anhang)). Die Kombination von UV- und Ozonbehandlung führte bei allen getesteten Antibiotika-Resistenzgenen zu einer Reduktion von 0,8 log-Stufen (84,1%) bis zu 2,0 log-Stufen (99,0%). Die Häufigkeit des Integrase 1 Gens (*intl1*) wurde nach Behandlung mit  $4,61 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL nachgewiesen, was zu einer Reduktion von 2,0 log-Stufen (99,0%) führte. Das Erythromycin-Resistenzgen (*ermB*) wurde auf  $1,07 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL reduziert (1,7 log-Stufen, 98,0%), gefolgt vom Sulfonamid-Resistenzgen (*sul1*) mit einer Reduktion von 1,4 log-Stufen (95,6%), was in einer Häufigkeit von  $5,53 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL resultierte. Das  $\beta$ -Lactam-Resistenzgen (*bla<sub>TEM</sub>*) zeigte eine Reduktion von 1,0 log-Stufen (90,8%) mit einer nachweisbaren Häufigkeit

von  $1,12 \times 10^4$  Zelläquivalenten/ 100 mL. Die Abundanz des Cefotaxim-Resistenzgens (*bla<sub>ctx-M32</sub>*) wurde mit  $2,38 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL nachgewiesen, was einer Reduktion von 0,8 log-Stufen (84,1%) entspricht. Das Methicillin-Resistenzgen (*mecA*) war nach der kombinierten Behandlung nicht nachweisbar.

**Fazit: Bei der Betrachtung der Kombination von UV- und Ozonbehandlung zeigten die Ergebnisse, dass im Vergleich zur alleinigen Ozonbehandlung keine zusätzlichen signifikanten Reduktionen durch eine UV-Behandlung stattgefunden haben. Dies könnte daran liegen, dass nach der Ozonbehandlung möglicherweise noch Verunreinigungen oder Partikel vorhanden sind, so dass das UV-Licht das ozonbehandelte Abwasser nicht durchdringen konnte. Bei weiteren Aufbereitungsschritten (z.B. Partikelentfernung durch Filtrationsschritte) könnte die UV-Behandlung dann eine geeignete Methode sein, um die verbleibenden mikrobiellen Kontaminationen zu beseitigen. Folglich sollten Anpassungen der Ozonbehandlung, die bereits eine erhöhte Reduktionsrate von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs erreichen, für den Einsatz in Kläranlagen in Betracht gezogen werden.**

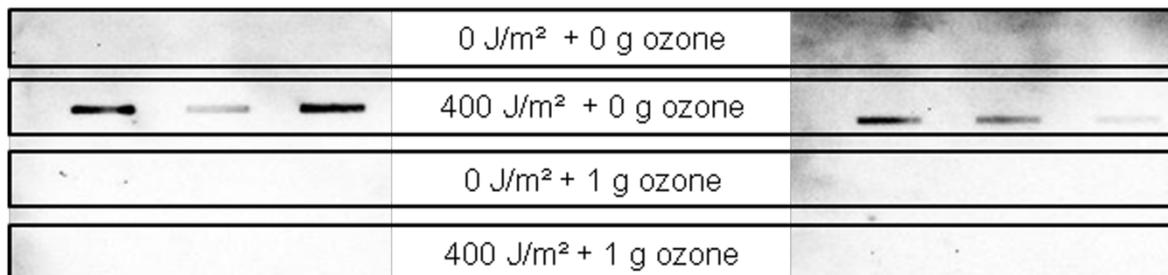
Zusammengefasst erwies sich die Ozonbehandlung in dieser Untersuchungsreihe als effektivste Verfahrenstechnik zur Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs. Eine Kombination aus UV- und Ozonbehandlung konnte hier keine synergistischen Effekte aufzeigen und erzielte keine stärkeren Reduktionseffizienzen als die Ozonbehandlung selbst. Als ineffektiv für die Behandlung von Abwasser hingegen hat sich die alleinige UV-Behandlung herausgestellt. Hier wurden die niedrigsten Reduktionen gemessen.

### **3.5. Auswirkungen erweiterter Abwasserbehandlungstechnologien auf die bakterielle DNA**

Es ist bekannt, dass die Wirkung von Ozon in Abwässern von vielen biotischen und abiotischen Faktoren wie Bakteriendichte, chemischer Belastung und auch der Schwebstoffkonzentration abhängt. Dies impliziert, dass subletale Effekte auf Bakterien auftreten können, die Stressreaktionen, DNA-Läsionen, Populationsverschiebungen und bakterielle Selektionsprozesse fördern. Dwyer et al., (2009) beschrieb die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die den Stoffwechsel von Bakterien beeinflussen. Die ausgelöste SOS-Reaktion trug zur Resistenzentwicklung durch die Aktivierung von Reparaturmechanismen für geschädigte DNA bei, was die erhöhte Robustheit der betroffenen Bakterien gegenüber ROS erklären könnte. Jedoch könnten auch weitere anti-oxidative Mechanismen in den verschiedenen Spezies zu einer unterschiedlichen Dynamik in der Reduktionseffizienz der oxidativen Behandlungen führen (Dwyer et al., 2009, Alexander et al., 2016). Um das Auftreten von DNA-Läsionen nach den erweiterten

Abwasserbehandlungstechnologien zu untersuchen, wurden Antikörper-basierte Nachweissysteme, die gegen CPDs (Cyclobutanpyrimidin Dimere) und 6-4 PPs (6-4-Photoprodukte) gerichtet sind, verwendet (Süß *et al.*, 2009, Kraft *et al.*, 2011).

Cyclobutane Pyrimidine Dimers (CPDs)	6-4 Photoproducts (6-4 PPs)
---	--------------------------------



**Abbildung 12: Detektion der Cyclobutan-Pyrimidin Dimere (links) und der 6-4 Photoprodukte (rechts) nach innovativen Behandlungstechnologien (400 J m<sup>-2</sup> UV und/oder 1.0 g Ozon/ g DOC) mittels eines immunologischen Slot-blot Assays (Jäger *et al.*, 2018b).**

Die Fähigkeit der biologischen Inaktivierung durch UV-Licht entsteht in erster Linie dadurch, dass DNA-Moleküle UV-Strahlen im Bereich von 200 nm und 280 nm absorbieren. Durch die Absorption entstehen DNA-Veränderungen wie Strangbrüche und es kann zur Bildung von Dimeren, wie CPDs und 6-4-PPs kommen. Diese Photoprodukte inhibieren die Replikation und bei letalen Dosen kommt es zum Verlust der Reproduzierbarkeit. Diese DNA-Schäden müssen zunächst von Reparatursystemen behoben werden. Der Nachweis von CPDs und 6-4-PPs wurde bisher größtenteils in eukaryotischen Zellen zur Krebsforschung angewendet (Katiyar *et al.*, 2000, Nishiwaki *et al.*, 2004). Zum ersten Mal wurde es in der Studie von Kraft *et al.* (2011) auf bakterielle Populationen in natürlichen aquatischen Systemen angewendet. Die UV-Bestrahlung mit 400 J/ m<sup>2</sup> wird als Standard für Desinfektionstechnologien angesehen, da hier die Wirkung gegen Bakterien, Viren und Parasiten belegt ist und nur wenige Desinfektionsprodukte gebildet werden (Hijnen *et al.*, 2006). Es konnten sowohl CPDs, als auch 6-4-PPs in Proben, die mit einer UV-Intensität von 400 J/ m<sup>2</sup> behandelt wurden nachgewiesen werden (Abbildung 12). Dabei ist die Signalintensität der CPDs höher als die der 6-4-PPs. Es konnte gezeigt werden, dass CPDs im immunologischen Assay stärkere Signale produziert als die 6-4-PPs. Gründe hierfür könnte u.a. darauf basieren, dass das bakterielle Chromatin für die CPD-Antikörper besser zugänglich ist, dass generell mehr CPDs auftreten und weniger Interferenzen bei der Messung auftreten (Kraft *et al.*, 2011).

Im Falle des Antikörper-basierten Ansatzes wurde das Vorkommen von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren, sowie 6-4 Photoprodukten in den verschiedenen behandelten Abwasserproben analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die hier verwendete Bestrahlungsintensität von 400 J/ m<sup>2</sup> ausreichend war, um typische, durch UV verursachte DNA-Schäden zu induzieren.

In den mit Ozon behandelten Proben wurden bei den Chemilumineszenz-Messungen keine der beiden Läsionsarten nachgewiesen. Dies legt nahe, dass durch Ozon keine CPDs und 6-4-PPs gebildet werden. Dies könnte auf andere Schädigungen der DNA durch das Ozons zurückzuführen sein, welche hier jedoch nicht erfasst wurden. Die Wirkungsweise von Ozon kann sehr vielfältig sein. Es wird davon ausgegangen, dass DNA nicht zu den primären Reaktionszielen von Ozon gehört. Sollte es bis zu dieser durchdringen, so führt Ozon dort im Vergleich zur UV-Behandlung zu anderen Arten von DNA-Läsionen. Es wird berichtet, dass die Kinetik der Ozonmoleküle für Thymin (Geschwindigkeitskonstante  $3,4 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) höher ist als für Guanin, Cytosin oder Adenin (Cataldo, 2006, Alexander *et al.*, 2016) und dass das Thymin mit dem Ozon an der Position der Methylgruppe an der C(5)-C(6)-Doppelbindung reagiert, was einen spürbaren Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat (Flyunt, 2007). Die Oxidation an den Positionen C(5) und C(6) kann die Dimerbildung hemmen, so dass keine CPDs und 6-4 PP über den immunologischen Assay nachweisbar sind. Eine Erhöhung der Auftragungsmenge der Proben, die mit Ozon oder einer Kombination aus UV und Ozon behandelt wurden, führte nicht zu einem nachweisbaren Signal.

**Fazit: Es konnten beide Arten der DNA-Läsionen in UV behandelten Proben nachgewiesen werden. In den mit Ozon behandelten Proben waren bei den Chemilumineszenz-Messungen keine der beiden Läsionsarten detektierbar. Eine zusätzliche DNA-Schädigung der Bakterien durch Ozon, die eine CPD und 6-4 PP Bildung überdecken kann nicht ausgeschlossen werden. Dazu zählt auch eine Lyse der Bakterien und damit einhergehend ein reduziertes Detektionslimit für die DNA-Mutationen.**

### **3.6. Metagenom-Untersuchungen zu den Auswirkungen von Ozon auf die bakterielle Abwasserpopulation**

Um weitere Einblicke in die komplexe Abwassermatrix zu erhalten und insbesondere auch die Effekte der Ozonbehandlung auf mögliche Veränderungen innerhalb der im Abwasser vorhandenen Gesamtpopulation festzustellen, wurde das Metagenom von Abwasserproben analysiert. Zum einen diente die Untersuchung dem tieferen Einblick in die taxonomische Zusammensetzung vor und nach der Ozonung, um Populationsshifts sichtbar zu machen. Des Weiteren soll der Effekt einer Lebend/ Tot-Differenzierung mittels PMA-Behandlung untersucht werden, um die Notwendigkeit eines solchen Verfahrens bei desinfizierenden Reinigungstechnologien zu zeigen. Die verwendete Illumina HiSeq Sequenzierung kann u.U. in ihrer Effizienz durch den GC-Gehalt der Bakterien beeinträchtigt werden, die einen sehr hohem oder niedrigem GC-Gehalt aufweisen und dadurch eine geringere Abdeckung dieser Regionen des Genoms aufweisen und so u.U. unterschätzt werden (Chen *et al.*, 2013). Die Tiefe der Populationsanalysen wiederum ist abhängig von der Länge der Reads und der

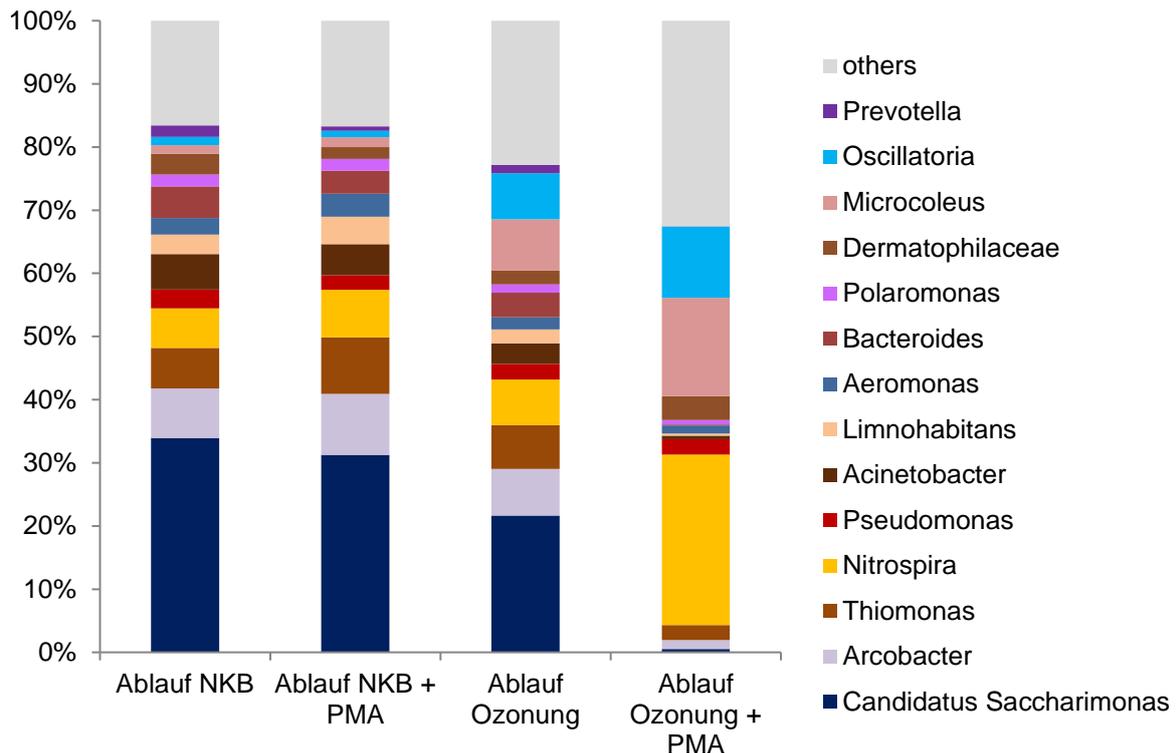
angewandten Paired-End-Sequenzierung. Es wurden 200 bp Fragmente für die taxonomische Identifizierung der verschiedenen, in den Abwasserproben vorhandenen Gattungen verwendet.

Die Sequenzierung ergab für jede Probe mindestens 25,9 Millionen Paare von 100 Nukleotid langen Reads, mit einem mittleren Phred-Qualitätswert > 35. Die Rohsequenz wurde mit dem Fastq-mcf-Tool des ea-utils Softwarepakets (Aronesty, 2011) getrimmt und gefiltert, um Sequenzen mit geringer Qualität und Illumina-Adapter-Sequenzen zu entfernen. Die getrimmten Sequenzen wurden mit MetaPhlan2 (Truong *et al.*, 2015) analysiert, um die taxonomische Zusammensetzung der Metagenome zu bestimmen. Die MetaPhlan2-Software verwendet eine Datenbank mit spezifischen genetischen Markersequenzen und bestimmt die taxonomische Zusammensetzung auf der Basis des Anteils der Reads, die auf diese Datenbank abgebildet werden. Der Anteil der Lesevorgänge, die auf die Markerdatenbank abgebildet werden, variiert für die in dieser Studie analysierten Proben zwischen 0,46 % und 1,06 % und sorgt somit für die Vergleichbarkeit der Proben untereinander. Darüber hinaus wurde ein Unähnlichkeitskoeffizient nach Yue-Clayton (Yue & Clayton, 2005) berechnet, der die Unterschiede zwischen der Gesamt- und der Lebendfraktion in der Zulauf-, sowie in der Ablaufprobe darstellt. Ein Koeffizient von 0 impliziert eine vollständige Ähnlichkeit zwischen beiden Populationszusammensetzungen, während ein Koeffizient von 1 eine vollständige Unähnlichkeit zwischen den Populationen anzeigt.

Die taxonomische Analyse mit MetaPhlan2 konnte prokaryotische, eukaryotische und virale Taxa identifizieren. Die Mehrzahl der Sequenzen wurde den Bakterien (82 - 93 %) zugeordnet. Die Population der Abwassergemeinschaft enthielt eine große Vielfalt an Taxa mit 166 verschiedenen Gattungen. Diese Metagenomanalysen erfolgten in Kooperation mit Dr. Andreas Dötsch, der zum Zeitpunkt der Analyse am IFG mit einer eigenen Arbeitsgruppe beschäftigt war.

Das am häufigsten vorkommende Taxon im Ablauf des Nachklärbeckens, das mehr als 30 % der Sequenzen abdeckt, konnte „*Candidatus Saccharimonas*“ zugeordnet werden, auch bekannt als TM7 (Albertsen *et al.*, 2013). Die taxonomische Position dieses Bakteriums ist zurzeit provisorisch und birgt einige Unsicherheiten in der exakten Identifizierung bei MetaPhlan2-Analysen. Dies könnte auch die unerwartet hohe Häufigkeit dieses spezifischen Mikroorganismus erklären. Albertsen *et al.*, (2013) analysierten dessen Abundanz mit ca. 1 % in der Population eines Belebtschlamm-Bioreaktors mittels Metagenom-Analyse. Frühere 16S Amplikon-Sequenzierungsdaten aus Abwässern identifizierten ebenfalls „*Candidatus Saccharimonas*“ in geringeren Häufigkeiten (Alexander *et al.*, 2016).

Mit Hilfe der MetaPhlan2-Analyse konnten die verbleibenden Bakterien unterschiedlichen Klassen von Proteobakterien zugeordnet werden. Hier konnten die Gattungen *Thiomonas* (5,7 %), die zu den  $\beta$ -Proteobakterien gehört, *Acinetobacter* (5,0 %) und *Pseudomonas* (2,6 %), die zu den  $\gamma$ -Proteobakterien gehören, sowie *Arcobacter* (7,1 %), welcher zu den  $\epsilon$ -Proteobakterien gehört identifiziert werden. Häufig im Wasser vorkommende Cyanobakterien der Gattungen *Microcoleus* und *Oscillatoria* wurden mit 1,2 % bzw. 2,9 % relativer Häufigkeit gefunden (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Populationsanalysen des Ablaufs des Nachklärbeckens und dem Ablauf der Ozonung mit und ohne Lebend/Tot-Diskriminierung mittels Illumina HiSeq Sequenzierung. Es wurden nur Genera berücksichtigt, die einen Anteil von  $\geq 1.0\%$  der Sequenzen darstellten. Die Übrigen wurden in der Gruppe 'others' aufgenommen. Veränderungen des Originals aus Jäger et al. 2018 wurden vorgenommen (Jäger et al., 2018a).**

Beim Vergleich des gesamten (nicht PMA-behandelte) und des lebenden Anteils (PMA-behandelte) der Population im Ablauf des NKBs, ergaben sich nur geringe Unterschiede. Im Falle von „*Candidatus Saccharimonas*“ wurde ein Rückgang von 2 % von der Gesamtpopulation auf die lebende Fraktion beobachtet. Für *Nitrospira* wurde ein Anstieg von 1,2 % festgestellt, welcher auch in anderen Studien beschrieben wird (Pang et al., 2016, Tian et al., 2017). *Pseudomonas spp.* hingegen erfuhr nur eine Veränderung von 0,5 % durch die PMA-Behandlung. Diese geringen Veränderungen spiegeln sich auch in einem niedrigen Wert des Yue-Clayton-Indexes wider. Hier wurde ein Wert von 0,04 errechnet, was hohe Ähnlichkeiten zwischen der Gesamtpopulation und dem lebenden Anteil der Population des Ablaufs des NKBs darstellt.

Ein Verhältnis zwischen der lebenden und der gesamten Population unter Verwendung von PMA-behandelten und nicht PMA-behandelten Abwasserproben wurde für die zuvor beschriebenen Bakteriengattungen berechnet. Das für diese Arbeit gewählte Modell zur Einteilung interpretiert ein Verhältnis über 1,2 als eine höhere relative Häufigkeit einer Gattung in der lebenden Subpopulation, während ein Verhältnis unter 0,8 eine geringere relative Häufigkeit anzeigt. Ein Verhältnis zwischen 0,8 und 1,2 wurde so definiert, dass es keine signifikanten Veränderungen in der Häufigkeit der jeweiligen Gattung vorliegt.

Das Lebend/Gesamt-Verhältnis für 5 der 14 häufigsten Gattungen im Ablauf des NKBs (über 1,0 % der Gesamthäufigkeit) wurde zwischen 0,8 und 1,2 klassifiziert (Tabelle 22 (Anhang)). Diese Gruppe (Gruppe A) bestand aus *Microcoleus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, „*Candidatus Saccharimonas*“ und enthielt zwei hygienisch relevante Gattungen, zu denen *P. aeruginosa* und *A. baumannii* gehörten. Darüber hinaus zeigten 5 der 14 Gattungen ein Verhältnis größer als 1,2 mit einem Maximalwert von 1,42 für *Thiomonas*. Diese Bakterien wurden in Gruppe B, die *Nitrospira*, *Aeromonas*, *Thiomonas*, *Arcobacter* und *Limnohabitans* enthält, aufgeführt. Gruppe C hatte ein Verhältnis unter 0,8 mit einem Minimum für *Prevotella* mit 0,39 und einem Maximum für *Oscillatoria* mit 0,79.

Der Vergleich der PMA behandelten Populationen vor und nach der Ozonung wies einen Yue-Clayton-Index von 0,86 auf, im Fall der Gesamtpopulation der Zulauf- mit der Ablaufprobe ergab sich ein Yue-Clayton-Koeffizienten von 0,25. Beide Indices deuteten auf den zu erwarteten Einfluss der Ozonbehandlung auf die Abwasserpopulationen hin. Im Fall von „*Candidatus Saccharimonas*“ nahm die Häufigkeit innerhalb der Populationen von 30 % im Zulauf auf 18,6 % im Ablauf ab. Die Abundanzen von *Nitrospira* und *Pseudomonas* blieben mit Veränderungen von jeweils ca. 0,5 % nahezu gleich. Deutlich stärkere Unterschiede wurden zwischen dem Gesamt- und dem lebenden Anteil (PMA-behandelt) des Ozonablaufs festgestellt (Abbildung 13). Die Häufigkeit von „*Candidatus Saccharimonas*“ nahm von 18,6 % auf 0,4 % ab, während für *Nitrospira* ein Anstieg um 15,1 % (von 6,2 % in der Gesamtfraktion auf 21,3 % in der lebenden Fraktion des Ablaufs) festzustellen war. Dieser Anstieg der relativen Häufigkeiten könnte einerseits ein Effekt von Populationsverschiebungen, aufgrund der Abnahme der relativen Häufigkeiten von „*Candidatus Saccharimonas*“ sein, andererseits berichteten Pang et al., (2016) auch über einen Anstieg von *Nitrospira* nach chemischer Desinfektion. Darüber hinaus wiesen die Autoren darauf hin, dass die komplexe Abwassermatrix zu einer unzureichenden Differenzierung von lebenden und toten Bakterien durch die PMA-Behandlung führen könnte. Im Fall von *Pseudomonas spp.* war eine Abnahme von nur 0,2 % nachweisbar, was auf eine gewisse Toleranz dieses Organismus gegenüber der Ozonbehandlung hinweist. Diese Veränderungen durch die Lebend/ Tot-Diskriminierung spiegeln sich auch im Yue-Clayton-Index wider. Hier wurde ein Wert von 0,66 ermittelt.

Die Lebend/Gesamt-Verhältnisse der verschiedenen Gattungen veränderten sich nach der Ozonung vollständig (Tabelle 23 (Anhang)). Dabei wiesen nur die Pseudomonaden (Gruppe A) ein Lebend/Gesamt-Verhältnis zwischen 0,8 und 1,2 auf, was auf keine deutlichen Veränderungen ihrer Häufigkeit innerhalb der Population durch die Ozonbehandlung hinwies.

In der PMA-behandelten Probe wurde bei 9 der 14 Gattungen ein Rückgang des Verhältnisses zwischen 0,59 (*Aeromonas*) und 0,02 (*Candidatus Saccharimonas*) beobachtet, was auf einen Rückgang zwischen 41 % -98 % der entsprechenden Häufigkeiten in der lebenden Fraktion der Populationen nach der Ozonung im Vergleich zu den entsprechenden Abundanzen in der Gesamtpopulation der ozonierten Probe (Gruppe C) hinwies. Gruppe C umfasste u.a. die hygienisch relevanten Gattungen wie *Acinetobacter* und *Bacteroides* (Tabelle 23 (Anhang)). Hier zeigte *Aeromonas* einen Anteil von 1,65 % ohne PMA bzw. 0,99 % mit PMA-Behandlung. Im Gegensatz zu den Gattungen der Gruppe C zeigten 4 der 14 Gattungen ein Lebend/Gesamt-Verhältnis von 1,42 bis 3,46 (Gruppe B), was auf eine Zunahme der Sequenzhäufigkeiten zwischen 22 % (*Oscillatoria*) und 210 % (*Nitrospira*) in der lebenden Fraktion nach der Ozonbehandlung hinwies (Tabelle 23 (Anhang)). Eine solche mögliche Zunahme bzw. Veränderungen innerhalb der Population konnten auch von Pang et al., (2016) beschrieben werden (Pang et al., 2016).

Von allen untersuchten Gattungen mit mehr als 1,0 % relativer Häufigkeit im Zulauf des Ozonsystems wurden *Limnohabitans*, *Acinetobacter*, *Prevotella*, *Bacteroides* und „*Candidatus Saccharimonas*“ auf weniger als 0,5 % nach der Ozonbehandlung reduziert.

Bei Verwendung härterer Verhältnisse (z.B. 0,5 und 2,0) zur Identifizierung der Unterschiede zwischen den nicht-PMA- und den PMA-behandelten Proben im NKBs zeigte die Mehrzahl der Bakteriengruppen keine Unterschiede. Lediglich für *Prevotella* wurde ein Verhältnis von 0,39 ermittelt, was auf eine Verringerung der relativen Häufigkeit innerhalb der Population hinwies ( $x < 0,5$ ).

Im Fall der Ozon behandelten Probe kam es zu Unterschieden in der Zuordnung der Bakterien zu den einzelnen Gruppen. Es wurde für 8 der 14 betrachteten Bakteriengruppen eine Reduktion der relativen Häufigkeit, die durch ein Verhältnis  $< 0,5$  angezeigt wurde, festgestellt, darunter *Polaromonas* (0,48), *Thiomonas* (0,31), *Arcobacter* (0,18), *Limnohabitans* (0,16), *Acinetobacter* (0,15), *Prevotella* (0,05), *Bacteroides* (0,04) und „*Candidatus Saccharimonas*“ (0,02). Für 5 der 14 Bakterien konnten keine Unterschiede ( $0,5 < x < 2,0$ ) festgestellt werden. In dieser Gruppe waren *Aeromonas* (0,60), *Pseudomonas* (0,92), *Oscillatoria* (1,42), *Dermatophilaceae* (1,63) und *Microcoleus* (1,77) vertreten. Eine Zunahme ( $x > 2,0$ ) konnte für *Nitrospira* (3,46) beobachtet werden. Damit zeigten diese Ergebnisse mit alternativ definierten Verhältnissgrenzwerten ebenfalls gattungsspezifische Auswirkungen der Ozonbehandlung auf

die Abwasserpopulationen an. Zum einen gab es den fakultativ pathogenen Erreger *P. aeruginosa* aus der Pseudomonadengruppe, bei dem keine oder eine geringe Sensitivität gegenüber der Ozonbehandlung festgestellt wurde, was auf den hohen GC-Gehalts (GC-Gehalt > 60 %) zurückgeführt werden könnte (Lee *et al.*, 2006, Hyatt *et al.*, 2010). Zum anderen gab es hygienisch relevante Bakterien, die durch die Behandlung stark beeinflusst wurden, wie *Acinetobacter* (mit *A. baumannii*) und *Bacteroides*.

**Fazit: Alle Bakterien, die im Ablauf des NKB in hoher Abundanz gefunden wurden, sind Vertreter der Belebtschlammpopulation (Albertsen *et al.*, 2013, Huber *et al.*, 2014, Liébana *et al.*, 2016, Saunders *et al.*, 2016). Darüber hinaus wurden hier Cyanobakterien, wie *Microcoleus* und *Oscillatoria* gefunden. Diese autotrophen Organismen sind dafür bekannt an den Abwasserreinigungsprozessen beteiligt zu sein (Laliberte *et al.*, 1994, Espigares *et al.*, 1996, Craggs *et al.*, 1997). Das Lebend/Gesamt-Verhältnis der Bakterien des NKB Ablaufs zeigte für die Mehrzahl der Gattungen innerhalb der Abwasserpopulation keine deutliche Veränderung in der taxonomischen Zusammensetzung durch die PMA Behandlung der Probe.**

Nach der Ozonbehandlung zeigten die Illumina Sequenzierungsdaten zur Populationsanalyse unter Verwendung der PMA-Behandlung einen deutlichen Effekt einer Lebend/ Tot-Differenzierung, die sich bei der Bewertung von Desinfektionstechnologien als ein nützliches und wertvolles Instrument herausstellte. Dies spiegelte sich auch im Yue-Clayton-Index wider, welcher die Veränderung der Population nach der PMA-Behandlung der Ozon behandelten Probe zeigte. Der Vergleich zwischen den PMA behandelten Proben des Nachklärbeckenauslauf und der Ozon behandelten Probe wies einen Yue-Clayton-Index von 0,86 auf, der einen signifikanten Populationsshift durch den oxidativen Prozessschritt beschreibt.

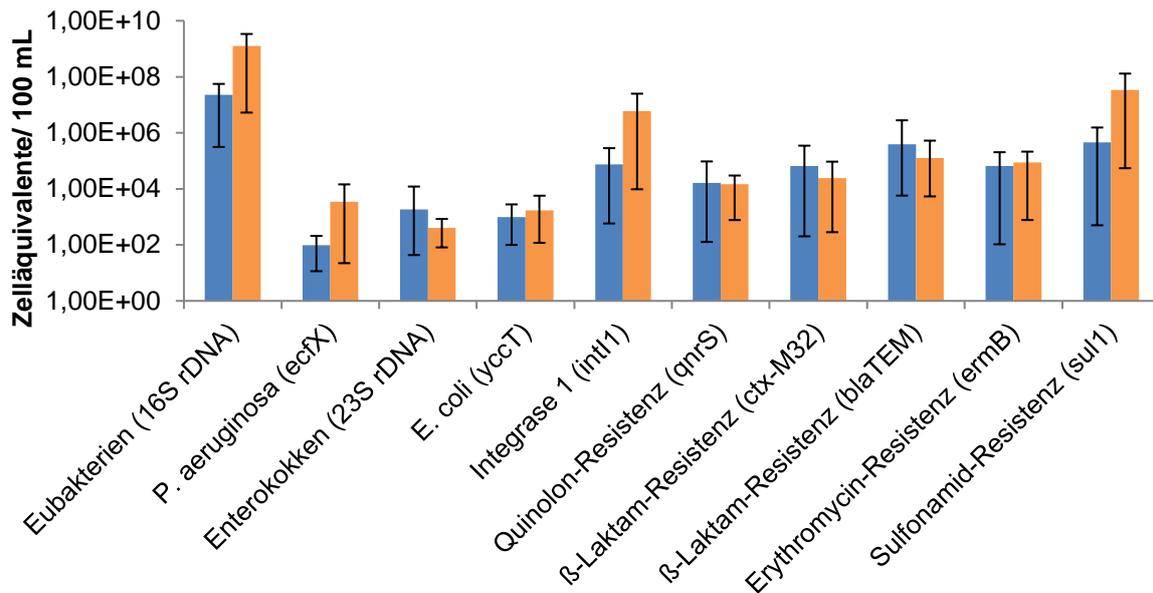
### **3.7. Wiederverkeimungspotentials der Abwasserpopulation nach einer Ozon-Behandlung**

Um Auswirkungen der Ozonbehandlung auf die Bakterienpopulation auch nach längerer nachfolgender Inkubationszeit sichtbar zu machen, wurden Versuche zum Wiederverkeimungspotential durchgeführt. Hierfür wurden Proben nach Ozonbehandlung (1 g Ozon/ g DOC) für 72 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend quantitativ mittels qPCR analysiert. Für die Quantifizierung der Zelläquivalente/ 100 mL, zur Bestimmung des Wiederverkeimungspotentials, wurden die Proben keiner Lebend/ Tot-Diskriminierung unterzogen. Zur Untersuchung wurden die taxonomischen, als auch die entsprechenden ausgewählten Resistenzgene verwendet.

Direkt nach der Ozonung lag der Ausgangswert des *16S rDNA* Gens bei  $2,26 \times 10^7$  Zelläquivalenten/ 100 mL. Nach der Inkubation von 72 Stunden bei Raumtemperatur war ein Anstieg um ca. 2 log-Stufen, auf einen Wert von  $1,26 \times 10^9$  Zelläquivalente/ 100 mL, feststellbar. Die mit Ozon behandelte Probe ergab eine Häufigkeit für das *E. coli* spezifische Markergen *yccT* von  $9,94 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 mL und stieg minimal während der 72 h auf  $1,72 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 mL an. Die Ozonung zeigte im Fall der untersuchten Enterokokken einen Ausgangswert von  $1,85 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL, der nach 72 h auf  $4,05 \times 10^2$  Zelläquivalente/ 100 mL sank. Der Ausgangswert von *P. aeruginosa* lag nach der Ozonung bei  $9,74 \times 10^1$  Zelläquivalenten/ 100 mL und stieg um ca. 2 log-Stufen auf einen Wert von  $3,46 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 mL wieder an und zeigte somit ein erhöhtes Wiederverkeimungspotential (Abbildung 14).

Im Fall des untersuchten Integrase 1 Gens (*intl1*) zeigte sich innerhalb der 72 stündigen Inkubation ebenfalls eine Zunahme der Häufigkeit auf  $6,04 \times 10^6$  Zelläquivalente/ 100 mL. Für das Quinolon-Resistenzgen *qnrS* wurde ein Messwert von  $1,47 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL erfasst, wodurch dieses Gen keine Veränderung während der Inkubationsdauer von 72 h erfuhr. Die Sulfonamidresistenz wies nach 72 h einen Wert von  $3,37 \times 10^7$  Zelläquivalente/ 100 mL auf, was eine deutliche Zunahme nach der Inkubation darstellte. Alle weiteren Resistenzgene wie *ermB*, *bla<sub>TEM</sub>* und *bla<sub>ctx-M32</sub>* bzw. deren Trägerorganismen zeigten keine Wiederverkeimung nach 72 h Inkubation. Die als Risikogene bezeichneten Resistenzgene *vanA* und *mecA* konnten in der mit Ozon behandelten Probe nicht detektiert werden, weder in der Kontrolle, noch in der nach 72 h Inkubation analysierten Probe (Abbildung 14).

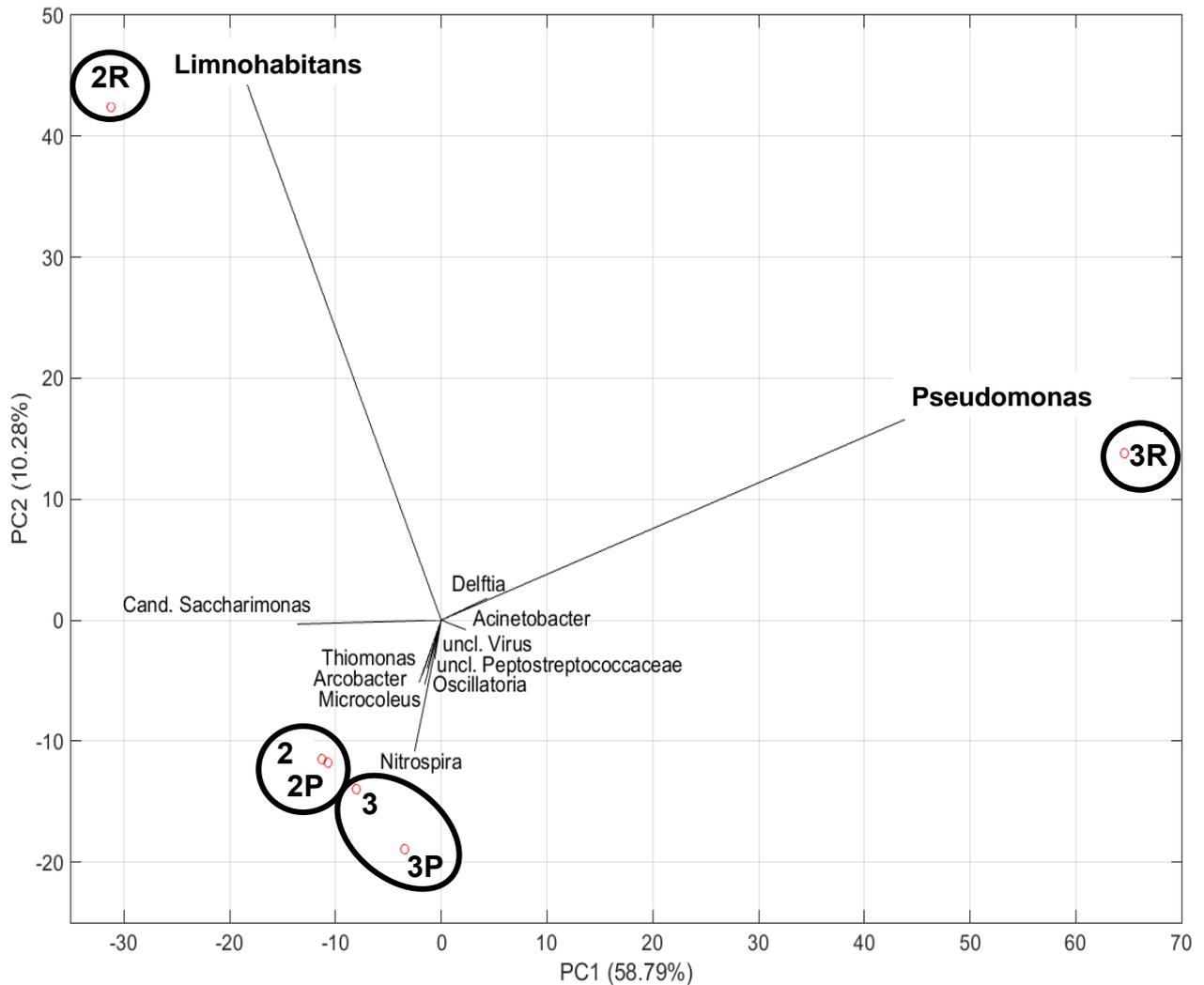
**Fazit:** Innerhalb der 72-stündigen Inkubation konnten, im Fall der absoluten Häufigkeiten, eine Zunahme der Gesamtbelastung (*16S rDNA*) und von *P. aeruginosa* (*ecfX*) gemessen werden. Ebenso konnte eine Zunahme der absoluten Häufigkeiten der Gene *intl1* und *sul1* beobachtet werden. Die restlichen Resistenzgene und das *E. coli* spezifische Gen (*yccT*) blieben während der Inkubationsdauer auf einem konstanten Level. Das Enterokokken spezifische Gen (*23S rDNA*) wies einen Rückgang auf. Dies lässt vermuten, dass u.U. einige Gene einen selektiven Vorteil mitbringen, der das Überleben der Träger dieser Gene fördert. So kann es durch die Behandlung zur Selektion von Resistenzgenen und auch Bakterienspezies kommen, die auf verbleibende Nährstoffe aus lysierten Bakterien in der behandelten Abwasserprobe zugreifen können. Diese Untersuchungen unterstreichen auch die Notwendigkeit einer ausreichenden bakteriellen Reduktion durch erweiterte Verfahren, um die nachfolgende Wiederverkeimung letztlich umfassend zu vermeiden.



**Abbildung 14: Wiederverkeimungspotential im Ablauf der Ozonbehandlung. Es sind die absoluten Belastungen, dargestellt durch die qPCR Ergebnisse, die auf 100 mL Abwasservolumen normiert wurden, gezeigt. In blau sind die Messungen direkt nach der Entnahme gezeigt. In orange sind die Ergebnisse nach einer 72-stündigen Inkubation dargestellt.**

### 3.7.1. Wiederverkeimungspotential und Populationsveränderungen nach der Ozonbehandlung anhand von Metagenomanalysen

Durch die Metagenom-Analysen konnten weitere Einblicke der Auswirkungen der Behandlungsmethode auf die Wiederverkeimungspotentiale der verschiedenen Bakterien gewonnen werden. Auch im Fall der mit Ozon behandelten Probe zeigte sich eine dominierende Gattung, die sich innerhalb der 72 h in der Probe hervortun konnte. Nach der Ozonbehandlung handelte es sich hierbei um *Pseudomonas* spp. mit einem Anteil von 71%, der auch schon in den vorangegangenen Untersuchungen ein hohes Potential zur Robustheit gegen Ozon und damit zur Wiederverkeimung gezeigt hat (Abbildung 22 (Anhang)). Auch *Acinetobacter* spp. erfuhr eine leichte Zunahme seiner relativen Häufigkeit auf 6,3%. Der Anteil von *Thiomonas* sank auf 0,39%, der von *Aeromonas* auf 0,03%. Mit jeweils einem Anteil von 0,02% in der Population konnten *Polaromonas*, *Nitrospira* und *Limnohabitans* detektiert werden. Die restlichen untersuchten Gattungen waren in der Probe nach 72 h Inkubation nicht in ausreichender Menge vorhanden. In der PCoA-Analyse zeigte sich auch eine deutliche Verschiebung der Probe (3R), d.h. 72 h nach Ozon-Behandlung in Richtung der Pseudomonaden (Abbildung 15).



- |                                   |                            |
|-----------------------------------|----------------------------|
| <b>2</b> Nachklärbecken           | <b>3</b> Ozonung           |
| <b>2P</b> Nachklärbecken + PMA    | <b>3P</b> Ozonung + PMA    |
| <b>2R</b> Nachklärbecken nach 72h | <b>3R</b> Ozonung nach 72h |

Abbildung 15: PCoA Darstellung der Metagenomanalysen. Dargestellt sind biologisch behandeltes Abwasser, mit und ohne PMA Behandlung (2, 2P), sowie biologisch behandeltes Abwasser nach 72h Inkubation (2R). Die mit 1g Ozon/ g DOC behandelten Proben mit und ohne PMA Behandlung (3, 3P), sowie Ozon behandeltes Abwasser nach 72h Inkubation (3R) sind ebenfalls in der Darstellung aufgeführt.

**Fazit:** In den Metagenomanalysen der Ozonbehandlung zeigten Pseudomonaden ein sehr hohes Wiederverkeimungspotential 72 h nach Behandlung. Mit einem Anteil von 71% dominierten sie die Populationszusammensetzung. Die anderen Bakterien konnten sich nach der Behandlung innerhalb der 72 stündigen Inkubationszeit nicht durchsetzen.

Ein sehr hohes Wiederverkeimungspotential nach der biologischen Reinigung zeigte *Limnohabitans*, der mit einem Anteil von 61,3% die Populationszusammensetzung nach 72 h dominierte. Die anderen Bakterien konnten sich hier nicht durchsetzen.

### **3.8. Regional unterschiedlich geprägte Siedlungsgebiete und das Auftreten von fakultativ pathogenen Bakterien und ARGs in abwasserbeeinflussten Systemen**

Die Auswahl des urban und ländlich geprägten Siedlungsgebiets erfolgt auf der Grundlage der ersten Einschätzungen zur Rolle des Abwassers als Ausbreitungsweg von resistenten Bakterien und Resistenzgenen im Untersuchungsgebiet. Es sollen Hinweise auf Quellen und mögliche Eintragungspfade von multiresistenten Bakterien und Resistenzgenen in die Gewässer identifiziert werden. Dabei sollen u.a. ein Überblick über die Belastungssituation im Gewässer gegeben werden, sowie relevante Eintragungspfade identifiziert werden, wie z.B. der Eintragungspfad Abwasser (Kläranlagen und indirekt Mischwasserüberläufe). Dabei zeichnet sich das urban geprägte Siedlungsgebiet durch Einträge aus Regenwasser, urbanen Einflüsse, sowie Mischwassereinträge inkl. Krankenhausabwasser und einem generell hohen Abwasseranteil aus. Das ländliche Siedlungsgebiet besitzt landwirtschaftlich genutzte Flächen und einen ebenfalls hohen Abwasseranteil. Des Weiteren wurden noch unterschiedliche Oberflächengewässer an verschiedenen Standorten im Untersuchungsgebiet beprobt und auf Mehrfach-Resistenzen untersucht. In diesen Untersuchungen sollte ein erster Überblick über die unterschiedlichen Einflüsse von Siedlungsgebieten und den dortigen Kläranlagen auf aquatische Systeme gezeigt werden. Hierzu wurden zwei Probenahmekampagnen für den ländlich und den urban geprägten Raum im Juli 2018 und August 2018 durchgeführt, bei denen qualifizierte Stichproben an den unterschiedlichen Probenahmestellen in den entsprechenden Gebieten genommen wurden. Dabei wurden Kläranlagen, sowie abwasserbeeinflusste System, aber auch Gewässer mit Freizeitnutzung und unbeeinflusste Gewässer untersucht.

#### **3.8.1 Einfluss von Kläranlagen auf das aufnehmende Gewässer**

Die molekularbiologischen Untersuchungen rund um die Kläranlage im urbanen Raum zeigten oberhalb der Kläranlage i.d.R. eine geringere gemessene Belastung an. Die Kläranlage selbst wies in den meisten Fällen eine deutlich höhere Belastung auf. Der Einfluss der Kläranlage auf das nachfolgende Gewässer wurde hier sehr deutlich. Im Fall der untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien, mit Ausnahme von *A. baumannii* und *E. faecalis*, war eine Zunahme der Belastung von oberhalb der Kläranlageneinleitung nach unterhalb der Kläranlageneinleitung festzustellen. Hier kam es teilweise zu einer Zunahme von mehr als einer Log-Stufe.

Im Fall von *E. coli* lagen die gemessenen Zelläquivalente/ 100 mL oberhalb der Kläranlage bei  $4,50 \times 10^3$  Zelläquivalente/ 100 mL. Unterhalb der Kläranlage konnten  $6,73 \times 10^4$  Zelläquivalente/ 100 mL nachgewiesen werden. Die Belastung innerhalb der Kläranlage lag bei den Messungen bei  $1,72 \times 10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL. Vergleichbare Tendenzen wurden für *K. pneumoniae* und Enterokokken beobachtet. Im Fall von *P. aeruginosa* war ein leicht höherer Wert nach der Kläranlage messbar. Bei *A. baumannii* war die Belastung oberhalb der

Kläranlage vergleichbar mit dem Vorkommen innerhalb der Kläranlage. Unterhalb der Kläranlageneinleitung war ein leicht verringertes Vorkommen zu beobachten (Abbildung 16).

Auch bei den Resistenzgenen zeigte sich der direkte Einfluss der Kläranlage auf das anschließende Gewässer. Die gemessenen Werte lagen hier für alle getesteten Resistenzgene unterhalb der Kläranlage höher als oberhalb der Kläranlage. Wie zuvor auch bei den fakultativ pathogenen Bakterien war die Belastung in der Kläranlage selbst am höchsten für die entsprechenden Resistenzgene. Besonderes Augenmerk galt den selten vorkommenden und als kritisch zu bewertenden Resistenzgenen. Diese waren bisher noch nicht häufig in der aquatischen Umwelt zu finden. Jedoch zeigte sich auch hier der potentielle anthropogene Einfluss auf Kläranlagen-beeinflusste Gewässer. Gerade hier zeigte sich, dass Resistenzgene, wie *bla<sub>VIM2</sub>*, *bla<sub>KPC-3</sub>* und das Vancomycin-Resistenzgen *vanA*, oberhalb der Einleitung nicht nachweisbar waren. Erst nach der Einleitung der Kläranlage konnten diese Gene detektiert werden (Abbildung 16, Tabelle 25, siehe Anhang).

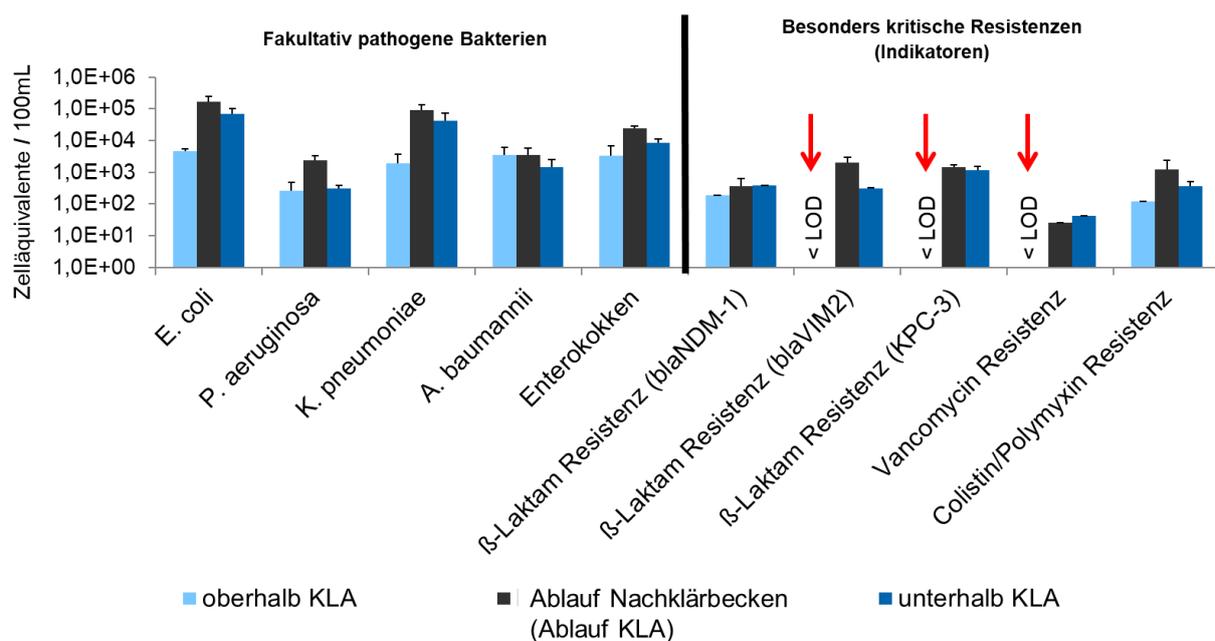


Abbildung 16: Darstellung des Einflusses der Kläranlage auf das aufnehmende Gewässer anhand einzelner ausgewählter Parameter. Gezeigt sind ausgewählte Parameter (fakultativ pathogene Bakterien und seltene, besonders kritische Resistenzgene) der Messpunkte oberhalb der Kläranlage (hellblau), des Ablaufs der Kläranlage (schwarz) und unterhalb der Kläranlage (dunkelblau). Mit „LOD“ gekennzeichnete Parameter konnten nicht detektiert werden.

**Fazit:** Die molekularbiologischen Untersuchungen zum Einfluss der Kläranlage auf das aufnehmende Gewässer zeigen deutlich, dass Kläranlagen einen starken Effekt auf die aufnehmenden Gewässer ausüben. So konnte eine geringere Belastung oberhalb der Einleitungsstelle der Kläranlage und eine Zunahme der Belastung unterhalb der Einleitungsstelle der Kläranlage beobachtet werden.

Auch im ländlichen Siedlungsgebiet zeigten die molekularbiologischen Untersuchungen des Auslaufs der Kläranlage den Einfluss der Kläranlage auf das aufnehmende Gewässer. Im Ablauf der Kläranlage konnten die taxonomischen Parameter, wie *E. coli* mit  $9,27 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL, *K. pneumoniae* mit  $6,54 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 mL und Enterokokken mit  $6,95 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 mL detektiert werden. Die weiteren untersuchten taxonomischen Parameter konnten nicht im Ablauf der Kläranlage nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnten unterhalb der Kläranlage alle untersuchten taxonomischen Markergene detektiert werden. Für *E. coli* wurden hier fast identische Werte von  $8,80 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL gemessen. Im Fall von *K. pneumoniae* und den Enterokokken lagen die gemessenen Werte bei  $9,52 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 mL und bei  $4,27 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL und somit höher als die Messwerte im Kläranlagenablauf. Des Weiteren wurden unterhalb der Kläranlage auch *P. aeruginosa* und *E. faecalis* detektiert, welche nicht in der Kläranlage gefunden wurden (Abbildung 17 und 18, Tabelle 26 (Anhang)).

Im Fall der häufig vorkommenden Resistenzgene zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Kläranlagenablauf und den Messergebnissen der Probe unterhalb der Kläranlage. Die Sulfonamidresistenz war mit  $4,36 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100m unterhalb bzw.  $5,09 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ 100 mL im Ablauf Kläranlage am häufigsten vertreten. Auch bei den weiteren häufig vorkommenden Resistenzgenen waren die gemessenen Abundanzen unterhalb der Kläranlage nur geringfügig niedriger als im Ablauf der Kläranlage. Die Messwerte lagen zwischen ca.  $10^4$  und  $10^5$  Zelläquivalente/ 100 mL. Ein ähnlicher Trend war auch bei den intermediär vorkommenden Resistenzgenen zu beobachten. Die Unterschiede zwischen der Kläranlage und der Messstelle unterhalb der Kläranlage waren sehr gering. Die gemessenen Werte lagen hier zwischen  $1,67 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 mL für die  $\beta$ -Laktam Resistenz *bla<sub>ctx-M</sub>* in der Kläranlage, bzw. bei  $1,88 \times 10^2$  unterhalb der Kläranlage und  $4,76 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL für die  $\beta$ -Laktam Resistenz *bla<sub>OXA-48</sub>* in der Kläranlage, bzw.  $3,99 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL unterhalb der Kläranlage. Die Werte für die  $\beta$ -Laktam Resistenzen *bla<sub>ctx-M32</sub>* und *bla<sub>CMY-2</sub>* lagen bei  $1,11 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL im Auslauf der Kläranlage und bei  $1,13 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL unterhalb der Kläranlage, bzw. bei  $1,21 \times 10^3$  Zelläquivalenten/ 100 mL in der Kläranlage und bei  $9,46 \times 10^2$  Zelläquivalenten/ 100 mL unterhalb der Kläranlage. Im Fall der seltenen und als besonders kritisch zu wertenden Resistenzgene konnten in der Kläranlage im ländlich geprägten Raum keine Werte gemessen werden (Abbildung 17). Lediglich unterhalb der Kläranlage konnte zwei der untersuchten Parameter nachgewiesen werden (Abbildung 18). Dies war zum einen das  $\beta$ -Laktam Resistenzgen *mecA*, was eine Resistenz gegen Methicillin vermittelt und das  $\beta$ -Laktam Resistenzgen *bla<sub>KPC-3</sub>*.

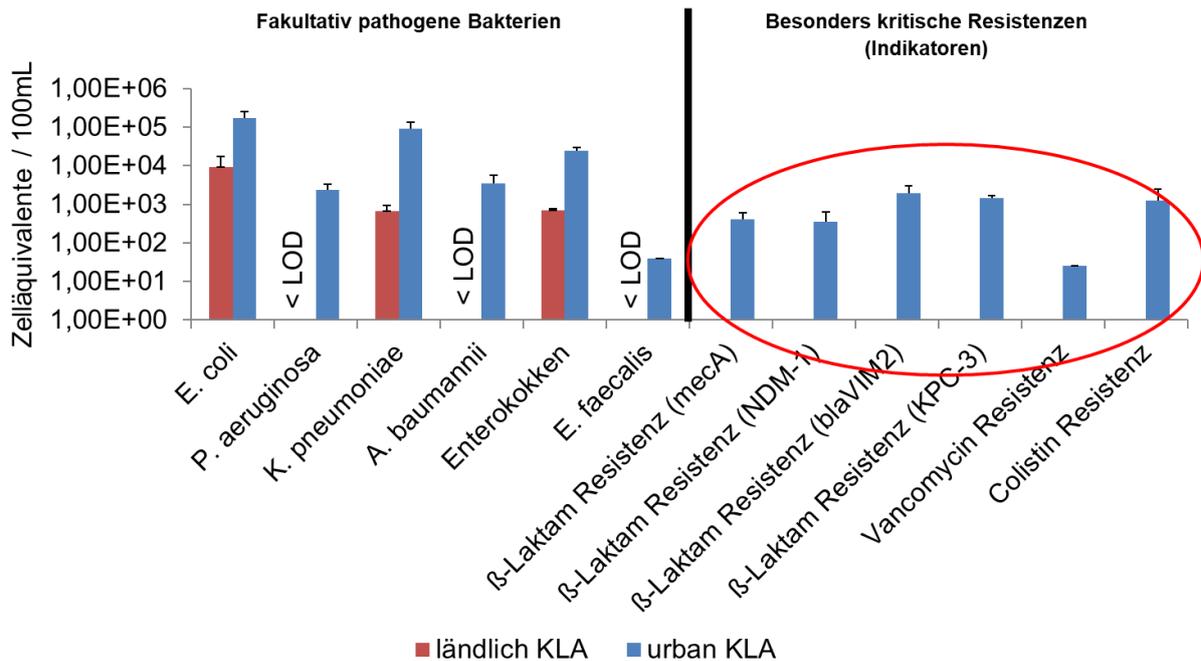
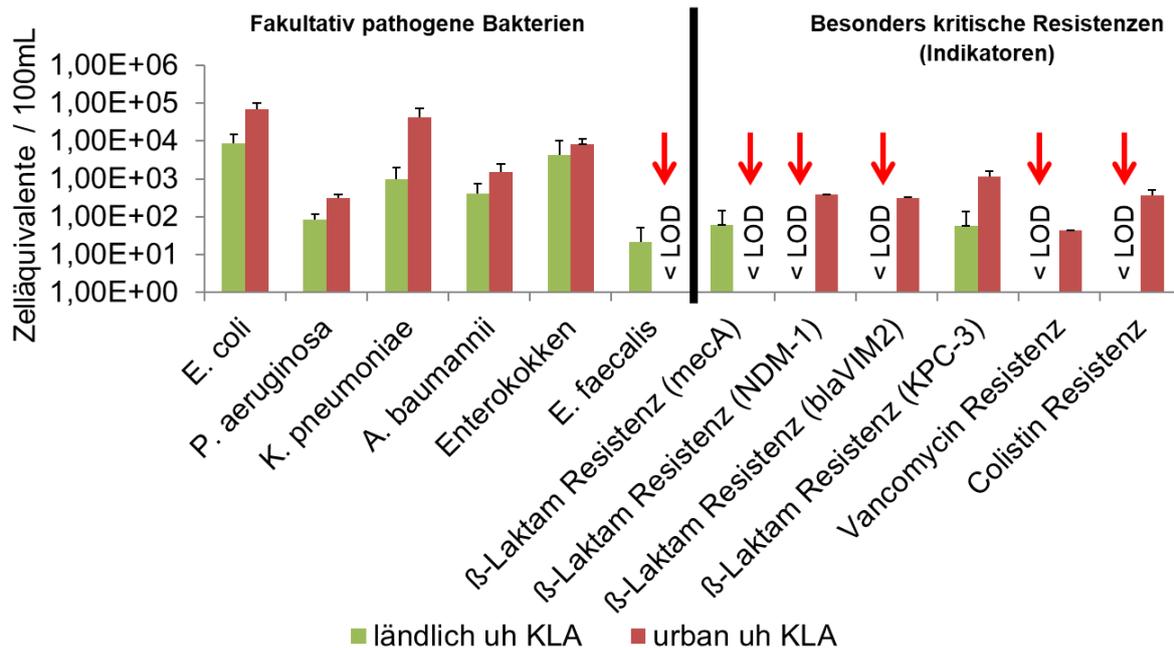


Abbildung 17: Darstellung ausgewählter Parameter der unterschiedlichen Kläranlagenabläufen, entsprechend der Art des Siedlungsgebiets. Gezeigt sind ausgewählte Parameter (fakultativ pathogene Bakterien und seltene, besonders kritische Resistenzgene) der Kläranlagenausläufe im ländlich geprägten Raum (rot) und im urban geprägten Raum (blau). Mit „LOD“ gekennzeichnete Parameter konnten nicht detektiert werden.

**Fazit:** Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten Kläranlagen im urbanen oder ländlich geprägten Raum konnten festgestellt werden. Die untersuchte Kläranlage im urbanen Raum wies eine stärkere Belastungssituation auf als die ländliche geprägte Kläranlage. So waren im Auslauf der Kläranlage im ländlichen Raum 3 von 6 Parametern der fakultativ pathogenen Bakterien und keiner der 6 als kritisch einzustufenden Antibiotika-Resistenzgene nachweisbar. Im Ablauf der urban geprägten Kläranlage konnten alle 6 Parameter der fakultativ pathogenen Bakterien, sowie alle 6 als kritisch einzustufende Antibiotika-Resistenzgene detektiert werden.



**Abbildung 18: Darstellung ausgewählter Parameter von kläranlagenbeeinflussten Gewässern. Gezeigt sind ausgewählte Parameter (fakultativ pathogene Bakterien und seltene, besonders kritische Resistenzgene) des aufnehmenden Gewässers, welches durch eine im ländlichen Raum gelegenen Kläranlage beeinflusst wurde (grün), bzw. einer im urbanen Raum gelegenen Kläranlage (rot). Mit „LOD“ gekennzeichnete Parameter konnten nicht detektiert werden.**

Nicht nur an den Kläranlagenausläufen ließen sich die unterschiedlichen Belastungssituationen feststellen. Auch im Gewässer zeigte sich dieser Einfluss (Abbildung 18). Diese unterschiedlichen hohen Belastungssituationen in den Kläranlagenausläufen spiegelten sich in dem aufnehmenden Gewässer wider. So waren im Vorfluter der urban geprägten Kläranlage 5 der 6 taxonomischen Parameter messbar. Ebenso waren 5 der 6 seltenen und als besonders kritisch zu wertenden Antibiotika-Resistenzgene nachweisbar. Im Vorfluter der im ländlichen Raum befindlichen Kläranlage zeigte sich auch für die taxonomischen Parameter eine deutliche Belastung. So waren hier alle der untersuchten taxonomischen Parameter detektiert worden. Generell waren hier die gemessenen Zelläquivalente/ 100 mL jedoch geringer als bei der Kläranlage im urbanen Raum. Im Fall der seltenen und als besonders kritisch zu wertenden Resistenzgene konnten noch 2 der 6 untersuchten Parameter im Vorfluter der ländlich geprägten Kläranlage gemessen werden. Im Vorfluter der Kläranlage im urbanen Raum konnten nahezu alle kritischen Resistenzgene nachgewiesen werden. Trotz der geringeren Belastung im ländlichen Raum, welche auch durch die Größe der Kläranlage beeinflusst sein kann, ist dennoch aufgrund der Anwesenheit der *mecA* und *bla<sub>KPC-3</sub>* Resistenzgene Handlungsbedarf an der betreffenden Kläranlage erforderlich.

### **3.8.2 Auswirkungen der Abwassereinleitung in unterschiedlich geprägten Siedlungsgebieten anhand Kultur-basierter Untersuchungen**

Die auf Kultivierungsmethoden basierenden Untersuchungen zeigten den Effekt der Kläranlage auf das aufnehmende Gewässer (Abbildung 23 und 24, siehe Anhang). Im Bereich der urban geprägten Kläranlage ließ sich ein deutlicher Effekt der Kläranlage auf das anschließende Gewässer beobachten (Abbildung 23). Im Auslauf des Nachklärbeckens (NKBs) der Kläranlage war die Belastungssituation am höchsten. Hier konnten KBE/ 100 mL von bis zu  $1,29 \times 10^5$  KBE/ 100 mL für *E. coli* gemessen werden. Oberhalb der Kläranlage fiel die Belastung stets geringer aus. Auch unterhalb der Kläranlage fiel die Belastungssituation geringer aus als an der Kläranlage selbst, was auf einen möglichen Verdünnungseffekt im Fluss zurückzuführen sein könnte. Jedoch war die Belastung unterhalb der Kläranlage höher als oberhalb der Kläranlage. Somit war hier eine Zunahme der Belastung feststellbar, die u.U. durch die Einleitung der Kläranlage ausgelöst wurde. Auch die Belastung mit ESBL-resistenten Bakterien, Bakterien die ein erweitertes Spektrum an  $\beta$ -Laktamresistenzen aufweisen, deutete darauf hin, dass die Belastung im KLA Ablauf und unterhalb der Kläranlage am höchsten war. Im Vergleich zum Kläranlagenablauf und unterhalb der Kläranlage konnten geringere Konzentrationen oberhalb der Kläranlage gemessen werden. Es konnten allgemein auf dem ESBL-Plattensystem jedoch nur geringe KBE/ 100 mL gezählt werden.

Im Fall der ländlich geprägten Kläranlage zeigte sich für einige Bakterien eine höhere Belastung unterhalb der Kläranlage (Abbildung 24). Dies konnte im Fall von *E. coli*, *Acinetobacter spp.* und intestinalen Enterokokken gezeigt werden. Die gemessenen KBE/ 100 mL für MRSA zeigten in der Kläranlage und unterhalb der Kläranlage fast identische Werte mit  $1,35 \times 10^2$  bzw.  $1,32 \times 10^2$  KBE/ 100 mL. Die Belastung mit *P. aeruginosa* und Vancomycin-resistenten Enterokokken war in der Kläranlage höher als an der Untersuchungsstelle unterhalb der Kläranlage. Eine Belastung mit Vancomycin-resistente Enterokokken in der Kläranlage konnte mit  $5,4 \times 10^1$  KBE/ 100 mL festgestellt werden, die Belastung unterhalb der Kläranlage mit  $1,4 \times 10^1$  KBE/ 100 mL. ESBL resistente Bakterien konnten in sehr geringen Konzentrationen in der Kläranlage (*Acinetobacter spp.* mit 2 KBE/ 100 mL) und unterhalb der Kläranlage (2 KBE/ 100 mL *E. coli* und KEC-Gruppe;  $1,0 \times 10^2$  KBE/ 100 mL für *Acinetobacter spp.*) nachgewiesen werden. Die auszählbaren Kolonien lagen hier sehr nahe an der Nachweisgrenze, was eine eindeutige Interpretation und Quantifizierung der ESBL-resistenten Bakterien erschwerte.

### **3.8.3 Auftreten von mehrfach resistenten Bakterien in den verschiedenen Siedlungsgebieten**

Zur Untersuchung der Mehrfach-Resistenzen wurden mit Hilfe von Selektivagarplatten für Gram-negative Bakterien mit einem erweiterten Spektrum an  $\beta$ -Laktamresistenzen (ESBL) Bakterien selektiert und anschließend isoliert. Aufgrund der Wachstumsunterdrückung der

Begleitflora wurde die Inkubation, wie von Müller et al., (2018), eine im Rahmen des HyReKa-Projekts etablierte Methode, beschrieben, bei 42°C durchgeführt. Die so gewonnenen Isolate wurden anschließend in Vollmedium angereichert und zur Kontrolle nochmals auf ESBL-Platten und Vollmediumplatten ausgebracht, um den Kolonietyp nochmals zu verifizieren und um mögliche Kontaminationen auszuschließen (siehe Kapitel 2.6).

Im Anschluss erfolgte die Ermittlung der Mehrfach-Resistenzen der Isolate mittels des Agardiffusionstests. Hierbei wurde nach den Vorgaben der KRINKO gearbeitet (Wendt *et al.*, 2012). Dabei wurden die Antibiotikaklassen der Cephalosporine, Penicilline, Fluoroquinolone und Carbapeneme berücksichtigt. Die entsprechenden Antibiotika zur Resistenzbestimmung sind in Kapitel 2.6 aufgeführt. Eine Resistenz lag vor, sollte gegen eine der Testsubstanzen ein entsprechender Hemmhof vorliegen. Treten Resistenzen gegen 3 oder 4 Antibiotikaklassen auf so spricht man von einer 3- oder 4-fach Resistenz. Hierbei wurden die Grenzwerte von EUCAST "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 9.0, 2019 <http://www.eucast.org>" verwendet um eine Resistenz gegen das jeweilige Antibiotikum festzustellen.

Im *urban* gelegenen, nicht von Kläranlagen beeinflussten *Oberflächengewässer* konnten 3 Isolate, welche auf den ESBL-Selektivagarplatten wuchsen, gepickt werden. Die Analysen zur Mehrfachresistenz zeigten, dass hier ein mehrfach resistentes Bakterium auftrat. Dieses wies Resistenzen gegen 3 der 4 Antibiotikaklassen auf. Hierbei handelte es sich laut Farbindikation des Agarplattenherstellers um ein *E. coli* Isolat. Es wurden keine Isolate gefunden, die gegen alle 4 Antibiotikaklassen Resistenzen zeigten. Die weiteren Isolate (*Proteus* spp. und *Acinetobacter* spp.) zeigten keine 3- oder 4-fach Resistenzen. Sie waren i.d.R. gegen eine oder zwei Antibiotikaklassen resistent.

Im Fall des im *urbanen* Siedlungsgebiet gelegenen Sees konnten 2 Isolate (*Proteus* spp. und *Pseudomonas* spp.), welche auf den ESBL-Selektivagarplatten Kolonien bildeten, gepickt werden. Die Analysen zur Mehrfachresistenz zeigen, dass hier keine mehrfach resistenten Bakterien gefunden wurden.

Im Bereich der *urbanen Kläranlage* (oberhalb, unterhalb der Kläranlage und der Kläranlagenablauf) konnten in Summe 16 Isolate auf Multiresistenz untersucht werden. Davon waren 3 Isolate (2x *E. coli*, 1x *Acinetobacter* spp.) aus dem Bereich oberhalb der Kläranlage, 7 aus dem Bereich unterhalb der Kläranlage (2x *E. coli*, 2x KEC-Gruppe, 2x *Acinetobacter* spp. und 1x *Proteus* spp.) und 6 Isolate aus der Kläranlage selbst (2x *E. coli*, 2x KEC-Gruppe, 1x *Acinetobacter* spp. und 1x *Proteus* spp.). In allen Bereichen konnten Isolate, die als 3 MRGN eingruppiert wurden, identifiziert werden. Ein Isolat aus der Kläranlage konnte als

besonders kritischer 4 MRGN Keim eingestuft werden. In Summe konnten 7 der 16 Isolate als 3 MRGN und 1 der 16 Isolate als 4 MRGN eingestuft werden. Zu den 7 Isolaten zählten beide *E. coli* Isolate aus der Probenahmestelle oberhalb der Kläranlage, sowie zwei *E. coli* Isolate und zwei Isolate die zur KEC-Gruppe gezählt wurden aus der Probenahmestelle unterhalb der Kläranlage und ein *E. coli* Isolat aus der Kläranlage selbst. Das 4 MRGN Isolat stammte aus der Kläranlage und konnte der KEC-Gruppe zugeordnet werden.

Im *ländlich* gelegenen, nicht von Kläranlagen beeinflussten *Oberflächengewässer* konnten 3 Isolate (3x *Proteus* spp.), welche auf den ESBL-Selektivagarplatten Kolonien bildeten, gepickt werden. Die Analysen zur Mehrfachresistenz zeigten hier keine mehrfach resistenten Bakterien.

Der im *ländlichen* Siedlungsgebiet untersuchte *See* wies 2 Isolate (2x *Acinetobacter* spp.), welche auf den ESBL-Selektivagarplatten gewachsen sind auf. Hier konnten mehrfach resistenten Bakterien gefunden werden. Die Isolate wiesen Resistenzen gegen 3, als auch gegen 4 der 4 Antibiotikaklassen auf.

Im Bereich der *ländlichen Kläranlage* (unterhalb der Kläranlage und der Kläranlagenauslauf) konnten in Summe 3 Isolate auf Multiresistenz untersucht werden. Davon waren 2 Isolate (*E. coli* und *Acinetobacter* spp.) aus dem Bereich unterhalb der Kläranlage und 1 Isolat (*Acinetobacter* spp.) aus der Kläranlage selbst. Es konnten das *Acinetobacter* spp. Isolat aus der Kläranlage und das *E. coli* Isolat aus der Probenahmestelle unterhalb der Kläranlage als 3 MRGN eingestuft werden.

**Tabelle 12: Multiresistenzanalysen im urban und ländlich geprägten Raum. Hellgrau hinterlegt sind die urban geprägten Messstellen. In dunkelgrau sind die ländlich geprägten Messstellen hervorgehoben.**

Messstellen	3 MRGN	4 MRGN
Oberflächengewässer (urban)	+	-
See (urban)	-	-
Oberhalb KLA (urban)	+	-
Unterhalb KLA (urban)	+	-
Ablauf KLA (urban)	+	+
Ablauf KLA (ländlich)	+	-
Unterhalb KLA (ländlich)	+	-
Oberflächengewässer (ländlich)	-	-
See (ländlich)	+	+

**Fazit: Antibiotika-Resistenzgene und fakultativ pathogene Bakterien konnten in Oberflächengewässern nachgewiesen werden. Je nach Art des anthropogenen Einflusses sind die gemessenen Abundanzen unterschiedlich ausgefallen. Ebenso konnten die seltenen und als besonders kritisch einzustufenden Resistenzgene bereits in geringen Häufigkeiten nachgewiesen werden. Jedoch wurde immer der Einfluss der Kläranlagen auf das anschließende Gewässer deutlich. So konnte eine geringere Belastung oberhalb der Einleitungsstelle der Kläranlage und eine Zunahme der Belastung unterhalb der Einleitungsstelle der Kläranlage beobachtet werden. Die vom urbanen Raum geprägte Kläranlage wies eine stärkere Belastungssituation auf als die ländlich geprägte Kläranlage. Diese unterschiedlichen hohen Belastungssituationen in den Kläranlagenabläufen spiegeln sich in dem aufnehmenden Gewässer wieder. Daher ist Handlungsbedarf an den betreffenden Kläranlagen erforderlich. Auch im Vergleich der Fließgewässer zeigte sich, dass die Grundbelastung im ländlichen Raum im Vergleich zum urban geprägten Siedlungsgebiet geringer ist. Die zusätzlichen Multiresistenz-Untersuchungen vervollständigten das Bild und wiesen auf eine schon häufigere Verbreitung von 3 MRGN und vereinzelt auch 4 MRGN in den analysierten Wassersystemen hin.**

#### **4. Europa-weite Untersuchungen zur Belastung von Aufbereitetem Abwasser aus Kläranlagen mit Antibiotika-resistenten Bakterien und Antibiotikarückständen**

Die europäischen Studien befassten sich u.a. mit der Resistenzlage in Kläranlagenabläufen, bei denen die Standardisierung und Harmonisierung neuer und geeigneter Nachweissysteme im Fokus lag. So beschrieb Rocha et al., (2018) die Harmonisierung eines molekularbiologischen Nachweissystems für Antibiotika-Resistenzgene. Diese Studie wurde unter Beteiligung des KIT im Rahmen des EU-Projekts NORMAN durchgeführt, bei der ein Quantifizierung von ausgewählten Parametern mittels qPCR durchgeführt wurde, da diese Nachweismethode in einer Vielzahl an Studien zum Einsatz kommt. Der Vergleich der Ergebnisse verschiedener Institute kann hierbei schwerfallen, da bisher keine harmonisierten Protokolle für die Experimente vorlagen. Ziel der Studie war die Kalibrierung zwischen den unterschiedlichen beteiligten Laboren. Als Ausgangsmaterial diente einheitlich extrahierte DNA unterschiedlicher Kläranlagenabläufen unterschiedlicher europäischer Partner. Anschließende Messungen wurden mit einheitlichen Protokollen und Reagenzien durchgeführt. Einzige Unterschiede in den Versuchsdurchführungen waren der Operator und das entsprechende qPCR-Gerät. Die maximale Variation zwischen den beteiligten Laboren lag bei 28%, was sich somit positiv auf die Vergleichbarkeit der generierten Daten aus unterschiedlichen Laboren auswirkte. Folglich waren diese molekularbiologischen Ansätze

neben den kulturbasierten Ansätzen für die umfassende Überwachung der Resistenzentwicklung, aber auch für die hygienische Kontrolle der Abwasserqualität gut geeignet. Aus diesem Grund sind harmonisierte Protokolle und laborübergreifende Kalibrierungen für die zuverlässige Quantifizierung von ARB und ARGs zur Kontrolle der Abwasserqualität, sowie für das Überwachen in der Umwelt von entscheidender Bedeutung (Rocha *et al.*, 2018). Die Autoren wiesen darauf hin, dass die Festlegung der folgenden Kriterien für die Interpretation der qPCR Ergebnisse wichtig sind: (A) Amplifikate einzelner qPCR-Reaktionen unter Verwendung eines gegebenen Primer-Paares und eines Master-Mixes sollten eine charakteristische Schmelztemperatur ( $\pm 1$  °C) aufweisen; (B) qPCR-Reaktionen, die keinen eindeutigen und/ oder mehrere Schmelztemperatur-Peaks bilden, können eine Überschätzung der Genamplifikation ergeben und müssen vermieden werden; (C) die Konzentration der DNA in einem Reaktionsgefäß sollte zwischen 0,39 und 7,2 ng/ $\mu$ L liegen. Bei weniger häufigen Genen sollten jedoch höhere DNA-Konzentrationen in Betracht gezogen werden (Rocha *et al.*, 2018). Des Weiteren ist die Qualität des DNA-Extrakts auch ein kritischer Faktor, z.B. bei Proben mit geringer Biomassebelastung, wie sie bei der Abwasserdesinfektion entstehen. In diesen Situationen können nicht nur niedrige DNA-Konzentrationen, sondern auch die Effizienz der DNA-Extraktion, beeinflusst z.B. durch die schlechte Lyse gestresster Bakterienzellen, Probleme bereiten. Darüber hinaus ist die Quantifizierung von häufig vorkommenden Genen in verdünnten und unverdünnten Proben ratsam, um die potentiell inhibitorischen Wirkungen zu beurteilen (Rocha *et al.*, 2018).

Eine weitere Möglichkeit zur umfangreichen Erfassung der Resistenzsituation zeigte der gewählte Ansatz der Studie von Pärnänen *et al.*, (2019) auf. Diese Studie wurde im Rahmen von JPI StARE durchgeführt und ist Teil dieser Dissertationsarbeit. Die Publikation war die erste internationale Überwachungsstudie europäischer Abwässer, die bisher durchgeführt wurde. Hier konnte eine Verteilung der ARGs in den untersuchten europäischen Kläranlagen festgestellt werden, die zu einer Einteilung von Belastungssituationen der untersuchten Länder in Norden und Süden führte, was mit dem übereinstimmt, was insbesondere für klinische Isolate gezeigt wurde (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018). Mit Hilfe eines Hochdurchsatz qPCR-Arrays wurden in dieser Studie insgesamt 229 Resistenzgene inkl. 39 unspezifischer Resistenz vermittelnder Gene, sowie 25 mobilen genetischen Elementen (MGE) wie Integrase-, Transposase-Gene und Insertionssequenzen, untersucht. Alle untersuchten Proben des Zulaufs enthielten Resistenzgene gegen Aminoglykoside,  $\beta$ -Laktame, Makrolide-Lincosamide-Streptogramin B, Sulfonamide, Tetrazykline, Mehrfachresistenzgene, aber auch mobile genetische Elemente (MGEs). Resistenzgene von hoher klinischer Relevanz wurden sporadisch in den Zulaufproben der unterschiedlichen Nationen detektiert (Abbildung 19). Die Daten zeigten für die vom KIT untersuchte Kläranlage (DE2), dass sich die relativen Häufigkeiten im Zulauf mit den der anderen LAC-Länder (LAC,

low antibiotic consumption, DE, Deutschland; FI, Finnland; NO, Norwegen) vergleichen ließen. Im Vergleich zu den HAC-Ländern (HAC, high antibiotic consumption; PT, Portugal; ES, Spanien; CYP, Zypern; IL, Irland) dominieren bei den LAC-Ländern die Resistenzgene, die für Tetracycline und Makrolid-Linkosamid-Streptogramin B (MSBL) Antibiotika codieren, während die weiteren Antibiotikaklassen in den HAC-Ländern dominieren (Abbildung 19). Insertionssequenzen dominieren in den LAC-Ländern. Für Transposase- und Integrasegene konnte keine genaue Zuordnung getroffen werden. Jedoch lagen die relativen Häufigkeiten für DE2 in Summe niedriger als bei den HAC-Ländern. Des Weiteren deuten die gewonnenen Daten darauf hin, dass die untersuchten Kläranlagen, die ein Sekundärbehandlungsverfahren mit unterschiedlichen Konfigurationen und in einigen wenigen Fällen mit einer tertiären Behandlung oder einer Desinfektionsstufe arbeiten, in der Lage waren, die relative Häufigkeit aller untersuchten ARG-Klassen deutlich zu reduzieren. Eine Ausnahme war dabei das Gen, das die Resistenz gegen Vancomycin kodiert. In Abbildung 20 wurden beispielhaft einige der Untersuchungsparameter zusammengefasst. So konnte für DE2 (KIT) sowohl im Frühjahr, als auch im Herbst ein signifikanter Rückgang durch die Abwasserbehandlung im Fall der Tetracyclin und MSBL vermittelnden Resistenzgene festgestellt werden (Abbildung 20 B1 und B2). Eine Zunahme konnte für die Insertionssequenzen sowohl im Frühjahr, als auch im Herbst gemessen werden (Abbildung 20 B3). Keine signifikante Veränderung trat bei DE2 (KIT) im Fall der Transposase-Gene auf (Abbildung 20 B4).

Generell war die ARG-Belastung nach der Abwasserreinigung im Süden (HAC, high antibiotic consumption) deutlich höher als in den nördlichen Ländern (LAC, low antibiotic consumption). Folglich wurde angenommen, dass das finale Abwasser der HAC-Länder die Umwelt stärker belastet als das der LAC-Länder.

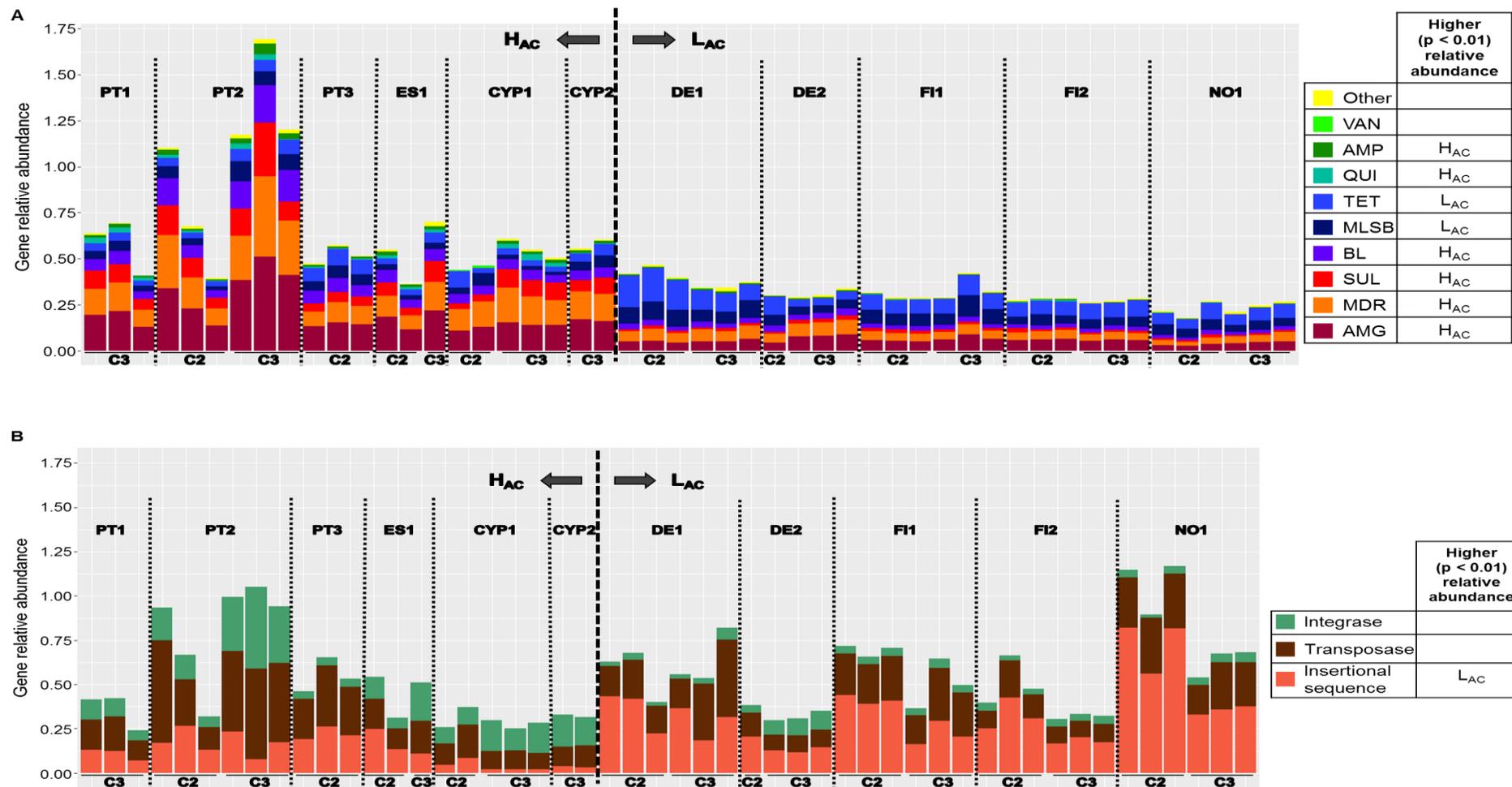


Abbildung 19: Relative Genhäufigkeiten, der Zulaufproben von Ländern mit hohem (HAC) und niedrigem (LAC) Antibiotikakonsum, die gemessen wurden. Unter (A) sind die Resistenzgene und unter (B) genetische Rekombinationselemente dargestellt. Die Daten beziehen sich auf die Summe der relativen Häufigkeit der Amplifikation für ein gegebenes Primerpaar in Abhängigkeit vom Referenzgen 16S rDNA, organisiert als Klassen von "Resistenz" oder "Rekombination". In der Legende sind für jede Genklasse die Länder, HAC oder LAC, mit einer signifikant höheren relativen Häufigkeit angegeben ( $p < 0,01$ , Mann-Whitney U-Test). Die Proben werden entsprechend der Probenahmeekampagne (C2, Frühjahr 2016; und C3, Herbst 2016), geteilt durch HAC und LAC, organisiert. Resistenzkategorien: AMG (Aminoglykoside), MDR (Multidrug-Resistenz), SUL (Sulfonamide), BL (Beta-Lactame), MLSB (Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B), TET (Tetracyclin), QUI (Chinolone), AMP (Amphenicole), VAN (Vancomycin) und andere (others) (Pärnänen *et al.*, 2019).

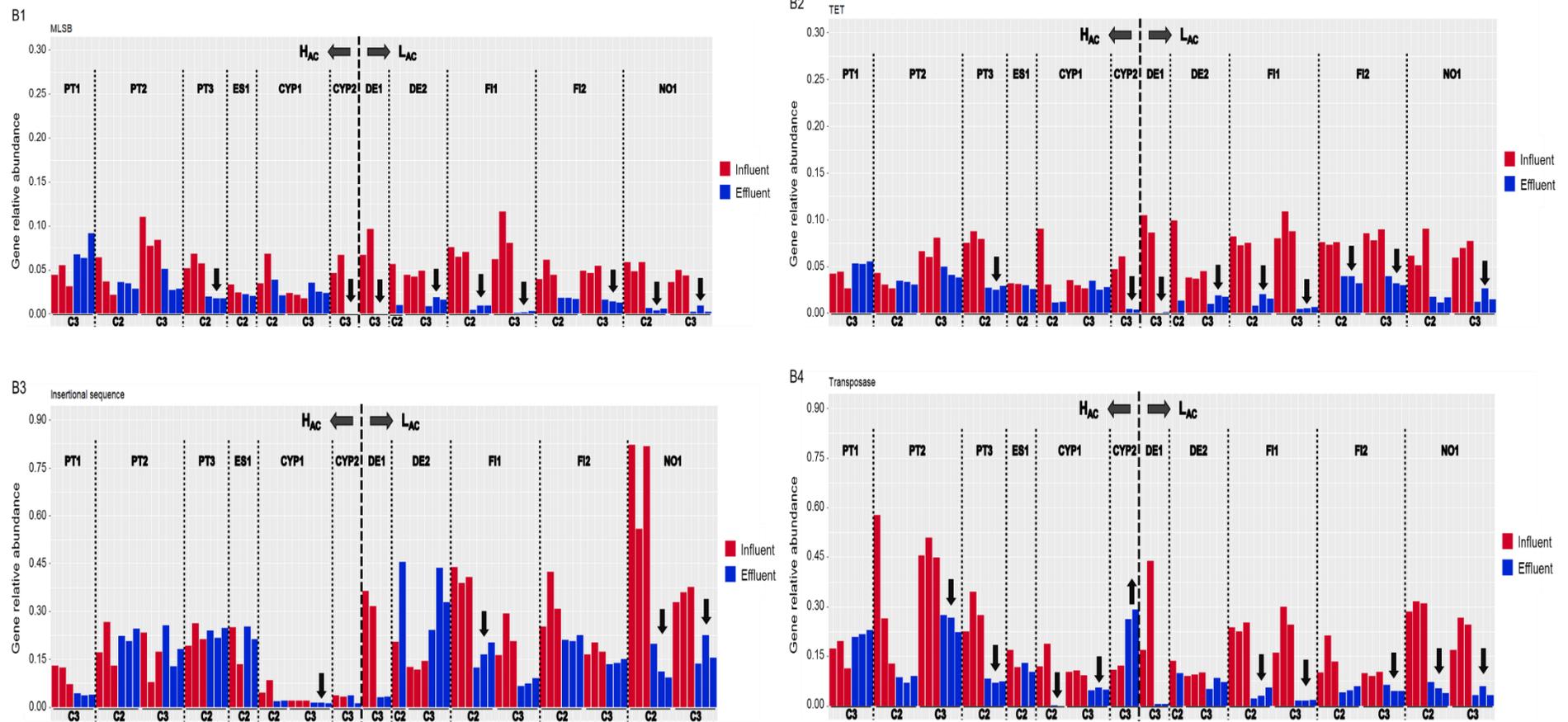


Abbildung 20: Vergleich der durchschnittlichen relativen Häufigkeit der ARGs im Zufluss und im Ablauf für die Klassen mit signifikant unterschiedlichen Werten in den HAC- und LAC-Proben: B1) MLSB, B2) Tetracycline, B3) Insertionssequenzen und B4) Transposase. Die Pfeile zeigen signifikante ( $p < 0,01$ ; Welch t-Test) Zunahmen (↑) oder Abnahmen (↓) nach der Behandlung an (C1, Herbst 2015; C2, Frühjahr 2016; und C3, Herbst 2016) (Pärnänen *et al.*, 2019).

Neben der umfassenden Studie zur Antibiotika-Resistenzlage in den Abwässern europäischer Kläranlagen konnte im Rahmen des StARE Projekts auch erste Studie auf internationaler Ebene zur Ermittlung des Vorkommens von Antibiotikarückständen in entsprechenden Abwässern im europäischen Raum generiert werden, um (i) einen Überblick über das Vorhandensein und die Konzentration von Antibiotika in den Abwässern von Kläranlagen in verschiedenen europäischen Ländern zu geben; (ii) geografische und zeitliche Trends bezüglich des Auftretens dieser Schadstoffe zu bewerten; (iii) Rückschlüsse auf das potenzielle Risiko für die Umwelt und die menschliche Gesundheit zu ziehen, die von Antibiotikarückständen in den geklärten Abwässern ausgeht; und (iv) robuste Analyseinstrumente und Indikatorverbindungen vorzuschlagen, die in regelmäßigen Wasserüberwachungsprogrammen verwendet werden können, wodurch der Vergleich von länderbezogenen Studien möglich wird. Diese Daten dienten auch in der Publikation von Pärnänen et al., (2019) um Korrelationen zwischen der in der Kläranlage vorherrschenden Antibiotika-Resistenzlage und den im Abwasser präsenten Antibiotikarückständen zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde der Kläranlagenablauf der 13 Kläranlagen in 7 europäischen Ländern (Portugal, Spanien, Irland, Zypern, Deutschland, Finnland und Norwegen) in den Jahren 2015 und 2016 jeweils am Anfang des Frühjahrs und Herbsts beprobt und auf 53 Antibiotikarückstände untersucht, die zu 10 verschiedenen therapeutischen Klassen gehörten. Gezielt wurden Antibiotika auf der Grundlage ihres weltweiten human- und veterinärmedizinischen Einsatzes ausgewählt (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2020).

So konnte auch in dieser Studie ein Nord-Süd-Gefälle in Bezug auf Antibiotikamengen, die in die Umwelt freigesetzt werden, festgestellt werden. Dabei konnten den Makroliden und Fluorchinolonen die höchsten Belastungen in allen Ländern zugeschrieben werden. So konnten Antibiotikakonzentrationen bei Fluorchinolonen beobachtet werden, die bei bis zu 1435,5 ng/ L Ciprofloxacin in Portugal und 613,0 ng/ L Ofloxacin in Zypern lagen. Die Makrolide Azithromycin und Clarithromycin konnten ebenfalls in allen Ländern detektiert werden. Ihre maximalen Konzentrationen von 1577,3 ng/ L bzw. 346,8 ng/ L konnten Kläranlagenabläufen aus Portugal zugewiesen werden. Im Allgemeinen konnten höhere Antibiotikaverbrauchsdaten mit höheren Gesamtantibiotikakonzentrationen, sowie niedrigere Antibiotikaverbrauchsdaten mit niedrigeren Gesamtantibiotikakonzentrationen in den Kläranlagen korreliert werden. Ausnahmen bildeten die Kläranlagen in Zypern. Die dortigen hohen Antibiotikaverbrauchsdaten gingen mit einer niedrigen Gesamtkonzentration im Ablauf der Kläranlagen einher (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2020).

Die Studie ermöglichte es in erster Linie, den aktuellen Wasserqualitätsstatus der kommunalen Abwässer in Europa zu definieren. Von den 53 untersuchten Antibiotika, wurden 17 in behandelten Abwässern nachgewiesen. Eine kontinuierliche Einleitung von

Antibiotikarückständen durch Kläranlagen in verschiedene aquatische Systeme könne Auswirkungen auf die Umwelt und möglicherweise auch Einfluss auf die Antibiotikaresistenzentwicklung nehmen. Der in dieser Studie berechnete Risikoquotient wies für 14 der 17 Antibiotika ein geringes Umweltrisiko auf. Es konnten jedoch drei Ausnahmen ermittelt werden. Diese erreichten einen Quotienten über 0,1, darunter das Cephalosporin Cefalexin, das Fluorchinolon Ciprofloxacin und das Makrolid Azithromycin (0,14, 0,90 bzw. 0,58). Ciprofloxacin, Azithromycin und Cefalexin konnten so als potentielle Marker der Antibiotikaverschmutzung identifiziert werden und könnten für eine zeitliche und geographische Charakterisierung von aquatischen Systemen und Kläranlagen dienen. Durch die reduzierte Anzahl von Substanzen wäre ein "intelligentes Monitoring" möglich. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch die Tatsache, dass Antibiotika in der aquatische Umwelt als Gemische, die entweder aus verschiedenen Verbindungen, die zu derselben Klasse von Antibiotika gehören und ähnlichen Wirkmechanismen haben, oder aus verschiedenen therapeutischen Gruppen bestehen können, die synergistische oder antagonistische Wirkungen haben könnten vorliegen (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2020).

Tabelle 13: Konzentrationen (ng/L) der 17 Antibiotika, die in den Proben aus den 13 Kläranlagen nachgewiesen wurden: Portugal (PT), Spanien (ES), Zypern (CYP), Irland (IL), Deutschland (DE), Finnland (FI) und Norwegen (NO). Die Konzentrationen (ng/L) werden als Mittelwert aus den 4 Probenahmekampagnen oder 3 Probenahmekampagnen im Falle von PT1 und 1 Probenahmekampagne im Falle von PT3 berechnet. < MDL zeigt Messwerte unterhalb des Detektionslimits an (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2020).

Chemical group	Antibiotic	PT1	PT2	PT3	ES1	CYP1	CYP2	IL1	IL2	DE1	DE2	FI1	FI2	NO1
Cephalosporins	Cefalexin	38.4	37.0	< MDL	65.2	66.3	65.0	66.4	87.6	< MDL	< MDL	203.3	308.0	60.7
Dihydrofolate reductase inhibitors	Trimethoprim	69.1	146.3	190.6	102.8	74.2	44.0	141.3	121.0	15.2	105.0	182.0	186.7	119.7
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	457.3	584.9	231.4	200.3	316.8	252.3	259.8	234.0	43.8	230.6	38.4	43.2	159.2
	Enrofloxacin	< MDL	< MDL	< MDL	69.4	< MDL								
	Ofloxacin	89.7	184.9	132.8	142.3	305.1	196.7	65.4	39.9	< MDL	66.5	20.0	22.8	27.1
	Orbifloxacin	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	6.7	6.5	< MDL						
Lincosamides	Clindamycin	8.5	86.6	31.5	101.4	6.5	27.8	42.5	59.1	< MDL	110.7	88.8	94.2	97.1
Macrolides	Azithromycin	361.8	597.5	178.9	299.5	48.0	45.2	266.7	260.8	126.2	290.4	129.3	130.7	149.7
	Clarithromycin	74.2	118.7	313.2	112.0	< MDL	11.9	204.4	189.4	76.5	123.4	4.5	4.8	20.8
Nitroimidazole antibiotics	Metronidazole	< MDL	< MDL	< MDL	76.1	19.6	< MDL	88.6	78.2	7.6	20.3	20.1	41.9	93.2
Penicillins	Ampicillin	< MDL	99.4	68.1	< MDL									
Quinolones	Nalidixic Acid	< MDL	50.3	25.3	< MDL									
	Oxolinic Acid	< MDL	5.3	< MDL										
	Pipemidic Acid	15.0	10.8	20.1	30.1	10.1	15.2	18.2	4.4	11.8	< MDL	4.8	3.2	7.5
Sulfonamides	Sulfamethoxazole	30.2	7.1	< MDL	123.4	13.3	68.5	53.0	44.0	22.9	34.9	< MDL	< MDL	48.6
	Sulfapyridine	84.5	4.7	48.8	63.9	8.7	48.7	95.5	93.6	22.7	112.0	89.2	98.8	184.0
Tetracyclines	Tetracycline	231.2	165.7	147.5	< MDL	36.9	24.5	141.0	194.2	< MDL	15.4	70.6	16.8	179.2

## 5. Diskussion

Da Kläranlagen als sogenannte „Hotspot“ für die Verbreitung von ARB und ARGs gelten, gilt diesen eine besondere Aufmerksamkeit, da diese, als zentrale Systeme, eine gute Möglichkeit der gerichteten Intervention und Kontrolle der Belastungssituation bieten. So können hier zielgerichtet Maßnahmen ergriffen werden, um eine Reduktion der Eintragung in die Umwelt zu erzielen (Michael *et al.*, 2013, Rizzo *et al.*, 2013, Alexander *et al.*, 2015, Berendonk *et al.*, 2015, Alexander *et al.*, 2016, Cytryn *et al.*, 2017, Hembach *et al.*, 2017, Jäger *et al.*, 2018a, Jäger *et al.*, 2018b). Einige ARB können durch konventionelle Abwasserbehandlungsverfahren entfernt werden (Guardabassi *et al.*, 2002, Da Costa *et al.*, 2006), aber es gibt immer noch eine große Anzahl, die im Abwasser überleben können (Pruden *et al.*, 2006, Hembach *et al.*, 2017, Jäger *et al.*, 2018b, Hembach *et al.*, 2019, Alexander *et al.*, 2020). In der Folge werden ARB und ARGs freigesetzt und in der Umwelt weiter verbreitet (Kim & Carlson, 2007, Czekalski *et al.*, 2012, Alexander *et al.*, 2015). Die Wissenschaft beschäftigt sich mit einer Vielzahl unterschiedlicher technischer innovativer und für die Implementierung geeigneter Verfahren zur Reinigung des Abwassers und der Entfernung von Spurenstoffen, als auch der Elimination von ARB und ARGs (Alexander *et al.*, 2016, Michael-Kordatou *et al.*, 2018, Hembach *et al.*, 2019, Jiménez *et al.*, 2019, Michael *et al.*, 2019, Alexander *et al.*, 2020). Hierbei kommen u.a. oxidative Verfahren zum Einsatz. Durch das breite Wirkungsspektrum des Ozonverfahrens gegenüber organischen Mikroverunreinigungen findet es sowohl im kleinen, als auch in voll ausgebautem technischen Maßstab in der Abwassertechnik Anwendung (Von Gunten, 2003, Broséus *et al.*, 2009). Dabei hängt die Wirkung des Ozons von vielen biotischen und abiotischen Faktoren ab (Okafor, 2011, Czekalski *et al.*, 2016). Dies könnte dazu führen, dass bei einer Ozonkonzentration von 1 g Ozon/ g DOC sub-letale Effekte auf die Bakterien einwirken könnten, bei denen Stressreaktionen oder auch die Selektion einzelner Bakterienspezies, was zu Populationsverschiebungen führt, induziert werden könnten (Alexander *et al.*, 2016, Jäger *et al.*, 2018a). Durch die Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/ g DOC konnten viele der untersuchten Parameter reduziert werden. Die gemessenen Reduktionsleistungen der absoluten Messungen lagen hier für fakultativ pathogene Bakterien zwischen 0,28 und 2,39 log-Stufen, die der ARGs zwischen 0,06 und 2,34 log-Stufen. Dies entspricht Reduktionsraten von teilweise über 99%. Manche Parameter sanken sogar unter die Nachweisgrenze. Jedoch konnte nicht für alle Untersuchungsparameter eine ausreichend hohe Reduktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den chemischen Mikroverunreinigungen, von denen diskutiert wird, dass sie bei der Ozonbehandlung um mindestens 80 % reduziert werden müssen, sollte die mikrobiologische Belastung um einen Prozentsatz von mind. 99 % reduziert

werden, um eine Wiederverkeimung zu vermeiden (Abegglen & Siegrist, 2012, National Blue Ribbon Commission for Onsite Non-Potable Water Systems, 2017). Ein Vorteil der Ozonbehandlung ist ihre Anwendbarkeit zur gleichzeitigen mikrobiologischen Reduktion, als auch zur Reduktion von Mikroverunreinigungen. Hier ist zu beachten, dass die Desinfektionswirkung von Ozon von der Ozonkonzentration, der Kontaktzeit und der Wasserqualität abhängt. Insbesondere gelöster organischer Kohlenstoff (DOC), Schwebstoffe und Partikel aus dem Belebtschlamm sollten bei der Ozonbehandlung berücksichtigt werden (Lazarova *et al.*, 2013, Czekalski *et al.*, 2016, Pak *et al.*, 2016). Die verwendete hydraulische Verweilzeit des Abwassers wurde hier mit vier Minuten angesetzt. Sowohl die Ozonkonzentration als auch die hydraulische Verweilzeit sind Parameter, die für eine allgemeine Effizienzsteigerung angepasst werden können. In diesem Zusammenhang sollten jedoch auf die Vermeidung der unerwünschten chemischen Nebenprodukte wie Bromid, die bei erhöhten Ozonkonzentrationen gebildet werden können, hingewiesen werden (Von Gunten & Hoigne, 1994, Von Gunten, 2003, Lee & von Gunten, 2010). Kombinatorische Verfahren wie eine biologische Filtration mit Sand oder Aktivkohle zur Entfernung von neu transformierten und unerwünschten Verbindungen, um die Verbreitung in die nachfolgenden Systeme nach der Ozonbehandlung zu verhindern, sind daher ratsam. Diese Filtersysteme bergen jedoch das Risiko des mikrobiellen Wiederverkeimens durch fakultativ pathogene Bakterien und so auch von ARGs (Alexander *et al.*, 2016, Hembach *et al.*, 2019). Bei Versuchen zum Wiederverkeimungspotential nach der Ozonbehandlung konnte sich *Pseudomonas* spp. in allen Experimenten als dominante Spezies durchsetzen (Jäger *et al.*, 2018a). Daher sollte die Ozonbehandlung so eingestellt werden, dass die Bakterienbelastungen in ausreichend hoher Effizienz reduziert wird. Sollte dies nicht der Fall sein, können die überlebenden Bakterien, die ggf. Träger verschiedener Resistenzen sind, über die Kläranlage in die Umwelt gelangen und dort zur Verbreitung dieser Resistenzen beitragen. Weitere mögliche Ursachen lassen sich hierfür in den Kläranlagen selbst finden, da diese Einfluss auf die im Abwasser vorhandenen Bakterien nehmen und die Population durch die Menge an organischem Material, der Durchflussrate aber auch der Temperatur beeinflussen (Novo *et al.*, 2013). Darüber hinaus können durch das Vorhandensein von Antibiotika im Abwasser selektive Prozesse bei den Bakterien ausgelöst werden. Die Antibiotika-Rückstände treten in unterschiedlichen Konzentrationen auf und könne so u.a. den horizontalen Gentransfer oder SOS-Antworten bei Bakterien auslösen (Kohanski *et al.*, 2010, Tello *et al.*, 2012, Novo *et al.*, 2013, Rizzo *et al.*, 2014, Alexander *et al.*, 2016, Sharma *et al.*, 2016). Diese Effekte könnten auch in der Umwelt auftreten, sofern auch hier, je nach Eintragsgebiet, entsprechend hohe Antibiotika-Konzentrationen auftreten. Generell ist davon auszugehen, dass Gebiete, die durch Kläranlagenausläufe, landwirtschaftlich genutzte

Flächen, Klinikeinflüsse oder pharmazeutische Industrie beeinflusst werden höher belastet sein können (Andersson & Hughes, 2012).

Im Fall der Kombination von UV- und Ozonbehandlung führte diese, unter den gegebenen Bedingungen, nicht zu einer effektiveren Reduktion im Vergleich zur alleinigen Ozonbehandlung. Ursachen hierfür könnten sein, dass nach der Ozonbehandlung möglicherweise noch Verunreinigungen oder Partikel vorhanden waren, so dass das UV-Licht das mit Ozon behandelte Abwasser nicht ausreichend durchdringen konnte. Bei weiteren kombinatorischen Aufbereitungsschritten (z.B. nach der Partikelentfernung durch vorgeschaltete Filtrationsschritte) könnte die UV-Behandlung eine geeignete Methode sein, um die Restkontaminationen zu beseitigen. Folglich sollten Verfahrenskombinationen, sowie Optimierungen der Ozonbehandlung, die eine erhöhte Eliminationsrate von fakultativ pathogenen Bakterien und ARG erreichen können, für den Einsatz in Kläranlagen in Betracht gezogen werden. Wie bereits erwähnt, könnten Ozonkontaktzeiten mit einer angepassten hydraulischen Verweilzeit in der Ozonanlage ein möglicher Weg sein, um die Eliminationsraten weiter zu erhöhen. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass die Ozonbehandlung auf der Produktion von Radikalen basiert. Daher könnte Ozon oxidative Stressreaktionen in den überlebenden Abwasserpopulationen induzieren. Es ist bekannt, dass die Wirkung von Ozon in Abwässern von vielen biotischen und abiotischen Faktoren wie Bakteriendichte, chemischer Belastung und auch der Schwebstoffkonzentration abhängt. Dies impliziert, dass subletale Effekte auf Bakterien auftreten könnten, die Stressreaktionen, Populationsverschiebungen und bakterielle Selektionsprozesse fördern. Dwyer et al., (2009) beschrieb die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die den Stoffwechsel von Bakterien beeinflussen. Die ausgelöste SOS-Reaktion trug zur Resistenzentwicklung bei, was die erhöhte Robustheit der betroffenen Bakterien gegenüber ROS erklären könnte. Jedoch könnten auch weitere anti-oxidative Mechanismen in den verschiedenen Spezies zu einer unterschiedlichen Dynamik in der Reduktionseffizienz der oxidativen Behandlungen führen (Dwyer *et al.*, 2009, Alexander *et al.*, 2016). Die Effizienz der verschiedenen erweiterten Behandlungsverfahren könnte auch von den Mikroorganismen abhängen, die die entsprechenden Antibiotika-Resistenzgene tragen. Das Vorkommen der Gene ist nicht auf ein bestimmtes Bakterium beschränkt, sondern kann auch auf andere, bisher nicht charakterisierte Bakterien aus der Abwasserpopulation übertragen werden. Die meisten der analysierten ARGs befinden sich auf mobilen genetischen Elementen, die für den horizontalen Gentransfer (HGT) beschrieben sind.

Darüber hinaus können die erweiterten Verfahrenstechniken das Auftreten von DNA-Läsionen wie CPDs und 6-4 PPs, die z.B. während der UV-Behandlung induziert wurden, sowie durch Ozonierung induzierte DNA-Läsionen spezifische DNA-Reparaturmechanismen, wie *recA*-Aktivitäten hochregulieren, die bekanntermaßen den horizontalen Gentransfer, aber auch die

Mutationsraten erhöhen (Jungfer *et al.*, 2007, Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013, Jäger *et al.*, 2018b). Beide tragen so zur Weitergabe und Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen, und somit zum Risikopotential in der aquatischen Umwelt bei (Fall *et al.*, 2007, Aminov, 2011, Chao *et al.*, 2013). Weitere innovative Behandlungsmöglichkeiten stehen zur Verfügung, wie die Ultrafiltration, die die bakterielle Belastung in Kläranlagen reduzieren können, die jedoch auch andere Risikopotentiale aufweisen, wie die Anreicherung von ARB und ARGs im Retentat (Hembach *et al.*, 2019). Weitere innovative Verfahrenstechniken, basierend auf der Solar-Fenton-Reaktion oder auch UV in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stehen auch im Fokus der Forschung (Karaolia *et al.*, 2018, Michael *et al.*, 2019, Beretsou *et al.*, 2020). Je nach Art der Technologie besteht die Möglichkeit, dass diese nicht in der Lage sind gleichzeitig andere Mikroverunreinigungen zu reduzieren. Eine Kombination verschiedener Methoden könnte zu einer angemessenen Reduktion aller Arten von Verschmutzung führen. Daher ist es notwendig, neben den bereits vorhandenen Richtlinien für die Entfernung von chemischen Schadstoffen in Kläranlagen entsprechende Strategien und Richtlinien zu entwickeln, die an die Entfernung von mikrobiellen Schadstoffen im Abwasser angepasst sind, einschließlich fakultativ pathogener Bakterien und ARGs.

Neben den beschriebenen Technologien existieren noch weitere innovative Verfahrenstechniken, die ein hohes Potential zur Abwasserreinigung aufzeigen. In einer Publikation von Michael *et al.*, (2019) wurden am Nireas-International Water Research Center der Universität Zypern, in Kooperation mit dem KIT-IFG (Abteilung Mikrobiologie/Molekularbiologie), die Effekte der Solar-Fenton-Reaktion auf Abwasser mit anschließender Reinigung mittels granulierter Aktivkohle auf dessen toxikologischen Wirkungen, sowie die Auswirkungen auf die Mikrobiologie in Abwasserproben untersucht. Als Ausgangsprobenmaterial dienten Belebtschlamm- und Membranbioreaktorproben. Die Analysen zeigten, dass eine vollständige Degradation der Antibiotika durch die Solar-Fenton-Reaktion in beiden Testsystemen herbeigeführt werden konnte. Des Weiteren konnte eine komplette Desinfektion nach einer 60-minütigen Behandlung erreicht werden. Darüber hinaus zeigten Kultivierungsexperimente, dass die Bakterien nach 24 Stunden Inkubation nicht mehr in der Lage waren, sich zu vermehren, was auf eine deutliche Schädigung der Zellen durch die Solar-Fenton-Reaktion hindeutet. So konnte beispielsweise eine Reduktion der gemessenen 16S *rDNA* im Membranbioreaktor (MBR) Ablauf um 6,55 log-Stufen, im Ablauf des Belebtschlammes um 6,23 log-Stufen erzielt werden. Des Weiteren konnten auch die ARGs unterhalb des Detektionslimits reduziert werden, mit Ausnahme des Gens *bla*<sub>TEM</sub> (Michael *et al.*, 2019). Jedoch führte die Solar-Fenton-Reaktion zu einer gesteigerten Toxizität, was auf die Bildung von toxischen Reaktionsprodukten zurückzuführen ist. Durch die anschließende Behandlung mit granulierter Aktivkohle konnte zum einen eine vollständige Elimination von Antibiotika und deren Rückständen erzielt werden, zum anderen war durch die Aktivkohle eine

Reduktion der Toxizität nach der Solar-Fenton-Behandlung möglich. Vorteile der Solar-Fenton-Reaktion sind u.a. die geringen Kosten durch die Nutzung der Solarenergie. Die Kopplung der granulierten Aktivkohle nach der Solar-Fenton-Reaktion wurde von den Autoren als sinnvoll erachtet, da nach der biologischen Reinigung Einflussfaktoren wie die Effizienz und Lebensdauer der Aktivkohle vom Abwasser abhängt, sowie vom Aktivkohle Typ und der Kontaktzeit und daher sei es wirtschaftlich sinnvoller eine zwischengeschaltete Reinigungsstufe zu verwenden (Karaolia *et al.*, 2018, Michael *et al.*, 2019).

Eine weitere Alternative konnten Experimente zur chemischen, mikro- und molekularbiologischen, als auch ökotoxikologischen Untersuchung von UV-C in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die Abwasserbehandlung aufzeigen, die am Nireas-International Water Research Center der Universität Zypern, in Kooperation mit dem KIT-IFG (Abteilung Mikrobiologie/Molekularbiologie) durchgeführt wurden. Bei einem inhärenten pH-Wert, 40 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und einer UV Bestrahlungsdauer von 120 Minuten (6,03 mW/cm<sup>2</sup>) konnte eine komplette Degradation der untersuchten Antibiotika festgestellt werden. Mikrobiologische Analysen zeigten nach 10-minütiger Behandlung eine Inaktivierung der Bakterien und auch eine Wiederverkeimung konnte nach 24 Stunden nicht festgestellt werden. Auch molekularbiologische Untersuchungen zeigten nach 15-minütiger Behandlung einen kompletten Rückgang der untersuchten Resistenzgene, mit Ausnahme des *16S rDNA* Gens und des Sulfonamid-Resistenzgens (*sul1*), welche beide nach einer drei stündigen Behandlung noch nachweisbar waren. Eine vollständige Elimination könnte zum einen durch eine Verlängerung der Behandlungszeit, oder aber über eine Erhöhung der UV-Dosis erreicht werden (Beretsou *et al.*, 2020).

Neben der Eliminationsleistung, dargestellt durch die absoluten Abundanzen, ist jedoch auch das Sichtbarmachen von selektiven Prozessen durch die erweiterten Technologien von großer Wichtigkeit (Jäger *et al.*, 2018a, Jäger *et al.*, 2018b). Um Einblicke in die Veränderungen der untersuchten Gene innerhalb der Population zu erhalten, kann eine Normierung auf eine definierte DNA Menge vorgenommen werden. Da bei molekularbiologischen Untersuchungen auch Fragemente von abgetöteten Bakterien oder freier DNA detektiert werden könnten, sollte zusätzlich eine Lebend/ Tot-Diskriminierung durchgeführt werden. Die Wirkung von PMA tritt besonders nach desinfizierenden Maßnahmen, wie z.B. der Ozonbehandlung auf. Auch hier wurde mittels einer PMA Behandlung eine Differenzierung zwischen der gesamten (lebend und toten Bakterien) Population und ausschließlich des lebenden Anteils innerhalb der Population vorgenommen. So wiesen die hier generierten Daten darauf hin, dass es zu einem Selektionsprozess während des oxidativen Reinigungsprozesses, der Ozonung, kam (Jäger *et al.*, 2018a). Nach der Ozonung blieben die relativen Häufigkeiten oftmals auf einem konstanten Niveau oder nahmen zu. Dies könnte zum einen dadurch zu erklären sein, dass

ein Großteil der vorhandenen nicht resistenten Bakterien durch die Ozonbehandlung abgetötet wurde und der überlebende Teil vermehrt Resistenzgene trägt, wodurch der Anteil der Resistenzgene innerhalb der Bezugsgröße, den normierten 100 ng DNA, zunahm. Die vergleichbaren Messwerte für das *P. aeruginosa* spezifische Markergen *ecfX* nach der Ozonbehandlung sprechen für eine Toleranz von *P. aeruginosa* gegenüber dieser Art von Behandlungstechnik. Der Grund hierfür könnte der hohe GC-Gehalt im *P. aeruginosa* Genom sein und die unterschiedlichen Schutzmechanismen, die das Bakterium u.a. auch gegen oxidativen Stress schützen (Alexander *et al.*, 2016, Jäger *et al.*, 2018a). Des Weiteren geben die Ergebnisse Hinweise auf eine mögliche Selektion von Bakterienspezies und spezifischen Resistenzgenen durch die Ozonung, indem diese u.U. einen Überlebensvorteil bringen. Auch die Populationsanalysen mittels Illumina Sequenzierung bestätigen diese Ergebnisse. Erst nach der Ozonung sind Populationsveränderungen im Vergleich zur Populationszusammensetzung im Ablauf des Nachklärbeckens, durch den Yue-Clayton-Index, festzustellen. Des Weiteren konnte kein Effekt durch eine PMA Behandlung im NKB gemessen werden. Dies spricht zum einen für eine konstante Populationszusammensetzung im NKB, zum anderen handelt es sich bei der Verfahrenstechnik um keine Bakterien abtötende Maßnahme, wodurch eine PMA Behandlung hier kaum Effekte erzielen kann. Nach der Ozonbehandlung tritt der Effekt einer PMA-Behandlung deutlicher hervor. Der Yue-Clayton-Index zwischen der PMA behandelten und nicht PMA behandelten Probe weist auf eine Verschiebung der Population hin. Dies liegt zum einen an der Entfernung der freien DNA toter Bakterien, zum anderen an der Selektion einzelner Bakterienspezies oder Trägern von Resistenzgenen durch die Ozonbehandlung. Wie zuvor schon beschrieben, konnte auch mit dieser Untersuchungsmethode Pseudomonaden nach der Ozonbehandlung nachgewiesen werden (Jäger *et al.*, 2018a). Dies legt nahe, dass ein Großteil der Pseudomonaden zur lebenden Fraktion gehörte. Dies ist insbesondere im Fall des Wiederverkeimungspotential der unterschiedlichen Bakterien von großer Bedeutung.

In den Experimenten zur Analyse des Wiederverkeimungspotentials zeigte sich im Ablauf des NKB *Limnohabitans* nach 72 stündiger Inkubation als dominante Spezies. Es wird berichtet, dass *Limnohabitans* aufgrund seines großen Genoms und seines Zellvolumens, in Kombination mit seiner hohen Substrataufnahme und Wachstumsrate, sehr gut auf veränderte Bedingungen reagiert. Daher kann seine Dominanz in der Probe des Ablaufs des NKBs und dessen Wiederverkeimungspotential hier auf seinen sogenannten metabolischen IQ zurückgeführt werden (Hollender *et al.*, 2009). Nach der Ozonung konnte sich *Pseudomonas* als dominante Spezies in der Abwasserprobe etablieren. Dies deutet erneut auf eine Toleranz der Pseudomonaden gegenüber der Ozonbehandlung hin. Durch die starke Reduktion der anderen Bakterien nach der Ozonung und die kurze Regenerationszeit durch die verschiedenen Reparaturmechanismen der Pseudomonaden, könnte es ihnen ermöglicht

haben, sich zu regenerieren und anschließend zu proliferieren, wodurch diese nach der 72-stündigen Inkubation in der Populationsanalyse einen Anteil von 71 % ausmachten. Auch in den weiteren molekularbiologischen Untersuchungsmethoden (qPCR) zeigte sich eine solche Tendenz für die Dominanz der Pseudomonaden. Im Fall der qPCR-Experimente erwies sich die Ozonung als sehr effektiv gegenüber Enterokokken. Diese wurden stark reduziert und waren nicht mehr in der Lage, nach einer 72-stündigen Inkubation entstandene Zellschäden zu reparieren und sich zu vermehren. Auch *E. coli* konnte eine deutliche nachhaltige Reduktion erfahren. Dies könnte einhergehen mit der Zunahme des Anteils an resistenten Bakterien nach der Ozonung, welche als Resistenzträger einen Überlebensvorteil gegenüber den sensitiven Bakterien haben könnten, gerade wenn noch vorhandene Antibiotikarückstände eine selektive Wirkung zeigen (Jäger *et al.*, 2018a).

Generell müssen weitere Daten für die verschiedenen erweiterten Technologien gesammelt und die Techniken weiter optimiert werden, um eine ausreichende Hygienisierung des Abwassers zu erreichen und so das Risikopotential für Mensch und Umwelt zu minimieren. Je nach Art der erweiterten Verfahrenstechnik, sind diese möglicherweise nicht in der Lage, neben der bakteriellen Belastung auch andere Mikroverunreinigungen zu reduzieren. Daher könnte eine Kombination verschiedener Methoden zu einer angemessenen Reduzierung aller Arten von Verschmutzung führen. Daher ist es notwendig, neben den bereits verfügbaren Richtlinien für die Entfernung chemischer Schadstoffe in Kläranlagen zusätzliche oder angepasste Strategien und Richtlinien zu entwickeln, die an die Entfernung mikrobieller Kontaminationen im Abwasser angepasst sind, einschließlich fakultativ pathogener Bakterien und ARGs.

Ein umfassender molekularbiologischer Ansatz zur Überwachung der Resistenzsituation in der EU konnte in der Publikation von Pärnänen *et al.*, (2019) gezeigt werden. Hier wurde ein qPCR-Array verwendet, der 229 Resistenzgene und 25 MGE umfasste. Diese erste EU-weite Studie konnte anhand der relativen Häufigkeiten der Resistenzgene ein Nord-Süd-Gefälle bei der Antibiotikaresistenzverteilung feststellen. Zusammengefasst lag die Belastungen des geklärten Abwassers der südeuropäischen Länder höher als die der nordeuropäischen Länder, wodurch davon auszugehen ist, dass in den südeuropäischen Ländern der Einfluss auf die Umwelt stärker ist als in den Ländern Nordeuropas (Pärnänen *et al.*, 2019). Diese Beobachtung könnte u.U. mit der Dynamik der ARG-Träger während der Behandlung zusammenhängen (Yang *et al.*, 2014, European Centre for Disease Prevention and Control, 2018, Narciso-da-Rocha *et al.*, 2018), die von den Betriebsbedingungen (z.B. Temperatur) und der Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflusst wird. Alternativ kann dies auch eine Folge der Unterschiede der Kläranlagengröße und des Ausbaus in Nord- und Südeuropa sein, die im Schnitt in den nördlicheren Ländern größer sind als in den südeuropäischen Ländern. Der

potentielle Einfluss von Selektionsdrücken, insbesondere von Antibiotika-Rückständen, während der Abwasserbehandlung wurde in verschiedenen Studien gezeigt, wodurch die Antibiotika-Resistenzlage beeinflusst wird (Gao *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2015, Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2015, Bengtsson-Palme *et al.*, 2016). Die Analysen von mehr als 50 Antibiotika-Rückständen in den gleichen Abwasserproben, die in diesen Studien verwendet wurden, zeigten jedoch keine Korrelation mit der relativen Häufigkeit der ARGs (Pärnänen *et al.*, 2019, Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2020).

Neben der nicht vorhandenen Korrelation zwischen den Antibiotika-Rückständen in den Kläranlagen und den dort detektierten Resistenzen konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen der relativen Häufigkeit von ARGs im finalen Ablauf und Informationen über den Antibiotika-Verbrauch im Primärversorgungssektor der verschiedenen Länder festgestellt werden (Pärnänen *et al.*, 2019). Eine weitere Studie, bei der der Schwerpunkt auf die Antibiotika-Konzentration im aufnehmenden Gewässer gelegt wurde, zeigte, dass die Konzentrationen von Antibiotika in Kläranlagen beeinflussten Systemen i.d.R. im niedrigen bis mittleren ng/ L Bereich liegen, bei denen von keinem selektiven Effekt auszugehen ist, weswegen die Aufmerksamkeit auf die absoluten Mengen von ARB und ARGs, die in die Flusssysteme eingeleitet werden, gelegt werden sollte (Brown *et al.*, 2019, Brown *et al.*, 2020). Denn laut den Autoren wirken sich Antibiotika in Konzentrationen, wie sie in der Umwelt vorkommen, nicht auf die Häufigkeiten der Resistenzen aus und eine weitere Reduktion der Antibiotika-Konzentrationen hat keinen Effekt auf die Ausbreitung der ARGs. Es scheint, dass die partikuläre Fracht von Kläranlagen eine entscheidendere Rolle bei der Verbreitung von ARGs im Sediment spielt, da sich diese sofort absetzen und so zu einem messbaren Anstieg im Sediment führen. Die Autoren empfehlen daher die Implementierung von Membrantechnologien, um die partikuläre Fracht aus Kläranlagen zu minimieren (Brown *et al.*, 2019, Brown *et al.*, 2020). Die Entwicklung und Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen ist ein komplexer Prozess, der aus dem Zusammenspiel verschiedener und oft ganz unterschiedlicher Variablen resultiert. Die untersuchten europäischen Länder unterscheiden sich in der Menge des Antibiotika-Einsatzes beim Menschen, aber auch in anderen, nicht vernachlässigbaren Faktoren wie Temperatur, Niederschlag oder Antibiotika-Einsatz bei Haustieren und in der Tierhaltung. So können die in der Viehzucht verwendeten Antibiotika teilweise auch durch das Ausbringen von Gülle zu einem Gesamtanstieg der Antibiotika- oder Antibiotikaresistenzbelastung in dieser Region beitragen. Die relative Häufigkeit mehrerer ARGs konnte jedoch signifikant mit der Prävalenz phänotypischer Resistenzen klinischer Isolate von *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* oder *S. aureus* korreliert werden, welche ein ubiquitäres Vorkommen aufweisen. Ubiquität und Umweltfitness können Schlüsselbegriffe sein, wenn es um die Diskussion von Antibiotika-Resistenzen in der Umwelt geht (Pärnänen *et al.*, 2019). Diese ubiquitären Bakterien, die sowohl im menschlichen Körper als auch im

Abwasser wachsen können, haben optimale Wachstumstemperaturen über 30°C (*E. coli*, 37°C; *K. pneumoniae*, 30° bis 35°C; *P. aeruginosa*, 37°C; und *Acinetobacter spp.*, 33° bis 35°C) (Garrity, 2005). Daher ist es nicht überraschend, dass diese Bakterien in Regionen mit wärmeren Temperaturen in der Umwelt besser überleben. MacFadden et al., (2018) haben in einer durchgeführten Studie gezeigt, dass ein Anstieg von 10°C über die Regionen hinweg mit einem höheren Prozentsatz an Antibiotika-Resistenz von 4,2% für *E. coli*, 2,2% für *K. pneumoniae* und 2,7% für *S. aureus* zusammenfiel (MacFadden et al., 2018). Zusammen mit dem Einsatz von Antibiotika kann die Temperatur somit ein wichtiger Faktor für die Persistenz und Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in der Umwelt sein. Die Ergebnisse verstärken nicht nur die starke Beziehung zwischen klinischer und ökologischer Antibiotika-Resistenz, sondern signalisieren auch die Bedeutung der Berücksichtigung gesellschaftlicher und klimatischer Faktoren (z.B. Temperatur oder Niederschlag) bei der Entwicklung möglicher Strategien zur Kontrolle der Antibiotika-Resistenz. Die Bedeutung der Überwachung zur Verbesserung der Antibiotika-Resistenzkontrolle wird immer wieder deutlich. Diese Form der Antibiotika-Resistenz-Überwachung wird auch u.a. von der WHO postuliert (World Health Organization, 2014, World Health Organization, 2018). Darüber hinaus sind die Autoren dieser Studie zu dem Schluss gekommen, dass die Verwendung traditioneller fäkaler Indikatoren möglicherweise nur begrenzt in der Lage sind, zuverlässige Vergleiche des Antibiotika-Resistenzstatus in Abwässern zu liefern. Obwohl kulturabhängige Methoden nach wie vor ihren Platz in der Überwachung der Wasserqualität haben, fehlt ihnen möglicherweise die nötige Sensibilität für Vergleichszwecke. So konnten in der Studie potentielle Indikatorgene für eine einfach Erfassung der Resistenzlage und deren Entwicklung identifiziert werden. In der Publikation von Pärnänen et al., (2019) konnten sich u.a. Gene, die Resistenzen gegen die erste Generation von Antibiotika vermitteln oder mit MGEs assoziiert sind als potentielle Indikatoren herausstellen, darunter auch Elemente, die mit Integrons der Klasse 1 assoziiert sind, welche schon zuvor als anthropogene Marker der Antibiotika-Evolution beschrieben wurden (Gillings, 2017). Diese, unter Verwendung harmonisierter Protokolle, unterstützt durch Hochdurchsatzdaten, können routinemäßig für die weltweite Überwachung von Antibiotika-Resistenzen im Abwasser eingesetzt werden.

Neben dem internationalen Vergleich wurde ein weiterer Schwerpunkt auf den regionalen Einfluss von Kläranlagen in unterschiedlichen Siedlungsgebieten und die dortigen Oberflächengewässern gelegt. Bei der Betrachtung der Untersuchungsergebnisse auf regionaler Ebene konnte festgestellt werden, dass Antibiotika-Resistenzgene und fakultativ pathogene Bakterien in Oberflächengewässern nachweisbar waren und, dass die Art des Oberflächengewässers, Einfluss auf die gemessenen Abundanzen haben. Ebenso konnten die seltenen und als besonders kritisch einzustufenden Resistenzgene, sowohl im urbanen, als auch im ländlichen Untersuchungsgebiet an den verschiedenen Probenahmestellen in

unterschiedlichen Häufigkeiten bereits nachgewiesen werden. Im ländlich geprägten Raum fielen die gemessenen Abundanzen geringer aus und auch die Anzahl der detektierten Gene war hier geringer. Jedoch wurde unabhängig der Siedlungsgebiete der Einfluss der Kläranlage auf das aufnehmende Gewässer deutlich. So konnte eine geringere Belastung oberhalb der Einleitungsstelle der Kläranlage und eine Zunahme der Belastung unterhalb der Einleitungsstelle der Kläranlage beobachtet werden. Diese unterschiedlichen hohen Belastungssituationen in den Kläranlagenaufläufen spiegeln sich in dem aufnehmenden Gewässer wieder. Diese Beobachtung konnte auch in anderen Studien gemacht werden. So konnte in einer Studie durch die Zugabe von Abwasserpartikeln ein plötzlicher und starker Anstieg der ARGs in der Wasserphase (3-5 log-Stufen) und im Sediment (1-4 log-Stufen) festgestellt werden. Der Anstieg der Abundanzen der ARGs im Fluss ist das Ergebnis des kontinuierlichen Eintrags von ARGs durch Kläranlagen und aus Regenüberlaufbecken. Jedoch scheinen die ARGs nicht persistent im Fluss zu sein, sobald der Eintrag gestoppt wird (Brown *et al.*, 2019). Neben ARGs können sich auch ARB innerhalb der partikulären Fraktion des Kläranlagenablaufs befinden, welche im Flussbett durch Sedimentation verbleiben. Durch das Wachstumspotential der Bakterien kann es in den betroffenen Systemen zur Kolonisierung der Gewässer durch ARB kommen, weswegen desinfizierende Verfahrenstechniken in der Abwasserbehandlung wichtig sind (Brown *et al.*, 2019, Brown *et al.*, 2020).

Des Weiteren konnten auch Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten Kläranlagen festgestellt werden. Die untersuchte Kläranlage im urbanen Raum wies eine stärkere Belastungssituation auf als die Kläranlage, die in einer ländlichen Gegend liegt. Diese unterschiedlichen hohen Belastungssituationen in den Kläranlagenabläufen spiegeln sich dann auch in dem aufnehmenden Gewässer wider. Auch im Vergleich der Fließgewässer zeigte sich, dass die Grundbelastung im ländlichen Raum im Vergleich zum urban geprägten Siedlungsgebiet geringer ist. So ist die Erfassung und Bewertung von unterschiedlichen Dynamiken der mikrobiologischen Belastungssituationen von Oberflächengewässern mit den verwendeten Methoden und den gewählten Parametern möglich, ebenso wie die Erfassung der unterschiedlichen, Kläranlagen-abhängigen Einflüsse auf das aufnehmende Gewässer. Die zusätzlichen Multiresistenz-Untersuchungen vervollständigen das Bild und weisen auf eine schon häufigere Verbreitung von 3 MRGN und vereinzelt auch 4 MRGN in den analysierten Wassersystemen hin. Wie Müller *et al.*, (2019) in ihrer Studie zeigen konnten, stammen diese mehrfach resistenten Keime mit hoher Wahrscheinlichkeit aus Krankenhäusern und gelangen über die Kläranlagen in die Umwelt. Dennoch ist der Einfluss der Landwirtschaft durch das Ausbringen von Gülle nicht zu unterschätzen, da durch Abschwemmungen auch so die Gefahr des Eintrags von resistenten Bakterien in die aquatische Umwelt besteht. Daher ist Handlungsbedarf an den betreffenden Kläranlagen erforderlich, sowie ein verantwortungsbewusster Umgang mit Antibiotika in den unterschiedlichen Bereichen.

## 6. Literaturverzeichnis

Abegglen C & Siegrist H (2012) Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser. Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen. Bundesamt für Umwelt, Bern. *Umwelt-Wissen* **1214**: 210.

Albertsen M, Hugenholtz P, Skarshewski A, Nielsen KL, Tyson GW & Nielsen PH (2013) Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat Biotech* **31**: 533-538.

Alexander J, Hembach N & Schwartz T (2020) evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. *Scientific Reports* **10**: 1-9.

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**: 316-325.

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 Environment* **559**: 103-112.

Aminov RI (2011) Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in microbiology* **2**.

Andersson DI & Hughes D (2012) Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug resistance updates* **15**: 162-172.

Aronesty E (2011) ea-utils: Command-line tools for processing biological sequencing data. *Expression Analysis, Durham, NC*.

Bae S & Wuertz S (2009) Rapid decay of host-specific fecal Bacteroidales cells in seawater as measured by quantitative PCR with propidium monoazide. *Water Res* **43**: 4850-4859.

Barraud O, Baclet M-C, Denis F & Ploy M-C (2010) Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **65**: 1642-1645.

Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H & Pringle M (2014) A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC infectious diseases* **14**: 13.

Bengtsson-Palme J, Hammaren R, Pal C, Östman M, Björleinius B, Flach C-F, Fick J, Kristiansson E, Tysklind M & Larsson DJ (2016) Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. *Sci Total Environ* **572**: 697-712.

Berditsch M, Jäger T, Stempel N, Schwartz T, Overhage J & Ulrich AS (2015) Synergistic effect of membrane-active peptides polymyxin B and gramicidin S on multidrug-resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **59**: 5288-5296.

Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, Bürgmann H, Sørum H, Norström M & Pons M-N (2015) Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology* **13**: 310.

Beretsou VG, Michael-Kordatou I, Michael C, Santoro D, El-Halwagy M, Jäger T, Besselink H, Schwartz T & Fatta-Kassinos D (2020) A chemical, microbiological and (eco)toxicological scheme to understand the efficiency of UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation on antibiotic-related microcontaminants in treated urban wastewater. *Science of The Total Environment* 140835.

Biswal BK, 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**: 245-253.

Brede DA, Snipen LG, Ussery DW, Nederbragt AJ & Nes IF (2011) Complete genome sequence of the commensal *Enterococcus faecalis* 62, isolated from a healthy Norwegian infant. *Journal of bacteriology* **193**: 2377-2378.

Broséus R, Vincent S, Aboufadel K, Daneshvar A, Sauvé S, Barbeau B & Prévost M (2009) Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. *Water Res* **43**: 4707-4717.

Brown PC, Borowska E, Schwartz T & Horn H (2019) Impact of the particulate matter from wastewater discharge on the abundance of antibiotic resistance genes and facultative pathogenic bacteria in downstream river sediments. *Sci Total Environ* **649**: 1171-1178.

Brown PC, Borowska E, Peschke R, Schwartz T & Horn H (2020) Decay of elevated antibiotic resistance genes in natural river sediments after sedimentation of wastewater particles. *Sci Total Environ* **705**: 135861.

Cataldo F (2006) DNA degradation with ozone. *International journal of biological macromolecules* **38**: 248-254.

Chao Y, Ma L, Yang Y, Ju F, Zhang X-X, Wu W-M & Zhang T (2013) Metagenomic analysis reveals significant changes of microbial compositions and protective functions during drinking water treatment. *Scientific reports* **3**: 3550.

Chen H & Zhang M (2013) Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China. *Environment International* **55**: 9-14.

Chen YC, Liu T, Yu CH, Chiang TY & Hwang CC (2013) Effects of GC bias in next-generation-sequencing data on de novo genome assembly. *PloS one* **8**: e62856.

Chen Z, Chang D, Zou Y, *et al.* (2012) Genome sequence of *Enterococcus faecium* clinical isolate LCT-EF128. *Journal of bacteriology* **194**: 4765.

Clatworthy AE, Pierson E & Hung DT (2007) Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology* **3**: 541-548.

Clifford RJ, Milillo M, Prestwood J, Quintero R, Zurawski DV, Kwak YI, Waterman PE, Lesho EP & Mc Gann P (2012) Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PloS one* **7**: e48558.

Craggs RJ, McAuley PJ & Smith VJ (1997) Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. *Water research* **31**: 1701-1707.

Cytryn E, Markiewicz Z & Popowska M (2017) Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes Dissemination in Soils. *Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils: Monitoring, Toxicity, Risk Assessment and Management*, (Hashmi MZ, Strezov V & Varma A, eds.), pp. 151-190. Springer International Publishing, Cham.

Czekalski N, Berthold T, Caucci S, Egli A & Bürgmann H (2012) Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in microbiology*.

Czekalski N, Imminger S, Salhi E, Veljkovic M, Kleffel K, Drissner D, Hammes F, Burgmann H & Von Gunten U (2016) Inactivation of antibiotic resistant bacteria and resistance genes by ozone: from laboratory experiments to full-scale wastewater treatment. *Environ Sci Technol* **50**: 11862-11871.

Da Costa PM, Vaz-Pires P & Bernardo F (2006) Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water research* **40**: 1735-1740.

Depardieu F, Perichon B & Courvalin P (2004) Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **42**: 5857-5860.

Dodd MC (2012) Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *Journal of Environmental Monitoring* **14**: 1754-1771.

Dourado M, Franco M, Peters L, Martins P, Souza L, Piotto F & Azevedo RAd (2015) Antioxidant enzymes activities of *Burkholderia* spp. strains—oxidative responses to Ni toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**: 19922-19932.

DVGW W (1997) 294. *UV-Desinfektionsanlagen für die Trinkwasserversorgung—Anforderungen und Prüfung*.

Dwyer DJ, Kohanski MA & Collins JJ (2009) Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Current opinion in microbiology* **12**: 482-489.

Espigares M, Perez Lopez J, Fernández-Crehuet M & Galvez R (1996) Assays for the tertiary biological treatment of wastewater using autotrophic biomass. *Environmental toxicology and water quality* **11**: 37-44.

EU Directive UW (1991) Council Directive of 21. May 1991 concerning urban waste water treatment (91/271/EEC). *Official Journal of the European Communities*.

European Centre for Disease Prevention and Control (2009) The bacterial challenge: time to react. *Stockholm: ECDC*.

European Centre for Disease Prevention and Control (2018) Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. *Stockholm: ECDC*.

Fall S, Mercier A, Bertolla F, Calteau A, Gueguen L, Perriere G, Vogel TM & Simonet P (2007) Horizontal gene transfer regulation in bacteria as a “spandrel” of DNA repair mechanisms. *PLoS one* **2**: e1055.

Finley RL, Collignon P, Larsson DGJ, McEwen SA, Li X-Z, Gaze WH, Reid-Smith R, Timinouni M, Graham DW & Topp E (2013) The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. *Clinical Infectious Diseases* **57**: 704-710.

Fiorentino A, Ferro G, Alferez MC, Polo-López MI, 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*. Wydawn. Nauk. UAM.

Gao P, Munir M & Xagorarakis I (2012) Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Sci Total Environ* **421**: 173-183.

Garrity GM (2005) Systematic bacteriology. *The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics* **2**.

Gaze WH, Krone SM, Larsson DJ, Li X-Z, Robinson JA, Simonet P, Smalla K & Timinouni M (2013) Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistance. *Emerging infectious diseases* **19**.

Gillings MR (2017) Class 1 integrons as invasive species. *Curr Opin microbiol* **38**: 10-15.

Guardabassi L, Wong DMLF & Dalsgaard A (2002) The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water research* **36**: 1955-1964.

Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D & Andersson DI (2011) Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens* **7**: e1002158.

Guo M-T, Yuan Q-B & Yang J (2015) Distinguishing effects of ultraviolet exposure and chlorination on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater. *Environ Sci Technol* **49**: 5771-5778.

Händel N, Hoeksema M, Mata MF, Brul S & Ter Kuile BH (2016) Effects of stress, reactive oxygen species, and the SOS response on de novo acquisition of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 1319-1327.

Hembach N, Alexander J, Hiller C, Wieland A & Schwartz T (2019) Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant. *Scientific reports* **9**: 12843.

Hembach N, Schmid F, Alexander J, Hiller C, Rogall ET & Schwartz T (2017) Occurrence of the mcr-1 Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Frontiers in microbiology* **8**.

Hijnen W, Beerendonk E & Medema GJ (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo) cysts in water: a review. *Water research* **40**: 3-22.

Hiller C, Hübner U, Fajnorova S, Schwartz T & Drewes J (2019) Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. *Sci Total Environ*.

Hollender J, Zimmermann SG, Koepke S, Krauss M, McArdell CS, Ort C, Singer H, von Gunten U & Siegrist H (2009) Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. *Environmental science & technology* **43**: 7862-7869.

Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G & Gardam MA (2009) Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to

imperfect intensive care unit room design. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **30**: 25-33.

Huber B, Drewes J, Lin K, König R & Müller E (2014) Revealing biogenic sulfuric acid corrosion in sludge digesters: detection of sulfur-oxidizing bacteria within full-scale digesters. *Water Science and Technology* **70**: 1405-1411.

Hyatt D, Chen G-L, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW & Hauser LJ (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**: 1-11.

Jäger T, Alexander J, Kirchen S, Dötsch A, Wieland A, Hiller C & Schwartz T (2018a) Live-dead discrimination analysis, qPCR assessment for opportunistic pathogens, and population analysis at ozone wastewater treatment plants. *Environmental Pollution* **232**: 571-579.

Jäger T, Hembach N, Elpers C, Wieland A, Alexander J, Hiller C, Krauter G & Schwartz T (2018b) Reduction of antibiotic resistant bacteria during conventional and advanced wastewater treatment, and the disseminated loads released to the environment. *Frontiers in microbiology* **9**: 2599.

Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W & Smalla K (2014) Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol* **22**: 536-545.

Jiménez S, Andreozzi M, Micó MM, Álvarez MG & Contreras S (2019) Produced water treatment by advanced oxidation processes. *Sci Total Environ* **666**: 12-21.

Jungfer C, Schwartz T & Obst U (2007) UV-induced dark repair mechanisms in bacteria associated with drinking water. *Water research* **41**: 188-196.

Karaolia P, Michael-Kordatou I, Hapeshi E, Drosou C, Bertakis Y, Christofilos D, Armatas GS, Sygellou L, Schwartz T & Xekoukoulotakis NP (2018) Removal of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria and their associated genes by graphene-based TiO<sub>2</sub> composite photocatalysts under solar radiation in urban wastewaters. *Applied Catalysis B: Environmental* **224**: 810-824.

Katiyar SK, Matsui MS & Mukhtar H (2000) Kinetics of UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in human skin in vivo: an immunohistochemical analysis of both epidermis and dermis. *Photochemistry and photobiology* **72**: 788-793.

Khatri N & Tyagi S (2015) Influences of natural and anthropogenic factors on surface and groundwater quality in rural and urban areas. *Frontiers in Life Science* **8**: 23-39.

Kim S-C & Carlson K (2007) Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environmental science & technology* **41**: 50-57.

Klein G, Pack A & Reuter G (1998) Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Applied and environmental microbiology* **64**: 1825-1830.

Köck R, Siemer P, Esser J, Kampmeier S, Berends M, Glasner C, Arends J, Becker K & Friedrich A (2018) Defining Multidrug Resistance of Gram-Negative Bacteria in the Dutch–German Border Region—Impact of National Guidelines. *Microorganisms* **6**: 11.

Kohanski MA, DePristo MA & Collins JJ (2010) Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular cell* **37**: 311-320.

Kondrakov A, Ignatev A, Lunin V, Frimmel F, 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**: 424-430.

Kraft S, Ursula O & Thomas S (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**: 435-441.

Kristich CJ, Wells CL & Dunny GM (2007) A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3508-3513.

Kurpiel PM & Hanson ND (2011) Association of IS 5 with divergent tandem bla CMY-2 genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **66**: 1734-1738.

Laliberte G, Proulx D, De Pauw N & De La Noue J (1994) Algal technology in waste water treatment. Chapt. 11. *Algae and water pollution* LC Rai, JP Gaur & CJ Soeder (Eds) E Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u Obermiller), Stuttgart 283-302.

Lam MM, Seemann T, Bulach DM, *et al.* (2012) Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *Journal of bacteriology* **194**: 2334-2341.

Lazarova V, Asano T, Bahri A & Anderson J (2013) *Milestones in water reuse*. IWA publishing.

Lee DG, Urbach JM, Wu G, *et al.* (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome biology* **7**: R90.

Lee Y & von Gunten U (2010) Oxidative transformation of micropollutants during municipal wastewater treatment: comparison of kinetic aspects of selective (chlorine, chlorine dioxide, ferrate VI, and ozone) and non-selective oxidants (hydroxyl radical). *Water research* **44**: 555-566.

Li D, Tong T, Zeng S, Lin Y, Wu S & He M (2014) Quantification of viable bacteria in wastewater treatment plants by using propidium monoazide combined with quantitative PCR (PMA-qPCR). *Journal of Environmental Sciences* **26**: 299-306.

Li J, Cheng W, Xu L, Strong P & Chen H (2015) Antibiotic-resistant genes and antibiotic-resistant bacteria in the effluent of urban residential areas, hospitals, and a municipal wastewater treatment plant system. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**: 4587-4596.

Liébana R, Arregui L, Santos A, Murciano A, Marquina D & Serrano S (2016) Unravelling the interactions among microbial populations found in activated sludge during biofilm formation. *FEMS microbiology ecology* **92**: fiw134.

Lüddecke F, Heß S, Gallert C, Winter J, Guede H & Loeffler H (2015) Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water research* **69**: 243-251.

MacFadden DR, McGough SF, Fisman D, Santillana M & Brownstein JS (2018) Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nature climate change* **8**: 510-514.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, Harbarth S, Hindler J, Kahlmeter G & Olsson-Liljequist B (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection* **18**: 268-281.

Marti E & Balcázar JL (2013) Real-time PCR assays for quantification of qnr genes in environmental water samples and chicken feces. *Appl Environ Microbiol* **79**: 1743-1745.

Matsumura Y & Ananthaswamy HN (2002) Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert reviews in molecular medicine* **4**: 1-22.

McKinney CW & Pruden A (2012) Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environ Sci Technol* **46**: 13393-13400.

Meyer E, Gastmeier P, Deja M & Schwab F (2013) Antibiotic consumption and resistance: Data from Europe and Germany. *International Journal of Medical Microbiology* **303**: 388-395.

Michael-Kordatou I, Karaolia P & Fatta-Kassinos D (2018) The role of operating parameters and oxidative damage mechanisms of advanced chemical oxidation processes in the combat against antibiotic-resistant bacteria and resistance genes present in urban wastewater. *Water Res* **129**: 208-230.

Michael I, Rizzo L, McArdell C, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C & Fatta-Kassinos D (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res* **47**: 957-995.

Michael SG, Michael-Kordatou I, Beretsou VG, Jäger T, Michael C, Schwartz T & Fatta-Kassinos D (2019) Solar photo-Fenton oxidation followed by adsorption on activated carbon for the minimisation of antibiotic resistance determinants and toxicity present in urban wastewater. *Applied Catalysis B: Environmental* **244**: 871-880.

Mitchell DL & Karentz D (1993) The induction and repair of DNA photodamage in the environment. *Environmental UV photobiology*, p. 345-377. Springer.

Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C & Silbert S (2012) Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **67**: 906-909.

Moreira NF, Narciso-da-Rocha C, Polo-López MI, Pastrana-Martínez LM, Faria JL, Manaia CM, Fernández-Ibáñez P, Nunes OC & Silva AM (2018) Solar treatment (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>-P25 and GO-TiO<sub>2</sub> photocatalysis, photo-Fenton) of organic micropollutants, human pathogen

indicators, antibiotic resistant bacteria and related genes in urban wastewater. *Water research* **135**: 195-206.

Müller H, Sib E, Gajdiss M, Klanke U, Lenz-Plet F, Barabasch V, Albert C, Schallenberg A, Timm C & Zacharias N (2018) Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiol Ecol* **94**: fiy057.

Munir M, Wong K & Xagorarakis I (2011) Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water research* **45**: 681-693.

Narciso-da-Rocha C & Manaia CM (2016) Multidrug resistance phenotypes are widespread over different bacterial taxonomic groups thriving in surface water. *Sci Total Environ* **563**: 1-9.

Narciso-da-Rocha C, Rocha J, Vaz-Moreira I, Lira F, Tamames J, Henriques I, Martinez JL & Manaia CM (2018) Bacterial lineages putatively associated with the dissemination of antibiotic resistance genes in a full-scale urban wastewater treatment plant. *Environment International* **118**: 179-188.

National Blue Ribbon Commission for Onsite Non-Potable Water Systems UWA (2017) A guidebook for developing and implementing regulations for onsite non-potable water systems. p.^pp.

Nishiwaki Y, Kobayashi N, Imoto K, Iwamoto T-a, Yamamoto A, Katsumi S, Shirai T, Sugiura S, Nakamura Y & Sarasin A (2004) Trichothiodystrophy fibroblasts are deficient in the repair of ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimers and (6–4) photoproducts. *Journal of investigative dermatology* **122**: 526-532.

Nocker A, Cheung C-Y & Camper AK (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* **67**: 310-320.

Nocker A, Sossa KE & Camper AK (2007a) Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of microbiological methods* **70**: 252-260.

Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD & Camper AK (2007b) Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and environmental microbiology* **73**: 5111-5117.

Nocker A, Mazza A, Masson L, Camper AK & Brousseau R (2009) Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *J Microbiol Methods* **76**: 253-261.

Nocker A, Richter-Heitmann T, Montijn R, Schuren F & Kort R (2010) Discrimination between live and dead cells in bacterial communities from environmental water samples analyzed by 454 pyrosequencing. *Int Microbiol* **13**: 59-65.

Novo A, André S, Viana P, Nunes OC & Manaia CM (2013) Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water research* **47**: 1875-1887.

Okafor N (2011) *Environmental microbiology of aquatic and waste systems*. Springer Science & Business Media.

Öncü NB, Menceloğlu YZ & Balçioğlu IA (2011) Comparison of the effectiveness of chlorine, ozone, and photocatalytic disinfection in reducing the risk of antibiotic resistance pollution. *Journal of Advanced Oxidation Technologies* **14**: 196-203.

Ortega-Gómez E, Fernández-Ibáñez P, Martín MB, Polo-López M, García BE & Pérez JS (2012) Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on *Enterococcus faecalis* survival. *Water Res* **46**: 6154-6162.

Pak G, Salcedo DE, Lee H, Oh J, Maeng SK, Song KG, Hong SW, Kim H-C, Chandran K & Kim S (2016) Comparison of antibiotic resistance removal efficiencies using ozone disinfection under different pH and suspended solids and humic substance concentrations. *Environ Sci Technol* **50**: 7590-7600.

Pang Y-C, Xi J-Y, Xu Y, Huo Z-Y & Hu H-Y (2016) Shifts of live bacterial community in secondary effluent by chlorine disinfection revealed by Miseq high-throughput sequencing combined with propidium monoazide treatment. *Applied microbiology and biotechnology* **100**: 6435-6446.

Pärnänen KM, Narciso-da-Rocha C, Kneis D, Berendonk TU, Cacace D, Do TT, Elpers C, Fatta-Kassinos D, Henriques I & Jaeger T (2019) Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Science advances* **5**: eaau9124.

Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB & Bonomo RA (2003) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3554-3560.

Peak N, Knapp CW, Yang RK, Hanfelt MM, Smith MS, Aga DS & Graham DW (2007) Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environ Microbiol* **9**: 143-151.

Peters LP, Carvalho G, Martins PF, Dourado MN, Vilhena MB, Pileggi M & Azevedo RA (2014) Differential responses of the antioxidant system of ametryn and clomazone tolerant bacteria. *PLoS One* **9**: e112271.

Pruden A, Pei R, Storteboom H & Carlson KH (2006) Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental science & technology* **40**: 7445-7450.

Rice LB (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. p. app. The University of Chicago Press.

Rieder A, Schwartz T, Schön-Hölz K, Marten S-M, Süß J, Gusbeth C, Kohnen W, Swoboda W, Obst U & Frey W (2008) Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. *J Appl Microbiol* **105**: 2035-2045.

Rincón 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* **63**: 222-231.

Rizzo L, Della Sala A, Fiorentino A & Li Puma G (2014) Disinfection of urban wastewater by solar driven and UV lamp – TiO<sub>2</sub> photocatalysis: Effect on a multi drug resistant *Escherichia coli* strain. *Water Res* **53**: 145-152.

Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy M, Michael I & Fatta-Kassinos D (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of The Total Environment* **447**: 345-360.

Rocha J, Fernandes T, Riquelme MV, Zhu N, Pruden A & Manaia CM (2019) Comparison of Culture-and Quantitative PCR-Based Indicators of Antibiotic Resistance in Wastewater, Recycled Water, and Tap Water. *Int J Environ Res Public Health* **16**: 4217.

Rocha J, Cacace D, Kampouris I, Guilloteau H, Jäger T, Marano RB, Karaolia P, Manaia CM, Merlin C & Fatta-Kassinos D (2018) Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*.

Rodriguez-Mozaz S, Chamorro S, Marti E, Huerta B, Gros M, Sánchez-Melsió A, Borrego CM, Barceló D & Balcázar JL (2015) Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res* **69**: 234-242.

Rodriguez-Mozaz S, Vaz-Moreira I, Della Giustina SV, Llorca M, Barceló D, Schubert S, Berendonk TU, Michael-Kordatou I, Fatta-Kassinos D & Martinez JL (2020) Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environment International* **140**: 105733.

Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A & Blázquez J (2013) Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology* **303**: 293-297.

Saunders AM, Albertsen M, Vollertsen J & Nielsen PH (2016) The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *The ISME journal* **10**: 11-20.

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 Microbiol Ecol* **43**: 325-335.

Schwartz T, Volkmann H, Kirchen S, Kohnen W, Schön-Hölz K, Jansen B & Obst U (2006) Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS microbiology ecology* **57**: 158-167.

Sharma VK, Johnson N, Cizmas L, McDonald TJ & Kim H (2016) A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere* **150**: 702-714.

Stalder T, Barraud O, Jové T, Casellas M, Gaschet M, Dagot C & Ploy M-C (2014) Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *The ISME journal* **8**: 768-777.

Stohl EA, Brockman JP, Burkle KL, Morimatsu K, Kowalczykowski SC & Seifert HS (2003) Escherichia coli RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 2278-2285.

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**: 3705-3716.

Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, Gartemann K-H, Guetzkow T, Eichler W, Pühler A & Schlueter A (2009) Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* **155**: 2306-2319.

Tacconelli E, Magrini N, Kahlmeter G & Singh N (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization* **27**.

Tello A, Austin B & Telfer TC (2012) Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environmental health perspectives* **120**: 1100-1106.

Ternes TA, Meisenheimer M, McDowell D, Sacher F, Brauch H-J, Haist-Gulde B, Preuss G, Wilme U & Zulei-Seibert N (2002) Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment. *Environ Sci Technol* **36**: 3855-3863.

Tian S, Tian Z, Yang H, Yang M & Zhang Y (2017) Detection of Viable Bacteria during Sludge Ozonation by the Combination of ATP Assay with PMA-Miseq Sequencing. *Water* **9**: 166.

Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL, Scholz M, Weingart G, Pasolli E, Tett A, Huttenhower C & Segata N (2015) MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nature methods* **12**: 902-903.

van der Zee A, Roorda L, Hendriks WD, Ossewaarde JM & Buitenwerf J (2011) Detection of novel chromosome-SCCmec variants in Methicillin Resistant Staphylococcus aureus and their inclusion in PCR based screening. *BMC research notes* **4**: 150.

Villarreal JV, Jungfer C, Obst U & Schwartz T (2013) DNase I and Proteinase K eliminate DNA from injured or dead bacteria but not from living bacteria in microbial reference systems and natural drinking water biofilms for subsequent molecular biology analyses. *Journal of microbiological methods* **94**: 161-169.

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**: 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**: 1469-1487.

Von Gunten U & Hoigne J (1994) Bromate formation during ozonation of bromide-containing waters: interaction of ozone and hydroxyl radical reactions. *Environmental science & technology* **28**: 1234-1242.

Wellington EM & Van Elsas JD (2013) *Genetic interactions among microorganisms in the natural environment*. Elsevier.

Wendt C, Baum H, Kaase M, Meyer E, Suger-Wiedeck H & Ruscher C (2012) Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen: Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). *Bundesgesundheitsblatt* **55**: 1311-1354.

World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 summary. p.^pp. World Health Organization.

World Health Organization (2018) Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2017-2018.

Yang Y, Li B, Zou S, Fang HH & Zhang T (2014) Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water Res* **62**: 97-106.

Yue JC & Clayton MK (2005) A similarity measure based on species proportions. *Communications in Statistics-Theory and Methods* **34**: 2123-2131.

Zhuang Y, Ren H, Geng J, Zhang Y, Zhang Y, Ding L & Xu K (2015) Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. *Environmental Science and Pollution Research* **22**: 7037-7044.

Zimmermann SG, 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**: 605-617.

## 7. Anhang

### 7.1. Absolute Häufigkeiten der ARB während der unterschiedlichen Reinigungsstufen einer Großkläranlage

Tabelle 14: Molekularbiologische Untersuchungen der absoluten Häufigkeiten von fakultativ pathogener Bakterien nach verschiedenen Abwasserbehandlungstechnologien und die Auswirkungen 72h nach der Behandlung anhand von qPCR-Analysen, normiert auf 100 mL Abwasservolumen.

Zelläquivalente/ 100 mL Abwasservolumen	<i>Eubakterien (16S rDNA)</i>	<i>P. aeruginosa (ecfX)</i>	<i>Enterokokken (23S rDNA)</i>	<i>E. coli (yccT)</i>
Ablauf mechanische Reinigung	2,21E+10	1,59E+04	1,25E+07	1,28E+07
Ablauf mechanische Reinigung PMA	1,69E+10	2,06E+04	8,21E+06	1,09E+07
Ablauf NKB	7,68E+08	1,87E+02	7,47E+04	1,07E+05
Ablauf NKB PMA	8,23E+08	7,43E+02	5,09E+04	9,62E+04
Ablauf NKB nach 72h Inkubation	1,27E+08	n.d.	6,64E+02	3,09E+03
Ablauf Ozonung	2,26E+07	9,74E+01	1,85E+03	9,94E+02
Ablauf Ozonung PMA	6,33E+06	3,62E+01	3,29E+02	3,97E+02
Ablauf Ozonung nach 72h Inkubation	1,26E+09	3,46E+03	4,05E+02	1,72E+03

Tabelle 15: Maximale und minimale Abweichungen der absoluten Häufigkeiten der taxonomischen Parameter der unterschiedlichen Abwasserbehandlungstechnologien der Großkläranlage.

Minimal- und-Maximal-Werte		<i>Eubakterien (16S rDNA)</i>	<i>P. aeruginosa (ecfX)</i>	<i>Enterokokken (23S rDNA)</i>	<i>E. coli (yccT)</i>
Zelläquivalente/ 100 mL Abwasservolumen					
<b>Ablauf mechanische Reinigung</b>	Max	3,27E+10	4,62E+04	1,34E+07	1,92E+07
	Min	1,96E+10	1,47E+04	1,24E+07	1,23E+07
<b>Ablauf mechanische Reinigung PMA</b>	Max	3,05E+10	5,48E+04	1,11E+07	1,35E+07
	Min	1,57E+10	1,58E+04	7,68E+06	1,04E+07
<b>Ablauf NKB</b>	Max	9,53E+08	3,36E+02	1,01E+05	1,23E+05
	Min	7,04E+08	1,56E+02	6,84E+04	9,81E+04
<b>Ablauf NKB PMA</b>	Max	1,01E+09	1,26E+03	7,59E+04	1,20E+05
	Min	8,11E+08	6,95E+02	4,92E+04	9,55E+04
<b>Ablauf NKB nach 72h Inkubation</b>	Max	1,84E+08	n.d.	1,36E+03	3,21E+03
	Min	1,26E+08	n.d.	4,76E+02	2,64E+03
<b>Ablauf Ozonung</b>	Max	3,32E+07	1,11E+02	1,02E+04	1,79E+03
	Min	2,23E+07	8,59E+01	1,81E+03	8,94E+02
<b>Ablauf Ozonung PMA</b>	Max	1,32E+07	2,02E+01	6,51E+02	7,19E+02
	Min	6,17E+06	2,56E+01	3,29E+02	3,80E+02
<b>Ablauf Ozonung nach 72h Inkubation</b>	Max	2,12E+09	1,10E+04	4,42E+02	3,98E+03
	Min	1,26E+09	3,44E+03	3,24E+02	1,60E+03

## 7.2. Absolute Häufigkeiten der ARGs während der unterschiedlichen Reinigungsstufen einer Großkläranlage

Tabelle 16: Molekularbiologische Untersuchungen der absoluten Häufigkeiten der Antibiotika-Resistenzgene nach verschiedenen Abwasserbehandlungstechnologien und die Auswirkungen 72h nach der Behandlung anhand von qPCR-Analysen, normiert auf 100 mL Abwasservolumen.

[Zelläquivalente/ 100 mL Abwasservolumen]	Integrase 1 (intI1)	Quinolon-Resistenz (qnrS)	β-Laktam-Resistenz (ctx-M32)	β-Laktam-Resistenz (TEM)	Erythromycin-Resistenz (ermB)	Sulfonamid-Resistenz (sul1)	Vancomycin-Resistenz (vanA)	Methicillin-Resistenz (mecA)
<b>Ablauf mechanische Reinigung</b>	5,39E+07	4,03E+06	2,86E+06	9,60E+07	2,95E+09	2,47E+08	9,90E+04	7,59E+03
<b>Ablauf mechanische Reinigung PMA</b>	5,24E+07	9,50E+06	2,75E+06	8,63E+07	2,11E+09	2,26E+08	6,15E+04	4,27E+03
<b>Ablauf NKB</b>	2,14E+06	2,93E+05	1,28E+05	1,13E+06	7,68E+06	1,41E+07	n.d.	n.d.
<b>Ablauf NKB PMA</b>	2,66E+06	3,12E+05	4,32E+04	5,91E+05	4,29E+06	1,72E+07	n.d.	n.d.
<b>Ablauf NKB nach 72h Inkubation</b>	4,47E+05	3,76E+04	1,71E+05	7,95E+05	1,02E+05	4,11E+06	n.d.	n.d.
<b>Ablauf Ozonung</b>	7,53E+04	1,61E+04	6,60E+04	3,94E+05	6,52E+04	4,53E+05	n.d.	n.d.
<b>Ablauf Ozonung PMA</b>	5,38E+04	2,22E+04	1,08E+05	6,79E+05	1,94E+04	2,53E+05	n.d.	n.d.
<b>Ablauf Ozonung nach 72h Inkubation</b>	6,04E+06	1,47E+04	2,38E+04	1,25E+05	8,84E+04	3,37E+07	n.d.	n.d.

Tabelle 17: Maximale und minimale Abweichungen der absoluten Häufigkeiten der untersuchten Resistenzgene der unterschiedlichen Verfahrenstechniken der Großkläranlage.

Minimal- und Maximal-Werte		Integrase 1 (intl1)	Quinolon-Resistenz (qnrS)	β-Laktam-Resistenz (ctx-M32)	β-Laktam-Resistenz (TEM)	Erythromycin-Resistenz (ermB)	Sulfonamid-Resistenz (sul1)	Vancomycin-Resistenz (vanA)	Methicillin-Resistenz (mecA)
Zelläquivalente/ 100 mL Abwasservolumen									
Ablauf mechanische Reinigung	Max	1,22E+08	2,80E+06	3,96E+06	1,70E+08	1,13E+10	2,59E+08	5,82E+05	9,70E+03
	Min	4,70E+07	3,30E+06	2,65E+06	9,36E+07	2,95E+09	2,16E+08	9,82E+04	6,66E+03
Ablauf mechanische Reinigung PMA	Max	1,42E+08	8,57E+06	3,06E+06	2,09E+08	8,18E+09	2,94E+08	4,85E+05	2,97E+03
	Min	4,62E+07	8,57E+06	2,53E+06	8,40E+07	2,10E+09	1,83E+08	6,12E+04	3,90E+03
Ablauf NKB	Max	1,70E+06	7,32E+05	7,40E+05	5,53E+06	2,95E+07	1,86E+07	n.d.	n.d.
	Min	1,96E+06	2,83E+05	1,25E+05	1,09E+06	7,62E+06	1,31E+07	n.d.	n.d.
Ablauf NKB PMA	Max	2,54E+06	8,01E+05	7,56E+04	1,74E+06	1,60E+07	1,91E+07	n.d.	n.d.
	Min	2,61E+06	3,10E+05	4,28E+04	5,84E+05	4,27E+06	1,65E+07	n.d.	n.d.
Ablauf NKB nach 72h Inkubation	Max	1,03E+06	1,01E+05	3,41E+05	3,06E+06	3,48E+05	6,86E+06	n.d.	n.d.
	Min	4,42E+05	3,67E+04	1,71E+05	7,90E+05	1,02E+05	3,92E+06	n.d.	n.d.
Ablauf Ozonung	Max	2,08E+05	7,91E+04	2,82E+05	2,40E+06	1,38E+05	1,10E+06	n.d.	n.d.
	Min	7,47E+04	1,60E+04	6,58E+04	3,88E+05	6,50E+04	4,52E+05	n.d.	n.d.

<b>Ablauf Ozonung PMA</b>	Max	2,22E+05	1,04E+05	4,10E+05	4,58E+06	7,11E+04	8,25E+05	n.d.	n.d.
	Min	5,36E+04	2,18E+04	1,07E+05	6,78E+05	1,78E+04	2,52E+05	n.d.	n.d.
<b>Ablauf Ozonung nach 72h Inkubation</b>	Max	1,89E+07	1,52E+04	6,99E+04	4,01E+05	1,24E+05	9,66E+07	n.d.	n.d.
	Min	6,03E+06	1,39E+04	2,35E+04	1,19E+05	8,76E+04	3,36E+07	n.d.	n.d.

### 7.3. Relative Häufigkeiten der ARB während der unterschiedlichen Reinigungsstufen einer Großkläranlage

Tabelle 18: Molekularbiologische Untersuchungen der relativen Häufigkeiten der fakultativ pathogener Bakterien nach verschiedenen Abwasserbehandlungstechnologien und die Auswirkungen 72h nach der Behandlung anhand von qPCR-Analysen, normiert auf 100 ng DNA.

[Zelläquivalente/ 100nf DNA]	<i>Eubakterien (16S rDNA)</i>	<i>P. aeruginosa (ecfX)</i>	<i>Enterokokken (23S rDNA)</i>	<i>E. coli (yccT)</i>
Ablauf mechanische Reinigung	2,37E+08	2,01E+02	1,71E+05	1,84E+05
Ablauf mechanische Reinigung PMA	2,32E+08	4,83E+02	1,57E+05	2,14E+05
Ablauf NKB	3,35E+07	1,28E+01	4,14E+03	5,34E+03
Ablauf NKB PMA	3,33E+07	3,27E+01	3,24E+03	4,98E+03
Ablauf NKB nach 72h Inkubation	1,13E+08	n.d.	6,41E+01	2,31E+02
Ablauf Ozonung	6,89E+07	3,12E+02	2,50E+03	3,33E+03
Ablauf Ozonung PMA	3,78E+07	3,19E+02	1,38E+03	1,82E+03
Ablauf Ozonung nach 72h Inkubation	7,58E+07	5,11E+02	2,05E+02	2,11E+02

Tabelle 19: Maximale und minimale Abweichungen der relativen Häufigkeiten der taxonomischen Parameter der unterschiedlichen Reinigungsstufen der Großkläranlage.

Minimal- und Maximal-Werte		<i>Eubakterien (16S rDNA)</i>	<i>P. aeruginosa (ecfX)</i>	<i>Enterokokken (23S rDNA)</i>	<i>E. coli (ycct)</i>
<b>[Zelläquivalente/ 100nf DNA]</b>					
<b>Ablauf mechanische Reinigung</b>	Max	1,58E+08	5,46E+02	1,53E+05	2,13E+05
	Min	9,84E+07	1,37E+02	1,62E+05	1,29E+05
<b>Ablauf mechanische Reinigung PMA</b>	Max	2,64E+08	1,22E+03	1,71E+05	2,64E+05
	Min	8,37E+07	3,60E+02	1,08E+05	1,70E+05
<b>Ablauf NKB</b>	Max	3,05E+07	2,69E+01	3,02E+03	4,31E+03
	Min	1,58E+07	1,10E+01	3,78E+03	4,05E+03
<b>Ablauf NKB PMA</b>	Max	2,80E+07	5,50E+01	2,68E+03	3,19E+03
	Min	1,57E+07	3,03E+01	3,09E+03	4,34E+03
<b>Ablauf NKB nach 72h Inkubation</b>	Max	3,57E+08	n.d.	1,92E+01	5,95E+01
	Min	1,08E+08	n.d.	3,77E+01	3,93E+01
<b>Ablauf Ozonung</b>	Max	2,21E+08	2,13E+02	1,04E+04	8,62E+03
	Min	6,69E+07	3,04E+02	2,30E+03	2,93E+03
<b>Ablauf Ozonung PMA</b>	Max	2,12E+07	1,52E+02	1,41E+03	1,96E+03
	Min	2,14E+07	2,78E+02	1,34E+03	1,61E+03
<b>Ablauf Ozonung nach 72h Inkubation</b>	Max	7,93E+07	8,13E+02	3,08E+02	3,13E+02
	Min	5,59E+07	4,42E+02	1,81E+02	1,59E+02

## 7.4. Relative Häufigkeiten der ARGs während der unterschiedlichen Reinigungsstufen einer Großkläranlage

Tabelle 20: Molekularbiologische Untersuchungen der relativen Häufigkeiten der Antibiotika-Resistenzgene nach verschiedenen Abwasserbehandlungstechnologien und die Auswirkungen 72h nach der Behandlung anhand von qPCR-Analysen, normiert auf 100 ng DNA.

[Zelläquivalente/ 100nf DNA]	Integrase 1 (intl1)	Quinolon- Resistenz (qnrS)	β-Laktam- Resistenz (ctx-M32)	β-Laktam- Resistenz (TEM)	Erythromycin- Resistenz (ermB)	Sulfonamid- Resistenz (sul1)	Vancomycin- Resistenz (vanA)	Methicillin- Resistenz (mecA)
<b>Ablauf mechanische Reinigung</b>	7,37E+05	6,86E+04	3,91E+04	1,21E+06	3,00E+07	3,41E+06	8,90E+02	8,93E+01
<b>Ablauf mechanische Reinigung PMA</b>	9,30E+05	2,10E+05	5,12E+04	1,33E+06	2,60E+07	4,48E+06	9,56E+02	6,49E+01
<b>Ablauf NKB</b>	1,27E+05	1,61E+04	4,97E+03	5,10E+04	3,73E+05	7,89E+05	n.d.	n.d.
<b>Ablauf NKB PMA</b>	1,56E+05	1,87E+04	2,10E+03	3,36E+04	2,21E+05	1,07E+06	n.d.	n.d.
<b>Ablauf NKB nach 72h Inkubation</b>	8,34E+04	4,31E+03	1,97E+04	9,34E+04	1,15E+04	6,26E+05	n.d.	n.d.
<b>Ablauf Ozonung</b>	1,44E+05	3,19E+04	1,43E+05	7,83E+05	1,88E+05	8,61E+05	n.d.	n.d.
<b>Ablauf Ozonung PMA</b>	3,88E+05	1,85E+05	9,04E+05	5,76E+06	1,57E+05	1,66E+06	n.d.	n.d.
<b>Ablauf Ozonung nach 72h Inkubation</b>	9,17E+05	2,60E+03	2,43E+03	2,25E+04	2,06E+04	4,80E+06	n.d.	n.d.

**Tabelle 21: Maximale und minimale Abweichungen der relativen Häufigkeiten der untersuchten Resistenzgene der unterschiedlichen Reinigungsstufen der Großkläranlage.**

Minimal- und Maximal-Werte		Integrase 1 (int1)	Quinolon-Resistenz (qnrS)	β-Laktam-Resistenz (ctx-M32)	β-Laktam-Resistenz (TEM)	Erythromycin-Resistenz (ermB)	Sulfonamid-Resistenz (sul1)	Vancomycin-Resistenz (vanA)	Methicillin-Resistenz (mecA)
Zelläquivalente/ 100 ng DNA									
<b>Ablauf mechanische Reinigung</b>	Max	5,32E+05	6,75E+04	4,55E+04	1,69E+06	7,26E+07	4,05E+06	5,20E+03	6,52E+01
	Min	3,84E+05	4,78E+04	1,89E+04	9,70E+05	2,94E+07	1,98E+06	8,79E+02	5,43E+01
<b>Ablauf mechanische Reinigung PMA</b>	Max	1,10E+06	3,65E+05	6,23E+04	1,76E+06	8,16E+07	2,50E+06	7,47E+03	2,50E+01
	Min	4,41E+05	1,36E+05	3,11E+04	1,11E+06	2,56E+07	2,37E+06	9,48E+02	5,09E+01
<b>Ablauf NKB</b>	Max	2,01E+05	3,20E+04	2,39E+04	1,71E+05	8,65E+05	1,12E+06	n.d.	n.d.
	Min	9,17E+04	1,43E+04	4,58E+03	4,68E+04	3,67E+05	6,22E+05	n.d.	n.d.
<b>Ablauf NKB PMA</b>	Max	1,07E+05	3,37E+04	2,16E+03	6,88E+04	6,68E+05	8,40E+05	n.d.	n.d.
	Min	1,04E+05	1,77E+04	1,94E+03	3,12E+04	2,19E+05	7,96E+05	n.d.	n.d.
<b>Ablauf NKB nach 72h Inkubation</b>	Max	8,67E+04	1,16E+04	3,92E+04	3,51E+05	4,02E+04	6,70E+05	n.d.	n.d.
	Min	6,43E+04	4,00E+03	1,96E+04	9,03E+04	1,08E+04	5,44E+05	n.d.	n.d.
<b>Ablauf Ozonung</b>	Max	1,66E+05	1,12E+05	3,84E+05	3,46E+06	3,43E+05	1,39E+06	n.d.	n.d.
	Min	1,40E+05	2,73E+04	1,41E+05	7,54E+05	1,88E+05	8,58E+05	n.d.	n.d.

<b>Ablauf Ozonung PMA</b>	Max	1,91E+06	8,64E+05	3,41E+06	3,81E+07	5,97E+05	7,32E+06	n.d.	n.d.
	Min	3,56E+05	1,83E+05	9,03E+05	5,73E+06	1,51E+05	1,31E+06	n.d.	n.d.
<b>Ablauf Ozonung nach 72h Inkubation</b>	Max	1,37E+06	2,25E+03	5,27E+03	2,78E+04	3,91E+04	7,15E+06	n.d.	n.d.
	Min	8,56E+05	1,94E+03	2,35E+03	2,02E+04	2,04E+04	4,74E+06	n.d.	n.d.

## 7.5. Auswirkungen der biologischen Abwasseraufbereitung auf die bakterielle Population

Tabelle 22: Lebend-/Gesamtverhältnis der im Auslauf des Nachklärbeckens (NKB) vorhandenen Gattungen. Es werden nur die Gattungen angezeigt, die  $\geq 1,0$  % der Sequenzen ausmachen. Gruppe A entspricht einem Verhältnis von  $0,8 < \text{Ratio} < 1,2$ , Gruppe B einem Verhältnis von  $> 1,2$  und Gruppe C einem Verhältnis von  $< 0,8$  (Jäger *et al.*, 2018a).

Genera	relative Häufigkeit im Ablauf des NKBs [%]		Verhältnis PMA/non-PMA	
	mit PMA	Ohne PMA		
Gruppe A $0,8 < x < 1,2$	<i>Pseudomonas</i>	2,11	2,64	0,80
	<i>Acinetobacter</i>	4,48	5,05	0,89
	<i>Candidatus Saccharimonas</i>	28,50	30,51	0,93
	<i>Polaromonas</i>	1,72	1,71	1,01
	<i>Microcoleus</i>	1,44	1,22	1,19
Gruppe B $x > 1,2$	<i>Nitrospira</i>	6,87	5,68	1,21
	<i>Arcobacter</i>	8,82	7,08	1,25
	<i>Limnohabitans</i>	3,96	2,81	1,41
	<i>Thiomonas</i>	8,16	5,73	1,42
	<i>Aeromonas</i>	3,33	2,33	1,43
Gruppe C $x < 0,8$	<i>Oscillatoria</i>	1,68	2,93	0,79
	<i>Bacteroides</i>	0,22	0,59	0,74
	<i>Dermatophilaceae</i>	0,93	1,18	0,57
	<i>Prevotella</i>	0,13	0,51	0,39

## 7.6. Auswirkungen der Ozonbehandlung auf die bakterielle Abwasserpopulation

Tabelle 23: Lebend-/Gesamtverhältnis der im Auslauf der Ozonanlage vorhandenen Gattungen. Es werden nur die Gattungen angezeigt, die  $\geq 1,0$  % der Sequenzen im Zulauf der Ozonung ausmachten. Gruppe A entspricht einem Verhältnis von  $0,8 < \text{Ratio} < 1,2$ , Gruppe B einem Verhältnis von  $> 1,2$  und Gruppe C einem Verhältnis von  $< 0,8$  (Jäger *et al.*, 2018a).

	Genera	relative Häufigkeit im Auslauf der Ozonung [%]		Verhältnis PMA/non-PMA
		mit PMA	ohne PMA	
Gruppe A				
$0,8 < x < 1,2$	<i>Pseudomonas</i>	1,94	2,11	0,92
	<i>Nitrospira</i>	21,34	6,16	3,46
Gruppe B				
$x > 1,2$	<i>Microcoleus</i>	12,30	6,96	1,77
	<i>Dermatophilaceae</i>	3,03	1,86	1,63
	<i>Oscillatoria</i>	8,87	6,23	1,42
	<i>Aeromonas</i>	0,99	1,65	0,60
	<i>Polaromonas</i>	0,54	1,13	0,48
	<i>Thiomonas</i>	1,85	5,96	0,31
	<i>Arcobacter</i>	1,13	6,30	0,18
Gruppe C				
$x < 0,8$	<i>Limnohabitans</i>	0,29	1,88	0,16
	<i>Acinetobacter</i>	0,42	2,79	0,15
	<i>Prevotella</i>	0,06	1,13	0,05
	<i>Bacteroides</i>	0,12	3,36	0,04
	<i>Candidatus Saccharimonas</i>	0,42	18,56	0,02

## 7.7. Reduktionseffizienzen innovativer Abwasserbehandlungstechniken

Tabelle 24: Reduktionseffizienzen der innovativen Abwasserbehandlungstechnologien auf taxonomische und Antibiotika-Resistenz Markergene. Als Kontrolle dient das biologisch behandelte Abwasser. Des Weiteren sind eine UV Behandlung mit 400 J/m<sup>2</sup> (UV Behandlung), eine Ozon Behandlung mit 1g Ozon/ g DOC (Ozon Behandlung) und die Kombination von UV und Ozon Behandlung (Kombination) dargestellt (Jäger *et al.*, 2018b).

Zielgen	Kontrolle	UV Behandlung	Ozon Behandlung	Kombination
	absolute Häufigkeit [Zell äquivalente/ 100 mL]	absolute Häufigkeit [Zell äquivalente / 100 mL]	Reduktion (-) Zunahme (+) [%]	absolute Häufigkeit [Zell äquivalente / 100 mL]
<b><i>Eubacteria (16S rDNA)</i></b>	2.94E+08	9.04E+07	-69.3%	4.65E+06
<b><i>Enterokokken (23S rDNA)</i></b>	6.27E+03	3.61E+03	-42.4%	1.91E+01
<b><i>P. aeruginosa (ecfX)</i></b>	9.89E+01	7.50E+01	-24.1%	0.00E+00
<b><i>E. coli (yccT)</i></b>	1.50E+04	1.09E+04	-27.4%	1.14E+02
<b><i>β-Laktam Resistenz (mecA)</i></b>	4.70E+01	0.00E+00	< LOD	0.00E+00
<b><i>β-Laktam Resistenz (ctx-M32)</i></b>	1.50E+04	5.05E+04	236.3%	2.17E+03
<b><i>Erythromycin Resistenz (ermB)</i></b>	5.37E+04	3.75E+04	-30.2%	1.01E+03
<b><i>β-Laktam Resistenz (TEM)</i></b>	1.22E+05	1.83E+05	50.1%	1.10E+04
<b><i>Sulfonamid Resistenz (sul1)</i></b>	1.33E+06	9.33E+05	-29.9%	6.83E+04
<b><i>Integrase 1 (intl1)</i></b>	4.42E+05	2.43E+05	-44.9%	2.34E+04

## 7.8. Wiederverkeimungspotential nach der biologischen Aufbereitung anhand absoluter und relativer Häufigkeiten

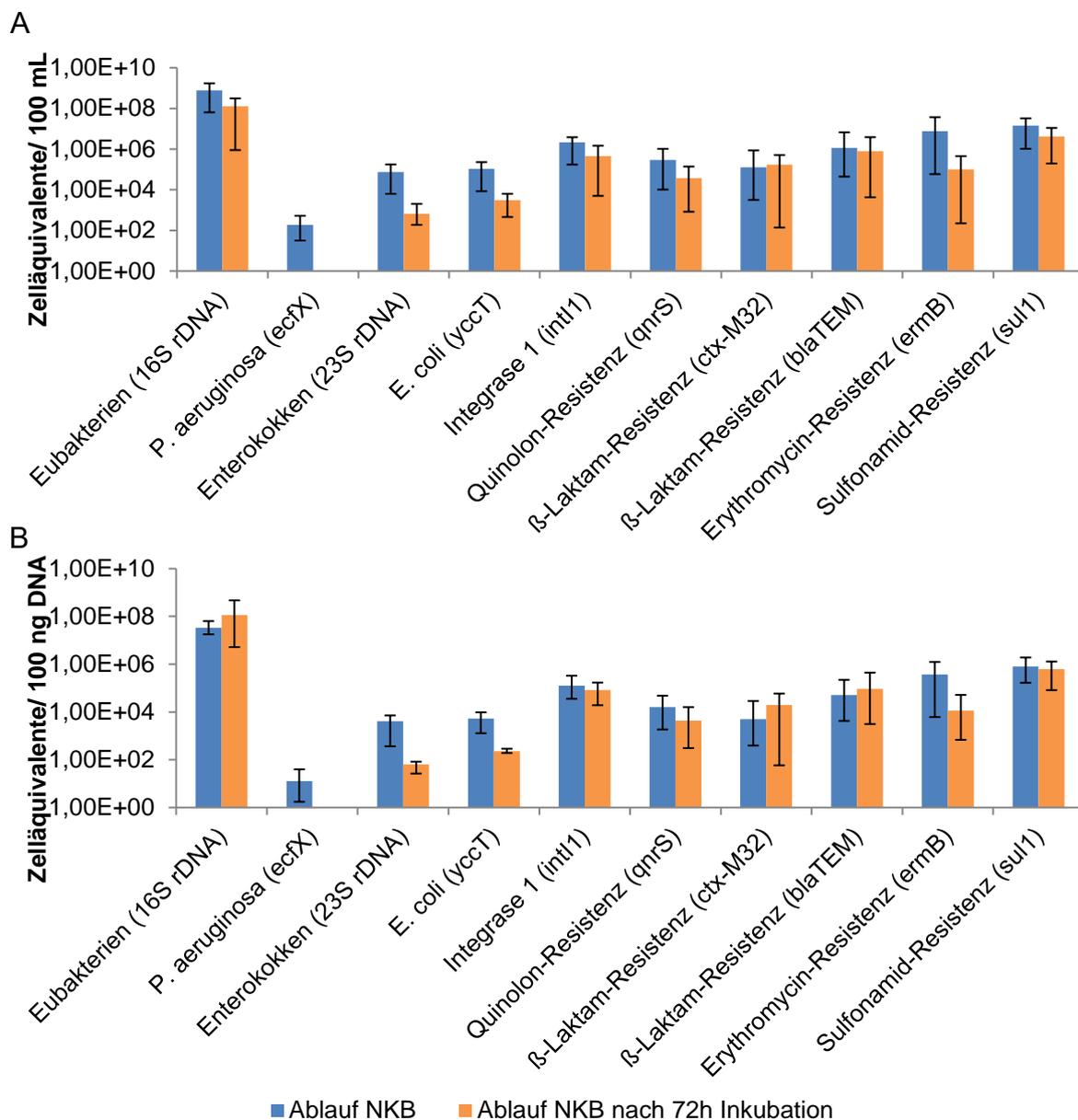


Abbildung 21: Wiederverkeimungspotential im Ablauf des Nachklärbeckens. In A) sind die absoluten Belastungen, dargestellt durch die qPCR Ergebnisse, die auf 100 mL Abwasservolumen normiert wurden, gezeigt. In B) ist die relative Belastungssituation im Ablauf des Nachklärbeckens, dargestellt durch die qPCR Ergebnisse der untersuchten Markergene gezeigt. Eine Normierung der Daten erfolgte auf 100 ng DNA. In blau sind die Messungen direkt nach der Entnahme gezeigt. In orange sind die Ergebnisse nach einer 72-stündigen Inkubation dargestellt.

## 7.9. Wiederverkeimungspotential nach der Ozonung anhand von Populationsanalysen

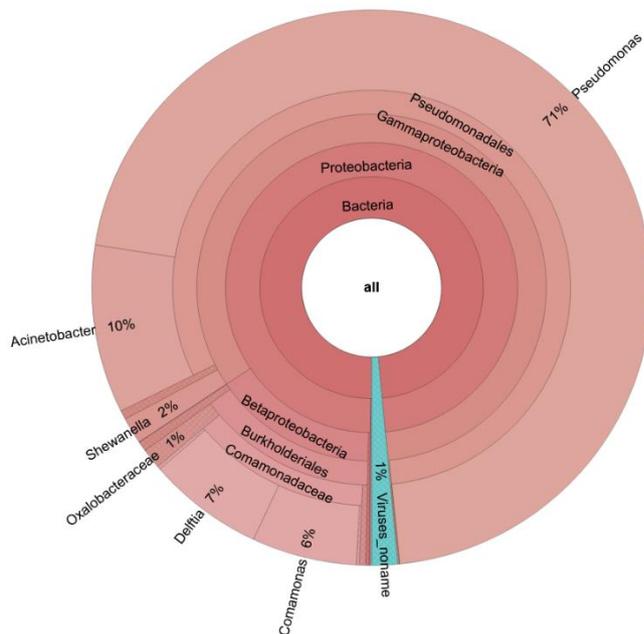


Abbildung 22: Populationszusammensetzung und Auswirkungen des Wiederverkeimungspotentials 72h nach einer Ozonbehandlung (1g Ozon/ g DOC) mittels einer Metagenomanalyse.

## 7.10. Auftreten von ARB und ARGs in abwasserbeeinflussten aquatischen Systemen im urbanen Siedlungsgebiet

Tabelle 25: Auswertung der molekularbiologischen Untersuchungen im urban geprägten Siedlungsgebiet. Dargestellt sind alle untersuchten Parameter.

	Oberflächengewässer	See	oberhalb KLA	unterhalb KLA	KLA
<i>Eubacteria (16S rDNA)</i>	1,58E+08	2,51E+08	5,16E+08	1,27E+09	1,76E+09
<i>E. coli (yccT)</i>	1,47E+04	2,68E+01	4,50E+03	6,76E+04	1,72E+05
<i>P. aeruginosa (ecfX)</i>	3,71E+02	n.d.	2,62E+02	3,03E+02	2,38E+03
<i>K. pneumoniae (gltA)</i>	7,74E+03	n.d.	1,93E+03	4,25E+04	9,23E+04
<i>A. baumannii (secE)</i>	4,37E+03	2,86E+02	3,50E+03	1,48E+03	3,51E+03
<i>Enterokokken (23S rDNA)</i>	1,94E+04	3,73E+03	3,32E+03	8,37E+03	2,39E+04
<i>E. faecalis (ddl)</i>	2,93E+02	n.d.	5,10E+01	n.d.	3,99E+01
<i>Integrase 1 (intl1)</i>	9,94E+05	8,04E+04	2,75E+06	7,61E+06	9,47E+06
<b>Erythromycin Resistenz (<i>ermB</i>)</b>	1,97E+04	2,55E+01	1,19E+04	7,06E+04	2,47E+05
<b>Tetracyclin Resistenz (<i>tetM</i>)</b>	2,37E+04	1,03E+02	5,56E+04	2,31E+05	2,55E+05
<b>Sulfonamid Resistenz (<i>sul1</i>)</b>	7,70E+05	1,43E+04	1,31E+06	1,24E+07	4,65E+07
<b>β-Laktam Resistenz (<i>TEM</i>)</b>	8,06E+04	5,73E+04	1,06E+05	5,81E+05	1,78E+06
<b>β-Laktam Resistenz (<i>CMY-2</i>)</b>	4,74E+02	1,75E+02	6,43E+02	1,67E+03	4,35E+03
<b>β-Laktam Resistenz (<i>ctx-M</i>)</b>	3,57E+02	3,40E+02	2,11E+02	1,47E+03	3,51E+03
<b>β-Laktam Resistenz (<i>ctx-M32</i>)</b>	3,09E+03	n.d.	1,98E+03	1,40E+04	4,45E+04
<b>β-Laktam Resistenz (<i>OXA-48</i>)</b>	5,64E+02	8,53E+02	2,07E+03	5,31E+03	5,75E+03
<b>β-Laktam Resistenz (<i>mecA</i>)</b>	1,90E+02	n.d.	2,49E+01	n.d.	4,04E+02
<b>β-Laktam Resistenz (<i>NDM-1</i>)</b>	n.d.	n.d.	1,86E+02	3,89E+02	3,54E+02
<b>β-Laktam Resistenz (<i>VIM2</i>)</b>	2,40E+01	n.d.	n.d.	3,05E+02	1,98E+03
<b>β-Laktam Resistenz (<i>KPC-3</i>)</b>	n.d.	n.d.	n.d.	1,13E+03	1,41E+03
<b>Vancomycin Resistenz (<i>vanA</i>)</b>	n.d.	6,12E+00	n.d.	4,27E+01	2,57E+01
<b>Colistin Resistenz (<i>mcr-1</i>)</b>	n.d.	n.d.	1,22E+02	3,66E+02	1,23E+03

## 7.11. Auftreten von ARB und ARGs in abwasserbeeinflussten aquatischen Systemen im ländlichen Siedlungsgebiet

Tabelle 26: Auswertung der molekularbiologischen Untersuchungen im ländlich geprägten Siedlungsgebiet. Dargestellt sind alle untersuchten Parameter.

	unterhalb KLA	Oberflächengewässer	See	KLA
<i>Eubacteria (16S rDNA)</i>	6,23E+08	1,85E+08	1,59E+08	2,80E+08
<i>E. coli (yccT)</i>	8,80E+03	6,30E+02	2,39E+02	9,27E+03
<i>P. aeruginosa (ecfX)</i>	8,57E+01	1,93E+02	n.d.	n.d.
<i>K. pneumoniae (gltA)</i>	9,52E+02	n.d.	n.d.	6,54E+02
<i>A. baumannii (secE)</i>	4,15E+02	2,13E+02	n.d.	n.d.
<i>Enterokokken (23S rDNA)</i>	4,27E+03	4,34E+02	n.d.	6,95E+02
<i>E. faecalis (ddl)</i>	2,10E+01	3,87E+01	n.d.	n.d.
<b>Integrase 1 (<i>intl1</i>)</b>	5,98E+05	2,71E+05	3,62E+04	4,53E+05
<b>Erythromycin Resistenz (<i>ermB</i>)</b>	9,11E+03	8,72E+01	n.d.	1,15E+04
<b>Tetracyclin Resistenz (<i>tetM</i>)</b>	2,25E+04	1,29E+03	6,15E+01	2,75E+04
<b>Sulfonamid Resistenz (<i>sul1</i>)</b>	4,36E+06	3,51E+05	5,20E+04	5,09E+06
<b>β-Laktam Resistenz (<i>TEM</i>)</b>	1,78E+05	1,33E+05	1,21E+05	2,11E+05
<b>β-Laktam Resistenz (<i>CMY-2</i>)</b>	9,46E+02	2,70E+02	2,70E+02	1,21E+03
<b>β-Laktam Resistenz (<i>ctx-M</i>)</b>	1,88E+02	9,74E+01	1,84E+02	1,67E+02
<b>β-Laktam Resistenz (<i>ctx-M32</i>)</b>	1,13E+03	8,47E+02	5,89E+01	1,11E+03
<b>β-Laktam Resistenz (<i>OXA-48</i>)</b>	3,99E+03	6,96E+02	1,42E+03	4,76E+03
<b>β-Laktam Resistenz (<i>mecA</i>)</b>	5,96E+01	n.d.	7,43E+01	n.d.
<b>β-Laktam Resistenz (<i>NDM-1</i>)</b>	n.d.	4,52E+01	n.d.	n.d.
<b>β-Laktam Resistenz (<i>VIM2</i>)</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>β-Laktam Resistenz (<i>KPC-3</i>)</b>	5,72E+01	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Vancomycin Resistenz (<i>vanA</i>)</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Colistin Resistenz (<i>mcr-1</i>)</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 27: Belastungssituation während des Klärprozesses und Erfassung des Wiederverkeimungspotentials anhand Kultur-basierter Nachweismethoden. Die KBE/ 100 mL Bereiche wurden in folgende Kategorien eingeteilt: + von 0-10<sup>2</sup> KBE/ 100 mL, ++ von 10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup> KBE/ 100 mL, +++ von 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> KBE/ 100 mL und ++++von 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> KBE/ 100 mL.

	Coliforme	Enterokokken	Pseudomonaden
<b>Ablauf mechanische Reinigung</b>	++++	+++	n.d.
<b>Nachklärbecken</b>	+++	++	+++
<b>Ozonung</b>	+	+	+
<b>Nachklärbecken nach 72h Inkubation</b>	+++	+	+++
<b>Ozonung nach 72h Inkubation</b>	++	+	+++

## 7.12. Kultur-basierte Untersuchungen des Kläranlageneinflusses im urbanen Siedlungsgebiet

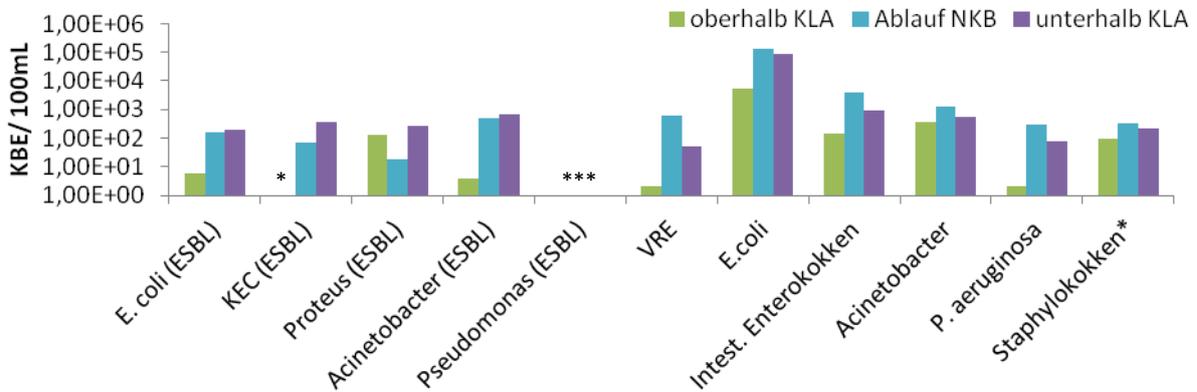


Abbildung 23: Mikrobiologischen Untersuchungen im Bereich der urban geprägten Kläranlage. Dargestellt sind die unterschiedlichen identifizierbaren Bakterien auf den ESBL-Selektivplatten, gefolgt von Vancomycin resistenten Enterokokken (VRE). Anschließend sind die weiteren untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien, welche mittels spezifischen Agarplattensystemen für die entsprechenden Bakterien detektiert wurden, dargestellt. Staphylokokken\* wurden auf einem MRSA-Plattensystem kultiviert. Der Einfluss der Kläranlage wird deutlich. In grün ist die Probenahmestelle oberhalb der Kläranlage dargestellt, in blau der Ablauf der Kläranlage selbst und in lila die Messstelle unterhalb der Kläranlage. Mit „\*“ gekennzeichnete Gene konnten in an der Untersuchungsstelle nicht detektiert werden.

## 7.13. Kultur-basierte Untersuchungen des Kläranlageneinflusses im ländlich geprägten Siedlungsgebiet

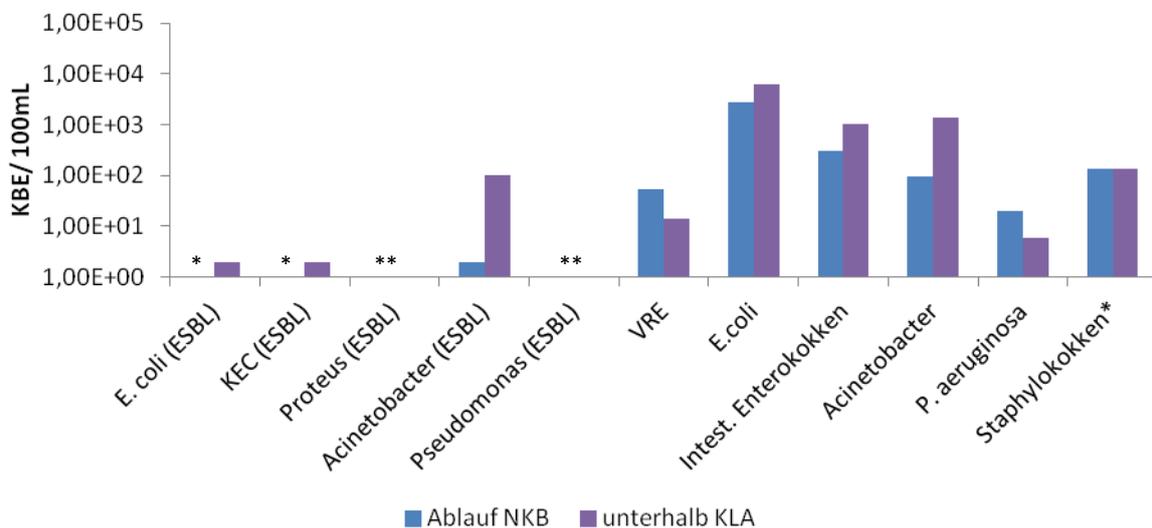


Abbildung 24: Mikrobiologischen Untersuchungen im Bereich der ländlich geprägten Kläranlage. Dargestellt sind die unterschiedlichen identifizierbaren Bakterien auf den ESBL-Selektivplatten, gefolgt von Vancomycin resistenten Enterokokken (VRE). Anschließend sind die weiteren untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien, welche mittels spezifischen Agarplattensystemen für die entsprechenden Bakterien detektiert wurden, dargestellt. Staphylokokken\* wurden auf einem MRSA-Plattensystem kultiviert. In dieser Abbildung ist der Einfluss der Kläranlage auf das aufnehmende Gewässer gezeigt. In blau ist der Ablauf der Kläranlage selbst dargestellt und in lila die Messstelle unterhalb der Kläranlage. Mit „\*“ gekennzeichnete Gene konnten in an der Untersuchungsstelle nicht detektiert werden.

