

# **Nachweis von Antibiotikaresistenzen in Rohwässern und Elimination durch Aufbereitungsverfahren**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

**DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN**

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

genehmigte

**DISSERTATION**

von

Lara Stelmaszyk

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2022

Erstgutachter: Prof. Dr. Harald Horn

Zweitgutachter: Prof. Dr. Johannes Gescher



## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	i
FINANZIELLE FÖRDERUNG.....	iv
DANKSAGUNG.....	v
ZUSAMMENFASSUNG.....	vi
ABSTRACT.....	vii
TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	viii
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	x
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt.....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Antibiotikaklassen und deren Wirkmechanismen.....	2
2.1.2 Resistenzmechanismen.....	4
2.1.3 $\beta$ -Laktam-resistente Bakterien.....	5
<b>2.2 Verbreitung und Übertragung von Antibiotikaresistenzen.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Nachweis von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt.....</b>	<b>10</b>
2.3.1 Molekularbiologische Nachweisverfahren.....	11
2.3.2 Kulturbasierte Nachweisverfahren.....	13
<b>2.4 Trinkwasseraufbereitung.....</b>	<b>14</b>
2.4.1 Reaktive Verfahren.....	15
2.4.2 Membranfiltration.....	16
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Verwendete Materialien, Medien und Chemikalien.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Beprobung von Rohwasser und Sedimenten.....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Feld-Probenahme-Kampagnen.....	21
3.2.1.1 <i>Beprobung von Rohwasser und Sediment-Kernen aus dem Tai See.....</i>	<i>21</i>
3.2.1.2 <i>Beprobung von Wasserwerken am Tai See und Pilot-Versuchen zur</i>	<i>24</i>
<i>Membranfiltration.....</i>	<i>24</i>
<b>3.3 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.3.1 DNA-Extraktion.....	25
3.3.1.1 <i>Aufkonzentrierung einer wässrigen Probe.....</i>	<i>25</i>
3.3.1.2 <i>Extraktion von genomischer DNA aus Umweltproben.....</i>	<i>26</i>
3.3.1.3 <i>Extraktion DNA aus Phagen und Viren.....</i>	<i>26</i>
3.3.2 Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	26
3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
3.3.3.1 <i>Qualitative PCR.....</i>	<i>26</i>
3.3.3.2 <i>Quantitative real-time PCR (qPCR).....</i>	<i>27</i>
3.3.3.3 <i>Gradienten PCR.....</i>	<i>28</i>
3.3.4 Automatisierte Kapillargelelektrophorese.....	29
3.3.5 <i>16S rDNA</i> Sequenzierung.....	29
<b>3.4 Mikrobiologische Methoden.....</b>	<b>29</b>
3.4.1 Membranfiltration.....	29
3.4.2 Kulturverfahren.....	29
3.4.2.1 <i>Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien auf chromogenem Vollmedium....</i>	<i>29</i>
3.4.2.2 <i>Mikrodilutionstest zum Nachweis einer enzymatisch vermittelten <math>\beta</math>-Laktam-</i>	<i>30</i>
<i>Resistenz.....</i>	<i>30</i>
3.4.3 Herstellung von kryogenen Lagerungskulturen.....	30
3.4.4 Durchflusszytometrie.....	31
<b>3.5 Matrix-gestützte Laser-Desorption Ionisierung mit Time-of-Flight-</b>	<b>31</b>
<b>Massenspektrometrie.....</b>	<b>31</b>
<b>3.6 Herstellung von Standards für die Quantifizierung von Genen.....</b>	<b>32</b>
3.6.1 Klonierung mit dem pGEM-T Vector System.....	33
3.6.2 Plasmid-Aufreinigung und -Linearisierung.....	33

<b>3.7</b>	<b>Etablierung neuer Methoden zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen</b> .....	<b>34</b>
3.7.1	Fraktions-basierte Untersuchungen in Wasser und Sediment-Partikeln.....	34
3.7.1.1	<i>Kaskadenfiltration zur Untersuchung von Sediment-Partikel-assoziierten Antibiotikaresistenzen</i> .....	34
3.7.1.2	<i>Fraktionierung von Phagen und freier DNA aus aquatischen Umweltproben</i> .....	35
3.7.2	Etablierung von kulturbasierten Verfahren zum Nachweis von antibiotikaresistenten Umweltbakterien.....	35
3.7.2.1	<i>Vorversuche zur Etablierung der Methode</i> .....	35
3.7.2.2	<i>Untersuchung von Oberflächenwasser Proben auf <math>\beta</math>-Laktam resistente Umweltbakterien</i> .....	39
3.7.3	Etablierung von Long-Amplikon (LA) qPCR Methoden zum Nachweis intakter Antibiotikaresistenzgene.....	40
3.7.3.1	<i>Primer-Design</i> .....	40
3.7.3.2	<i>Behandlungsexperimente zum Vergleich der Short und Long-Amplikon qPCR</i> ....	41
<b>3.8</b>	<b>Laborversuche zur Elimination von Resistenzgen-Fragmenten durch Layer-by-Layer beschichtete und unbeschichtete Ultrafiltrations-Membranen</b> .....	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in aquatischen Umweltproben</b> .....	<b>46</b>
4.1.1	Resistenzgen-Monitoring im Tai See, China.....	46
4.1.2	Resistenzgen-Monitoring in Oberflächengewässern in Deutschland.....	51
4.1.3	Fazit des Resistenzgen-Monitorings.....	52
<b>4.2</b>	<b>Etablierung neuer Verfahren zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt</b> .....	<b>53</b>
4.2.1	Fraktionierung von Umweltproben.....	53
4.2.1.1	<i>Vorversuche zur Etablierung der Methode</i> .....	53
4.2.1.2	<i>Fraktionierung von Rohwasserproben</i> .....	56
4.2.1.3	<i>Fazit der Methodenetablierung</i> .....	59
4.2.2	Kulturbasierte Verfahren zum Nachweis $\beta$ -Laktam-resistenter Umweltbakterien....	60
4.2.2.1	<i>Vorversuche zur Etablierung der Methode</i> .....	60
4.2.2.2	<i>Anwendung auf aquatischen Umweltproben</i> .....	65
4.2.2.3	<i>Identifikation der antibiotikaresistenten Umwelt-Isolate</i> .....	69
4.2.2.4	<i>Nachweis von enzymatisch vermittelten <math>\beta</math>-Laktam-Resistenzen durch den Micronaut S-Test</i> .....	73
4.2.2.5	<i>Fazit der Methodenetablierung</i> .....	75
4.2.3	Long-Amplikon qPCR.....	76
4.2.3.1	<i>Primer-Design</i> .....	76
4.2.3.2	<i>Methodenetablierung für ausgewählte ARG</i> .....	76
4.2.3.3	<i>Anwendung der Long-Amplikon qPCR für die Beurteilung der UV- und Chlorbehandlung sowie Ozonung</i> .....	80
4.2.3.4	<i>Fazit der Methodenetablierung</i> .....	86
<b>4.3</b>	<b>Elimination von Resistenzgenen</b> .....	<b>87</b>
4.3.1	Elimination von Antibiotikaresistenzgenen durch konventionelle Behandlungsverfahren.....	87
4.3.1.1	<i>Trinkwasseraufbereitung am Tai See</i> .....	87
4.3.1.2	<i>Trinkwasseraufbereitung in Deutschland</i> .....	92
4.3.2	Elimination von Antibiotikaresistenzgenen durch Dichte-Ultrafiltration.....	95
4.3.2.1	<i>Rückhalt und Cut-Off der unbeschichteten Membran</i> .....	96
4.3.2.2	<i>Rückhalt durch die beschichteten Membranen</i> .....	97
4.3.2.3	<i>Pilot-Versuche</i> .....	99
4.3.3	Fazit der Untersuchungen zur Elimination von Resistenzgenen.....	104
<b>5</b>	<b>FAZIT</b> .....	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>130</b>
8.1	<b>Materialen-, Medien- &amp; Chemikalien-Listen</b> .....	<b>130</b>
8.2	<b>Rohdaten der qPCR für das Monitoring von Resistenzgenen in der aquatischen Umwelt</b> .....	<b>133</b>
8.2.1	Daten des Tai See Resistenzgen-Monitorings.....	133

---

8.2.2	Daten des Monitorings von deutschen Oberflächenwässern .....	135
<b>8.3</b>	<b>Zusatzmaterial zur Fraktionierung von Wasserproben .....</b>	<b>136</b>
<b>8.4</b>	<b>Rohdaten der Kulturverfahren .....</b>	<b>136</b>
8.4.1	Vorversuche zur Etablierung von Kulturverfahren für den Nachweis resistenter Umweltbakterien .....	136
8.4.1.1	<i>Ausplattierung vs. Membranfiltration und Inkubation auf R2A-Medien .....</i>	<i>136</i>
8.4.1.2	<i>Wachstum von Umweltsolaten auf nährstoffreichem Medium .....</i>	<i>137</i>
8.4.2	Zusatzmaterial zur Anwendung der etablierten Kulturverfahren auf Umweltproben.....	139
<b>8.5</b>	<b>Rohdaten zur Long-Amplikon qPCR .....</b>	<b>154</b>
8.5.1	Gensequenzen für das Primer-Design .....	154
8.5.2	Rohdaten der Behandlungsexperimente zum Vergleich von LA und konventioneller qPCR .....	157
<b>8.6</b>	<b>Rohdaten zur Elimination von Antibiotikaresistenzgenen .....</b>	<b>158</b>
8.6.1	qPCR Rohdaten zur Trinkwasseraufbereitung am Tai See .....	158
8.6.2	qPCR Rohdaten zur Trinkwasseraufbereitung in Deutschland .....	159
8.6.3	Rohdaten der Labor-Experimente zum Antibiotikaresistenzgenen-Rückhalt durch Ultrafiltration und Dichte-Ultrafiltration.....	160
8.6.4	qPCR Rohdaten der Pilot-Kampagnen zum Rückhalt von Antibiotikaresistenzgenen mittels Dichte-Ultrafiltration .....	161
<b>9</b>	<b>BISHERIGE VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>163</b>

## FINANZIELLE FÖRDERUNG

Die verschiedenen Teilaspekte dieser Dissertation wurden im Rahmen zweier Forschungsprojekte bearbeitet. Hiermit möchte ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und dem Deutschen Verein des Gas- und Wasserfaches e. V. (DVGW) für die Förderung folgender Forschungsprojekte danken:

- **EVA:** Entwicklung von validen Verfahren zum Nachweis von Resistenzen, DVGW, Förderkennzeichen: W2018/30
- **SIGN-2:** Sino-German water supply Network - Clean water from the source to the tap, Fördermaßnahme: CLIENTII China, BMBF, Förderkennzeichen: 02 WCL 1471A

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harald Horn, der sich bereit erklärte, das Erstgutachten meiner Dissertation anzunehmen und während der gesamten Promotion stets engagiert und interessiert war und die Erstellung dieser Arbeit dank etlicher Ratschläge auf Basis seiner wissenschaftlichen Expertise ermöglichte.

Bei Prof. Dr. Andreas Tiehm möchte ich mich ebenso in besonderem Maße bedanken, da er mir ein interessantes und praxisbezogenes Thema zur selbstständigen Bearbeitung zu Verfügung stellte, und mich in der Bearbeitung durch Vorschläge und Anregungen mit wertvoller fachlicher Kompetenz und guten Anregungen stets unterstützte.

Bei Dr. Claudia Stange möchte ich mich ganz besonders für das Korrekturlesen sowie für die hervorragende und engagierte praktische und fachliche Betreuung, Unterstützung und Motivation bedanken. Ohne ihre Hilfe und ihr offenes Ohr bei allen Fragen zu jeder Zeit hätte ich diese Arbeit nicht anfertigen können.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Johannes Gescher bedanken, der sich als Zweitgutachter meiner Arbeit von Seiten der Universität zur Verfügung gestellt hat.

Außerdem gilt mein Dank allen Master-/ Bachelorstudenten und Hiwis der Abteilung für Wassermikrobiologie des TZW für die Hilfsbereitschaft in jeder Hinsicht. Generell gilt mein Dank von ganzem Herzen dem gesamten Team der Abteilung Wassermikrobiologie für die tolle Arbeitsatmosphäre, in der ich mich immer wohlfühlte und es nie an Spaß und Freude mangelte. Hier sind besonders Carolin Schweikart, die mich während meiner ganzen Promotion nicht nur im Labor, sondern auch beim Kaffeetrinken nie im Stich ließ und Carmen Kraffert, die mir auch in schwierigeren Zeiten mit Rat und Tat zur Seite stand, zu nennen. Ein so tolles Kollegium ist unbezahlbar!

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Arbeit und im gesamten Studium stets liebevoll unterstützt haben. Ich widme diese Arbeit meinem Papa, der leider nicht mehr erleben kann, wie ich meine Zeit als Doktorandin beende.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die aquatische Umwelt kann zur Entwicklung und Verbreitung von klinisch bedeutsamen Antibiotikaresistenzgenen (ARG) beitragen. Das Potenzial der aquatischen Umwelt als Reservoir für ARG in Gebieten, die anthropogen beeinflusst sind, wurde bereits in einigen Studien beschrieben. Die Zusammenhänge zwischen dem Erwerb von Resistenzen durch Umweltbakterien und der rapiden Entwicklung multiresistenter Keime im klinischen Bereich müssen jedoch noch detaillierter aufgeschlüsselt werden, um konkrete Übertragungswege erkennen zu können und so gezielt gegen die alarmierende Entwicklung vorzugehen. Dafür wurde zum einen ein Monitoring verschiedener Bereiche in der Umwelt, wie Oberflächenwässer und Sedimente, durchgeführt. Proben chinesischer und deutscher Trinkwasser-Reservoirs weisen ähnliche Muster von Resistenzgen-Vorkommen auf, was die globale Relevanz der aquatischen Umwelt als Quelle für Antibiotikaresistenzen unterstreicht. Um Risiken durch die Verbreitung von Resistenzen durch Umweltbakterien, freie DNA oder Phagen besser abwägen zu können, wurde eine Methode entwickelt, um ARG speziell in diesen Fraktionen nachzuweisen und diese als mögliche Distributoren für ARG zu identifizieren. Für erste Oberflächenwässer, die mit diesen Methoden untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass Resistenzen gegen Sulfonamide (*sul1* und *sul2*), sowie  $\beta$ -Laktame (*blaTEM*) eine Relevanz in Phagen und in frei vorliegender DNA aufweisen. Da sich mikro- und molekularbiologische Methoden stets ergänzen, wurde der Fokus sowohl auf Polymerasekettenreaktion (PCR)-basierte Methoden zum Nachweis von ARG, als auch auf kulturbasierte Verfahren zum Nachweis von Umwelt-relevanten antibiotikaresistenten Bakterien (ARB) aus Umweltproben gelegt. Durch diese auf R2A-Medien mit geringem Nährstoffgehalt basierenden Kulturverfahren konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Laktam-Resistenzen (gegen Cephalosporine der 3. Generation und die Reserveantibiotika-Gruppe der Carbapeneme) unter oligotrophen Umweltbakterien in deutschen Oberflächenwässern bereits weit verbreitet sind. Somit konnten die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung stützen, dass Umwelt-relevante Bakteriengattungen zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzen beitragen. Da für die Entwicklung neuer Strategien zur Vermeidung der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen meist die menschliche Gesundheit im Fokus liegt, ist auch die Elimination von ARG und ARB aus Oberflächenwässern ein entscheidender Schwerpunkt der aktuellen Forschung, um eine Gefährdung der Exposition durch Trinkwässer auszuschließen. Deshalb wurden auch im Rahmen dieser Arbeit Trinkwasseraufbereitungsanlagen beprobt und auf Antibiotikaresistenzen untersucht. Dabei standen Proben aus China und Deutschland zur Verfügung, durch die die Effizienz verschiedener Behandlungsverfahren hinsichtlich der Entfernung von Resistenzen evaluiert werden konnte. Hierbei konnten deutliche Unterschiede zwischen der ARG-Eliminationseffizienz deutscher und chinesischer Wasserwerke beobachtet werden, wobei ARG-Rückstände nach der Wasserbehandlung nur in den am Tai See (Nähe Shanghai) lokalisierten Wasserwerken feststellbar waren, was auf vergleichsweise höheren Einträgen von Abwässern aus Industrie, Agrarwirtschaft und urbanen Ballungsräumen zurückzuführen ist. Die Entwicklung und Anwendung quantitativer Long-Amplikon PCR Methoden zum Nachweis vollständiger Resistenzgene (darunter *sul1* und *blaTEM*) konnten die Reduktion der ARG durch reaktive Behandlungsverfahren wie Chlorung, UV-Bestrahlung und Ozonung hierbei besser abbilden als die konventionellen qPCR Methoden, mit denen eine Überschätzung der Genkopienzahl wahrscheinlich ist. Innovative Layer-by-Layer-Membrantechnologien konnten zudem auf den Rückhalt von ARG untersucht werden. Ihr Potential für die Anwendung in der Trinkwasseraufbereitung konnte sowohl im Labor- als auch im Pilotmaßstab bestätigt werden.

## ABSTRACT

The aquatic environment may contribute to the development and spread of clinically important antibiotic resistance genes (ARGs). The potential of the aquatic environment as a reservoir for ARGs in areas that are anthropogenically influenced has been described in several studies. However, the links between the acquisition of resistance by environmental bacteria and the rapid development of multidrug-resistant germs in the clinical setting need to be identified in more detail in order to detect specific transmission pathways and thus take targeted action against the alarming development. To this end, monitoring of various areas in the environment, such as surface waters and sediments, was carried out. Samples of Chinese and German drinking water reservoirs show similar patterns of resistance genes, which underlines a certain global relevance of the aquatic environment as a source of antibiotic resistance. To investigate the spread of resistance by environmental bacteria, free DNA, or phages, a method was developed to detect ARGs specifically in these fractions and identify them as potential distributors of ARGs. For initial surface waters analyzed using these methods, resistance to sulfonamides (*sul1* and *sul2*), and  $\beta$ -lactams (*blaTEM*) was shown to be relevant in phages and in free DNA. Since microbiological and molecular biological methods are complementary, the focus was on both polymerase chain reaction (PCR)-based methods for the detection of ARG, and culture-based methods for the detection of environmentally relevant antibiotic-resistant bacteria (ARBs) from environmental samples. These culturing methods based on R2A media with low nutrient content demonstrated that  $\beta$ -lactam resistance (to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins and the reserve antibiotic group of carbapenems) is already widespread among oligotrophic environmental bacteria in German surface waters. Thus, the results of this work could support the assumption that environmentally relevant bacterial genera contribute to the spread of antibiotic resistance. Since human health is usually the focus for the development of new strategies to prevent the spread of antibiotic resistance, the elimination of ARGs and ARBs from surface waters is also a crucial focus of current research in order to exclude exposure hazards from drinking waters. Therefore, drinking water treatment plants were also sampled and analyzed for antibiotic resistance as part of this work. Samples from China and Germany were available to evaluate the efficiency of different treatment processes with regard to the removal of resistances. Significant differences between the ARG elimination efficiency of German and Chinese waterworks were observed, with ARG residues after water treatment only detectable in the waterworks located at Lake Tai (near Shanghai), which can be attributed to comparatively higher inputs of wastewater from industry, agriculture and urban agglomerations. The development and application of quantitative long-amplicon PCR methods to detect complete resistance genes (including *sul1* and *blaTEM*) improved the mapping of the ARG-reduction by reactive treatment processes such as chlorination, UV irradiation, and ozonation, compared to conventional qPCR methods, which are likely to overestimate gene copy numbers. Innovative layer-by-layer membrane technologies could also be investigated for ARG retention. Their potential for application in drinking water treatment could be confirmed both in laboratory and pilot scale.

## TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Kategorisierung von Resistenzgenen in der aquatischen Umwelt.....	4
Tabelle 2-2 WHO-Liste für prioritäre Pathogene, für die neue Antibiotika benötigt werden .....	6
Tabelle 3-1 Wasserproben von deutschen Wasserversorgern.....	20
Tabelle 3-2 Wasser- und Sedimentproben der Probenahmekampagnen in China .....	23
Tabelle 3-3 Pilotkampagnen zur Membranfiltration .....	25
Tabelle 3-4 PCR-Reagenzien und Pipettier-Volumina .....	27
Tabelle 3-5 PCR-Bedingungen für die Kolonie-PCR.....	27
Tabelle 3-6 Primer und qPCR-Bedingungen der untersuchten Gene .....	28
Tabelle 3-7 qPCR-Reagenzien und Pipettier-Volumina .....	28
Tabelle 3-8 Modell-Komponenten und deren Konzentrationen für Vorversuche zur Kaskadenfiltration.....	35
Tabelle 3-9 Zusammensetzungen verschiedener in der Literatur beschriebener Kohlenstoff-reicher Medien .....	37
Tabelle 3-10 Zusammensetzungen verschiedener in der Literatur beschriebener Kohlenstoff-armen Medien.....	38
Tabelle 3-11 Inkubationsbedingungen für die Vorversuche zur Etablierung kulturbasierter Verfahren .....	39
Tabelle 3-12 Verwendete Genfragmente für Filtrationsexperimente .....	43
Tabelle 4-1 Über MALDI-TOF-MS auf den verschiedenen Medien identifizierte Isolate .....	64
Tabelle 4-2 Von Gensequenzen und –längen mit den laut Anhang 8.5.1 abgeleiteten Primerpaaren .....	76
Tabelle 4-3 Experimentell ermittelte qPCR-Bedingungen .....	77
Tabelle 4-4 Angezeigte Log-Stufen Reduktionen (C/C <sub>0</sub> ).....	83
Tabelle 8-1 Materialliste .....	130
Tabelle 8-2 Chemikalienliste .....	130
Tabelle 8-3 Geräteliste .....	131
Tabelle 8-4 Flüssigmedien .....	132
Tabelle 8-5 Fertigmedien .....	132
Tabelle 8-6 qPCR-Ergebnisse des Tai See ARG-Monitorings .....	133
Tabelle 8-7 qPCR-Ergebnisse des ARG-Monitorings der Sedimente .....	134
Tabelle 8-8 qPCR-Ergebnisse des ARG-Monitorings der Oberflächenwässer aus Deutschland .....	135
Tabelle 8-9 KBE pro 0,1 mL Filtrationsvolumen der Vorversuche.....	137
Tabelle 8-10 Von MALDI-TOF-MS identifizierte Isolate während der Vorversuche.....	138
Tabelle 8-11 Ergebnisse der Kulturverfahren.....	139
Tabelle 8-12 Rohdaten der Kulturverfahren Auswertungen .....	140
Tabelle 8-13 Gensequenzen für das Design der LA Primer.....	154
Tabelle 8-14 Chlor-Messwerte, Kulturverfahren und PCR Long und Short Amplikon Ergebnisse .....	157
Tabelle 8-15 Kulturverfahren und PCR Long und Short Amplikon (LA und SA) Ergebnisse .....	158
Tabelle 8-16 Rohdaten der Wasserwerks-Proben aus China .....	158
Tabelle 8-17 Rohdaten der Trinkwasseraufbereitungs-Proben aus Deutschland .....	159
Tabelle 8-18 qPCR Messdaten des Filtrationsexperiments.....	160
Tabelle 8-19 Ergebnisse der Retentions-Berechnungen und des Siebkoeffizients .....	160
Tabelle 8-20 Vergleich der Summe aller Genkopien (absolut) in Feed, Retentat und Permeat .....	160
Tabelle 8-21 Genkopien nach Inkubationsexperiment .....	161
Tabelle 8-22 Rohdaten der Pilot-Kampagnen zum Rückhalt von ARG mittels Dichte-Ultrafiltration .....	161
Tabelle 8-23 Identifikation der gewachsenen Isolate vor und nach Membranfiltration .....	161

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Einführung der Antibiotikaklassen/-wirkstoffe und Resistenzentwicklung .....	2
Abbildung 2-2 Resistenzmechanismen von Bakterien .....	5
Abbildung 2-3 Ambler-Klassifizierung der $\beta$ -Laktamasen.....	6
Abbildung 2-4 Potentielle Eintrags- und Verbreitungswege von Antibiotika und Antibiotikaresistenzen .....	7
Abbildung 2-5 Relevante Prozesse des horizontalen Gentransfers (HGT) .....	8
Abbildung 2-6 Zusammenspiel von ARG mit unterschiedlichen Fraktionen im Wasser .....	9
Abbildung 2-7 Vergleich von kulturbasierten und PCR-basierten Verfahren.....	11
Abbildung 2-8 Vergleich des konventionellen, kurzen Zielbereichs der Short Amplikon (SA)-PCR mit dem längeren Bereich der Long Amplikon (LA) PCR .....	12
Abbildung 2-9 Mögliche Behandlungsverfahren in der Trinkwasseraufbereitung.....	15
Abbildung 2-10 Multibore® UF-Membran aus Polyethersulfon .....	17
Abbildung 3-1 Aufbereitung von Donauwasser in der Trinkwasseraufbereitung .....	21
Abbildung 3-2 Lokalisationen der Entnahmestellen am Tai See .....	22
Abbildung 3-3 Membran-Kapillar-Modul.....	25
Abbildung 3-4 Micronaut-S Test zum Nachweis von $\beta$ -Laktamasen .....	30
Abbildung 3-5 Einordnung der Massenspektren durch Score Value .....	32

Abbildung 3-6 Prinzip der Isolat-Identifizierung mit MALDI-TOF-MS .....	32
Abbildung 3-7 Ablauf zur Herstellung neuer Standards .....	32
Abbildung 3-8 Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien mit hygienischer Relevanz auf nährstoffreichen Selektivmedien mit Antibiotika .....	36
Abbildung 3-9 Richtwert für Kohlenstoff (C)-Konzentration .....	38
Abbildung 3-10 Nötige Schritte für die Etablierung neuer LA qPCR Methoden für die Detektion von Antibiotikaresistenzgenen .....	40
Abbildung 3-11 Kollimiertes Bestrahlungssystem zur Niederdruck-Bestrahlung von Proben bei 253,7 nm .....	42
Abbildung 3-12 Modul mit einer modifizierten Einzelfaserkapillare .....	43
Abbildung 3-13 Aufbau der Filtrations-Versuche mit Einzelfaser-Membranen .....	44
Abbildung 4-1 Antibiotikaresistenzgene in Tai See-Proben zu verschiedenen Jahreszeiten .....	48
Abbildung 4-2 Genkopien in der Tai See CF und Wul-Wasser/Sediment-Säule .....	49
Abbildung 4-3 Zeitliche Darstellung des <i>sul1</i> -Konzentrationsverlaufs .....	50
Abbildung 4-4 Genkopien pro mL Probe für untersuchte Oberflächenwasserproben aus Deutschland .....	51
Abbildung 4-5 Vorversuch zur Kaskadenfiltration .....	53
Abbildung 4-6 Aufkonzentrierung der Fraktion < 0,2 µm .....	54
Abbildung 4-7 Fraktionierung von Phagen ( <i>phiX</i> ) und eDNA .....	55
Abbildung 4-8 Kaskadenfiltrationen der beiden Alz-Proben (FRA1, FRA2) und anschließender DNase Verdau ..	58
Abbildung 4-9 Vorversuche zur Etablierung der R2A-basierten Kulturverfahren .....	60
Abbildung 4-10 Mittelwerte der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL für drei Oberflächenwässer .....	61
Abbildung 4-11 Kategorisierung der Umweltisolate nach ihrer Morphologie .....	61
Abbildung 4-12 Untersuchungen zum Einfluss des Proben-Verdünnungsfaktors .....	62
Abbildung 4-13 Mittelwerte der koloniebildende Einheiten pro mL für drei Oberflächenwässer .....	63
Abbildung 4-14 Entwickelte Methode für den Nachweis von oligotrophen β-Laktam-resistenten Bakterien .....	65
Abbildung 4-15 (A) Koloniebildende Einheiten (KBE) pro 100 mL Oberflächenwasser .....	67
Abbildung 4-16 Vergleich zwischen Kultur- und PCR-basierten Methoden .....	69
Abbildung 4-17 Mit MALDI-TOF-MS identifizierte Bakterienisolate .....	71
Abbildung 4-18 Mit MALDI-TOF-MS identifizierte Bakterienisolate .....	72
Abbildung 4-19 Positive β-Laktamase-Expression im Micronaut-S-Test .....	74
Abbildung 4-20 Kapillarelektrophorese der Test-PCRs .....	77
Abbildung 4-21 Standard- und Schmelzkurven der Standardfragmente .....	78
Abbildung 4-22 Kapillarelektrophorese und zugehörige Genkopien der qPCR .....	79
Abbildung 4-23 Konzentrationen der Long und Short Amplikon Genfragmente in <i>E. coli</i> und extrazellulär .....	81
Abbildung 4-24 Vergleich von <i>sul1</i> Short Amplikon (SA, 163 bp) und Long Amplikon (LA, 840 bp) .....	84
Abbildung 4-25 Vergleich von <i>blaTEM</i> Short Amplikon (SA, 112 bp) und Long Amplikon (LA, 861 bp) .....	85
Abbildung 4-26 ARG-Konzentrationen im Zulauf und Ablauf (Reinwasser) der Behandlungsstraße .....	88
Abbildung 4-27 Relative Abundanzen der Antibiotikaresistenzgene .....	90
Abbildung 4-28 Konzentrationen der Gene im Zulauf (Donauwasser) und nach Ozonung .....	93
Abbildung 4-29 Mittlere Log-Stufen-Reduktion (C/C <sub>0</sub> ) .....	93
Abbildung 4-30 Mittlere relative Abundanzen der Antibiotikaresistenzgene pro 16S .....	95
Abbildung 4-31 Reduktion der Genkopienzahl für die unbeschichtete Membran .....	96
Abbildung 4-32 (a) Der Siebkoeffizient S <sub>0</sub> , bezogen auf die getesteten Fragmentgrößen .....	97
Abbildung 4-33 Summe der absoluten Genkopien für alle getesteten Fragmente .....	98
Abbildung 4-34 Summe der absoluten Genkopien, quantifiziert im Überstand .....	99
Abbildung 4-35 Pilot-Anlage am Standort des Wasserwerks in Wujiang .....	100
Abbildung 4-36 Beprobung der mobilen Pilot-Anlage zur Filtration von Oberflächenwasser .....	101
Abbildung 4-37 KBE pro mL der Rohwasserprobe (Z, Alz) und der Filtrate (UF, DUF) .....	103
Abbildung 8-1 Genkopien in der Tai See NJ Wasser/Sediment-Säule .....	134
Abbildung 8-2 Summe der Genkopien (GC/ml) auf allen Filtern .....	136
Abbildung 8-3 Vergleich der Kolonien nach Ausplattierung einer Wasserprobe und Membranfiltration .....	136
Abbildung 8-4 Parallele Inkubation von auf R2A-Platten isolierten Kulturen auf R2A und DEV Medium .....	137
Abbildung 8-5 KBE, die auf den R2A-basierten Agarplatten mit der Stempel-Technik gewachsen sind .....	139

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Definition
AB	Antibiotika
AR	Antibiotikaresistenzen
ARB	antibiotikaresistente Bakterien
ARG	Antibiotikaresistenzgene
BAC	biologisch aktivierte Aktivkohle
BG	Bestimmungsgrenze
BL1	Antibiotikakombination aus Cefotaxim, Ceftazidim, Cefpodoxim
BL2	Antibiotikakombination aus Meropenem und Ceftazidim
bp	Basenpaare
CaR	Carbapenem-Resistenz
CeR	Cephalosporin-Resistenz
CF	Crabfarm/ ehemalige Krabbenzucht
CI	Chlorung
ChromESBL	Chromogener Nähragar zur Isolation ESBL-produzierender Enterobakterien
Da	[Dalton]
DEV	Nähragar vorgegeben vom Deutschen Einheitsverfahren
DL	Doublelayer (Doppelschicht)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
eDNA	extrazelluläre/ freie DNA
EL	Elution
ESBL	Extended Spectrum- $\beta$ -Laktamasen
Floc	Flockung
FS	Feststoffgehalt [mg/L]
FT	Durchfluss
FV	Filtrationsvolumen [mL]
GAC	Granulierte Aktivkohle
GC	Genkopien meist in [1/mL]
gDNA	genomische DNA
GERMAP	Zusammenstellung des Antibiotikaverbrauchs in Deutschland
GW	Grundwasser
GWA	Grundwasseranreicherung
HGT	Horizontaler Gentransfer
K	Koagulation
KBE	Koloniebildende Einheit meist in [1/mL]
LA	Long-Amplikon
LbL	Layer-by-Layer Beschichtung
Log	Log-Stufen (dekadisch)
MALDI-TOF-MS	Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisation- <i>time-of-flight</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	[Minuten]
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NF	Nanofiltration
NJ	NIGLAS Jetty Station (Messstation am Tai See)
NP	Natrium-Phosphatpuffer
O3	Ozonung
OW	Oberflächenwasser
Ox	Oxidation
PC	Polycarbonat

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Definition</b>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDADMAC	Polydiallyldimethylammonium Chlorid
PEG	Polyethylenglykol
Perm	Permeat
PES	Polyethersulfon
PFU	Plaque Forming Units
PSS	Poly-(4-styrenesulfonic acid)
qPCR	quantitative Real-Time PCR
R2A	Reasoner's 2A-Agar
rpm	[Umdrehungen pro Minute]
RW	Reinwasser
SA	Short Amplikon
SC	Suzhou City Wasserwerk
Sed	Sedimentation
SF	Sandfilter
SIP	Suzhou Industrial Park Wasserwerk
T&O	Taste & Odor Stoffe
Temp	Temperatur [°C]
TWA	Trinkwasseraufbereitung
TZW	Technologiezentrum Wasser
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolette Strahlung
VF	Verdünnungsfaktor
Vol	Volumen
VorR	Vorreinigung
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WHO	World Health Organization
Wu	Wujiang
Wul	Wujiang Wasserwerk Intake Area
WWU	Westfälische Wasser- und Umweltanalytik
Z	Zulauf
ZV LWV	Zweckverband Landeswasserversorgung Langenau

---



## 1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) sieht die rasante Entwicklung von antibiotikaresistenten Bakterien (ARB) als eine der größten Herausforderungen unserer Zeit (WHO 2019). Durch die Zunahme und Verbreitung von Resistenzen werden aktuell angewendete Antibiotika wirkungslos (Barancheshme und Munir 2017). O'Neill et al. (2014) vermuten, dass die Zahl der Todesfälle durch Infektionen mit resistenten Keimen anhand der aktuellen Entwicklungsrate bis zum Jahr 2050 bei 10 Millionen pro Jahr betragen könnte. Bisher wurde der Kampf gegen die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen (AR) hauptsächlich in klinischen, kommunalen und in den letzten Jahren auch in landwirtschaftlichen Einrichtungen, wo stetig ein hoher Antibiotika-Einsatz zu verzeichnen ist, geführt - mit dem Ziel, die Übertragung zu reduzieren und die Selektion resistenter Bakterien während der Antibiotikabehandlung zu verhindern. In den letzten Jahren wurde die Rolle der Umwelt als wichtiges Reservoir und zentraler Verbreitungsweg von Resistenzen zunehmend anerkannt (Ashbolt *et al.* 2013; Bengtsson-Palme 2018; Finley *et al.* 2013; Pruden *et al.* 2006), aber unser Verständnis ihres Beitrags ist immer noch begrenzt. Das fehlende Wissen darüber, wie und unter welchen Umständen die Umwelt die Resistenzentwicklung fördert, macht die Eindämmung der Entstehung und Verbreitung mobiler Resistenzfaktoren problematisch (Berendonk *et al.* 2015). Das größte Risiko für die menschliche Gesundheit ist der Erwerb von Multiresistenzen durch Krankheitserreger. Die ursprünglichen Quellen für AR im klinischen Bereich könnten jedoch die aquatische Umwelt und Böden sein, die durch Einträge von Antibiotika-Rückständen direkt beeinflusst werden. Man geht davon aus, dass die Evolution von Resistenzen in Umweltbakterien durch subinhibitorische AB-Konzentrationen beschleunigt wird und sich diese rasant in der Umwelt verbreiten. Die Beweise für kausale Zusammenhänge, die für die Bewertung aktueller und neu entstehender Gesundheitsrisiken aus Agrar-Ökosystemen erforderlich sind, stellen nach wie vor eine Wissenslücke dar (Durso und Cook 2018).

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis hinsichtlich der Rolle der Umwelt für die Verbreitung von AR zu erlangen. Als ausschlaggebend dafür wurde die Erweiterung der Datenbasis über ARG und ARB in der aquatischen Umwelt angesehen. In diesem Zuge wurde die Arbeit in drei große Teilbereiche gegliedert:

- 1) Untersuchungen von Umweltproben (PCR-basiertes ARG-Monitoring) sowohl in Deutschland (Oberflächenwässer) als auch in China (Oberflächenwässer und Sedimente), um den Ist-Zustand in verschiedenen Oberflächenwässern zu erfassen und die globale Bedeutung von Antibiotikaresistenzen zu verdeutlichen.
- 2) Etablierung von molekularbiologischen und erweiterten mikrobiologischen Methoden, um Resistenzen in spezifischen in der Umwelt vorkommenden und zum horizontalen Gentransfer befähigten Fraktionen wie Umweltbakterien, Phagen und freier DNA nachzuweisen, und damit ein detaillierteres Bild über mögliche Transferprozesse von ARG zu erhalten.
- 3) Untersuchung der Elimination von Resistenzen in der Trinkwasseraufbereitung (in Deutschland und China) und in kleinskaligen Versuchen, um die Effizienz von Wasserwerken hinsichtlich der Entfernung von AR zu erfassen und die Anwendbarkeit einer neuen Membran-Filtrations-Technologie im Labor- und Pilotmaßstab zu prüfen.

Zusammenfassend sollte die Arbeit durch Untersuchungen der aquatischen Umwelt mit bestehenden und neu etablierten Methoden zu einem besseren Verständnis der Rolle der Umwelt als Reservoir für AR beitragen und aufzeigen wie diese für die Nutzung von Wasser ohne Gesundheitsrisiken eliminiert werden können.

## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt

#### 2.1.1 Antibiotikaklassen und deren Wirkmechanismen

Der Einsatz von Antibiotika geht auf die zufällige Entdeckung der antibakteriellen Stoffe Anfang des 20. Jahrhunderts zurück. Im Laufe des sogenannten „goldenen Zeitalters der Antibiotika“ wurden immer mehr Wirkstoffe aus unterschiedlichsten chemischen Stoffklassen entdeckt (Silver 2011), die zur Bekämpfung bakterieller Infektionen zum Einsatz kommen. Die Einführung der verschiedenen Antibiotikaklassen, sowie der zeitliche Zusammenhang zwischen Einsatz der Antibiotika und Entwicklung von Antibiotikaresistenzen sind in Abbildung 2-1 gezeigt. Hierbei wird deutlich, dass über die Jahre seit der Ersteinführung von Antibiotika die Zeiträume zwischen Einführung eines neuen Wirkstoffes und Beschreibung resistenter Bakterien immer kürzer wurden. Dies liegt natürlich zum einen an den Analysemethoden, die sich im Laufe der letzten Jahrzehnte stark weiterentwickelt haben und gerade auf molekularbiologischer Ebene deutlich empfindlicher wurden. Durch die gezielte Suche nach Resistenzen in bakteriellen Erregern können immer mehr Positivbefunde ermittelt werden. Ein weiterer wichtiger Grund, der vermutlich zu dieser gezeigten Entwicklung beiträgt, ist der steigende Einsatz von Antibiotika und deren Eintrag in die Umwelt. Durch daraus resultierende subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen in vielen aquatischen Umwelt-Habitaten wird die Entwicklung von Resistenzen begünstigt. Neben der Ausbreitung in der Umwelt spielt natürlich die oft zu früh oder präventiv angeordnete Verabreichung von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin eine essentielle Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen. Vor allem bei Nicht-Einhaltung von Einnahmepausen können verbleibende Bakterien im Körper Resistenzen entwickeln und sich nach Abbruch der Einnahme wieder vermehren.

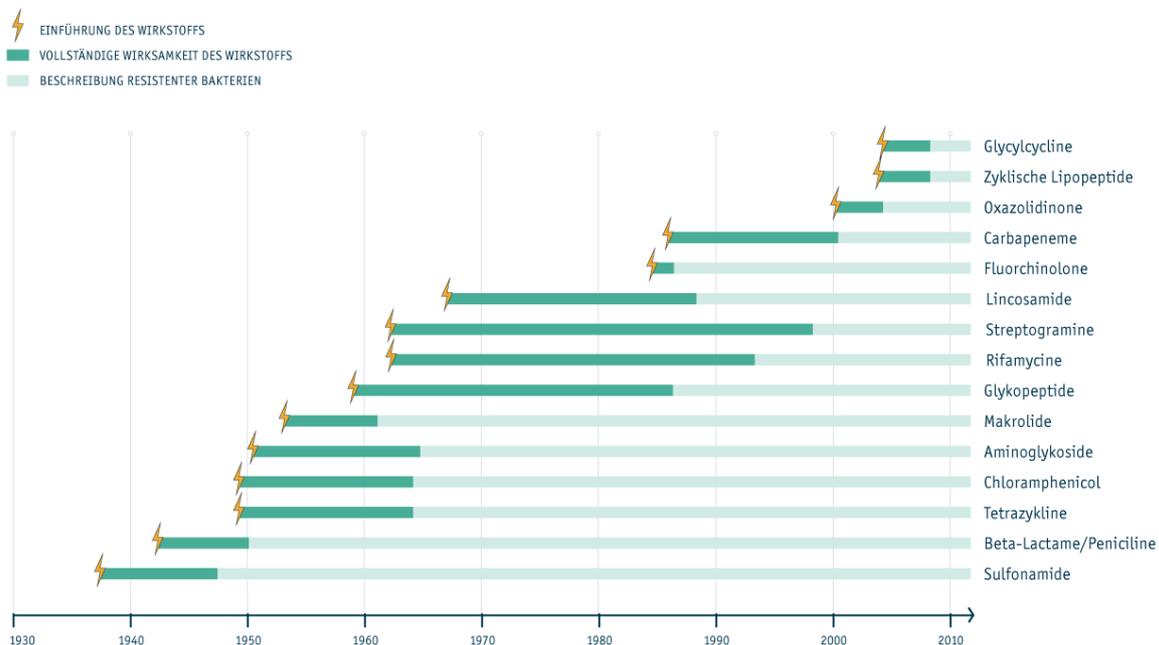


Abbildung 2-1 Einführung der Antibiotikaklassen/-wirkstoffe und Resistenzentwicklung (Lindgrün GmbH 2017; Silver 2011).

Es gibt viele Stoffgruppen, die mit ihren bisher entdeckten Vertretern als antibakterielle Wirkstoffe weltweit eingesetzt werden. Sie besitzen unterschiedliche Wirkungsweisen und finden in verschiedenen Bereichen Anwendung. Die Einführung neuer Antibiotikaklassen und -gruppen, sowie die Entdeckung neuer Substanzen aus den jeweiligen Klassen verdeutlichen den hohen Bedarf an antibiotisch wirksamen Substanzen weltweit. Die Anwendung von

Antibiotika, nicht nur therapeutisch im human- und veterinärmedizinischen Bereich, sondern auch präventiv in der landwirtschaftlichen Tierhaltung und Aquakultur, führt zu einer rapiden Entwicklung von Antibiotika-Resistenzmechanismen. Deshalb wird stetig weiter an neuen antimikrobiellen Substanzen geforscht, um bereits etablierte Resistenzmechanismen zu umgehen. China ist dabei einer der größten Produzenten von Antibiotika weltweit. So werden 210.000 Tonnen jährlich produziert und ca. 180.000 Tonnen im Human- und veterinärmedizinischen Bereich, sowie in der Landwirtschaft eingesetzt (zitiert in Qin *et al.* 2018).

Studien wie die von O'Neill (2014) beschreiben eine Anzahl von 700.000 Toten pro Jahr, die auf tödliche Infektionen mit antibiotikaresistenten Erregern zurückzuführen sind. Es wird extrapoliert, dass diese Zahl mit der fortführenden Verabreichung der aktuell eingesetzten Antibiotika-Mengen bereits im Jahr 2050 auf etwa 10.000.000 Tote pro Jahr ansteigen könnte. Demnach muss nicht nur an alternativen antibiotisch wirksamen Substanzen geforscht werden, die dann schnell wieder zur Entwicklung neuer Resistenzmechanismen führen würden, sondern die Art und das Ausmaß der Applikation von Antibiotika in Krankenhäusern, privaten Haushalten sowie in der Landwirtschaft grundlegend verändert werden. Abbildung 2-1 veranschaulicht, dass selbst für die „neuesten“ antimikrobiell wirksamen Stoffgruppen bereits Resistenzgene nachgewiesen werden konnten. Ein Grund für die stetig schneller werdende Entwicklung von Resistenzen ist die wachsende Bevölkerungszahl auf der Erde, die aufgrund der höheren Menschendichte zu einer direkt höheren Infektionszahl und somit eine erhöhte Verabreichung von Antibiotika fordert, zum anderen jedoch auch den Nahrungsmittelbedarf steigert, wodurch die oft präventive Zugabe von Antibiotika zu Futtermitteln in der wachsenden Massentierhaltung ansteigt (Durso und Cook 2018; Shao *et al.* 2021). Einige Antibiotika werden bereits zurückgehalten, um als Reserve in besonders schwer behandelbaren Fällen zur Verfügung zu stehen. Diese „kritischen“ oder „Reserve“-Antibiotika sollen, laut WHO, nur verabreicht werden wenn (1) nur eingeschränkt Alternativen für eine bestimmte Behandlung verfügbar sind und (2) wenn die Infektion von Bakterien verursacht wird, die nicht aus humanen Quellen stammen (Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen 2019). Beispiele für Reserveantibiotika sind beispielsweise Cephalosporine der 3. und 4. Generation, Carbapeneme (aus der Klasse der  $\beta$ -Laktame) und Colistin (aus der Klasse der Polymyxine) (Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen 2019; GERMAP 2015). Dennoch werden diese Antibiotika in vielen Ländern in der Tierzucht als Futtermittelzusatz oder präventiv in der Veterinärmedizin verabreicht (He *et al.* 2020). Durch Einträge aus verschiedensten Quellen, darunter Human- und Tiermedizinische Einrichtungen, kommunale Kläranlagen, Industrie und Tierzucht gelangen können Rückstände von Antibiotika und ARG in die aquatische Umwelt. ARG sind dort mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)-Techniken sehr sensitiv nachweisbar. Anhand eines Ab-, Oberflächen- und Grundwasser-Monitorings in großem Umfang wurden ARG anhand ihres prozentualen Positivbefundes in den untersuchten Proben in drei Kategorien, „häufig“, „intermediär“ und „selten“ eingestuft (Schwartz und Schmithausen 2020). Diese Kategorisierung wurde zwar für Gewässer in Deutschland erstellt, ist erfahrungsgemäß jedoch mit Abweichungen gut auf das globale Aufkommen von ARG in der aquatischen Umwelt übertragbar. In Tabelle 2-1 sind die relevantesten ARG gelistet.

Tabelle 2-1 Kategorisierung von Resistenzgenen in der aquatischen Umwelt nach Schwartz und Schmithausen (2020).

Kategorie	Gen	Beschreibung
häufig	<i>blaTEM</i>	Vorläufer für Enzyme mit ESBL-Wirksamkeit, Resistenz gegen Ampicillin
	<i>sul1</i>	Resistenz gegen Sulfonamide
	<i>sul2</i>	Resistenz gegen Sulfonamide
	<i>ermB</i>	Resistenz gegen Makrolide wie Erythromycin
	<i>tetM</i>	Resistenz gegen Tetracyclin (machen ¼ aller verschriebenen Veterinärantibiotika aus)
intermediär	<i>blaCMY-2</i>	Resistenz gegen Cephalosporine
	<i>blaCTX-M-32</i>	Resistenz gegen Cephalosporine, häufigster Typ bei ESBL-produzierenden Bakterien
	<i>blaOXA-48</i>	Resistenz gegen Cephalosporine und Carbapeneme (Reserveantibiotika)
selten	<i>mecA</i>	MRSA assoziierte Antibiotikaresistenz, Methicilin Resistenz
	<i>mcr-1</i>	Resistenz gegen Colistin/Polymyxin (Reserveantibiotikum)
	<i>blaNDM-1</i>	Resistenz gegen Cephalosporine und Carbapeneme (Reserveantibiotika), ESBL
	<i>blaVIM-2</i>	Resistenz gegen Cephalosporine und Carbapeneme (Reserveantibiotika)
	<i>blaKPC-3</i>	Resistenz gegen Cephalosporine und Carbapeneme (Reserveantibiotika)
	<i>vanA</i>	Resistenz gegen Vancomycin (Reserveantibiotikum)

### 2.1.2 Resistenzmechanismen

Die Resistenz von Bakterien gegen antibiotische Wirkstoffe kann durch verschiedene Eigenschaften der Zelle verursacht sein. Grundsätzlich kann zwischen einer primären bzw. natürlichen Resistenz und einer erworbenen unterschieden werden. Man spricht zum Beispiel von einer primären oder natürlichen Resistenz, wenn Angriffspunkte für das Antibiotikum fehlen und die Lebensfähigkeit der bakteriellen Zelle somit schlicht nicht beeinflusst wird. Zum Beispiel könnte die Zellwand einige Bakterien vor Antibiotika schützen, da die Lipidproduktion zur Stabilisierung der Zellwand in Gegenwart von  $\beta$ -Laktamen hochreguliert werden kann (Do *et al.* 2020). Zum anderen produzieren einige Bakterien, vor allem diese, die sich gegen andere Umwelteinflüsse schützen müssen, extrazelluläre Matrices. Auch diese können unspezifische Resistenzen verleihen, indem sie das Antibiotikum von den Bakterien fernhalten (Antão *et al.* 2018; McLandsborough *et al.* 2006). Von einer erworbenen Resistenz spricht man, wenn ein Bakterium zuvor sensitiv gegenüber einem Wirkstoff war und erst durch den Erwerb eines speziellen Gens oder eine chromosomale Mutation resistent wird. Dieser Erwerb einer Resistenz führt in der Regel zu einem deutlichen Fitnessvorteil für das Empfängerbakterium (Wright 2007). Wie in Abbildung 2-2 dargestellt, können Resistenzen gegen verschiedene Wirkstoffe und Antibiotikaklassen durch unterschiedliche molekulare Prozesse begründet sein. Die Produktion von spezifischen Effluxpumpen kann bewirken, dass in die Zelle eingedrungene Antibiotika wieder aktiv aus der Zelle geschleust werden. Verschiedene Effluxpumpen mit unterschiedlichsten Zielmolekülen, darunter  $\beta$ -Laktame, Fluoroquinolone oder Tetrazykline, konnten in *S. aureus* Stämmen bereits identifiziert werden, was dem klinisch relevanten Keime multiple Resistenzen verleihen kann (Pantosti *et al.* 2007). Viele Bakterien mit erworbener Resistenz exprimieren bei Antibiotika-Exposition auch Enzyme, die diese strukturell verändern und inaktivieren und somit unschädlich machen. Wichtige Vertreter sind  $\beta$ -Laktamasen, die den  $\beta$ -Laktamring des Wirkstoffes spalten und dabei häufig ein erweitertes Wirkspektrum aufweisen. Zudem existieren Mechanismen, die bei Kontakt mit einem Antibiotikum mit der Aktivierung eines Alternativmetabolismus reagieren, und das Bakterium die Stoffwechsel-inhibierende Wirkung der Substanz somit umgehen kann. Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die Modifikation einer zellulären Zielstruktur, an die das Antibiotikum normalerweise binden würde.

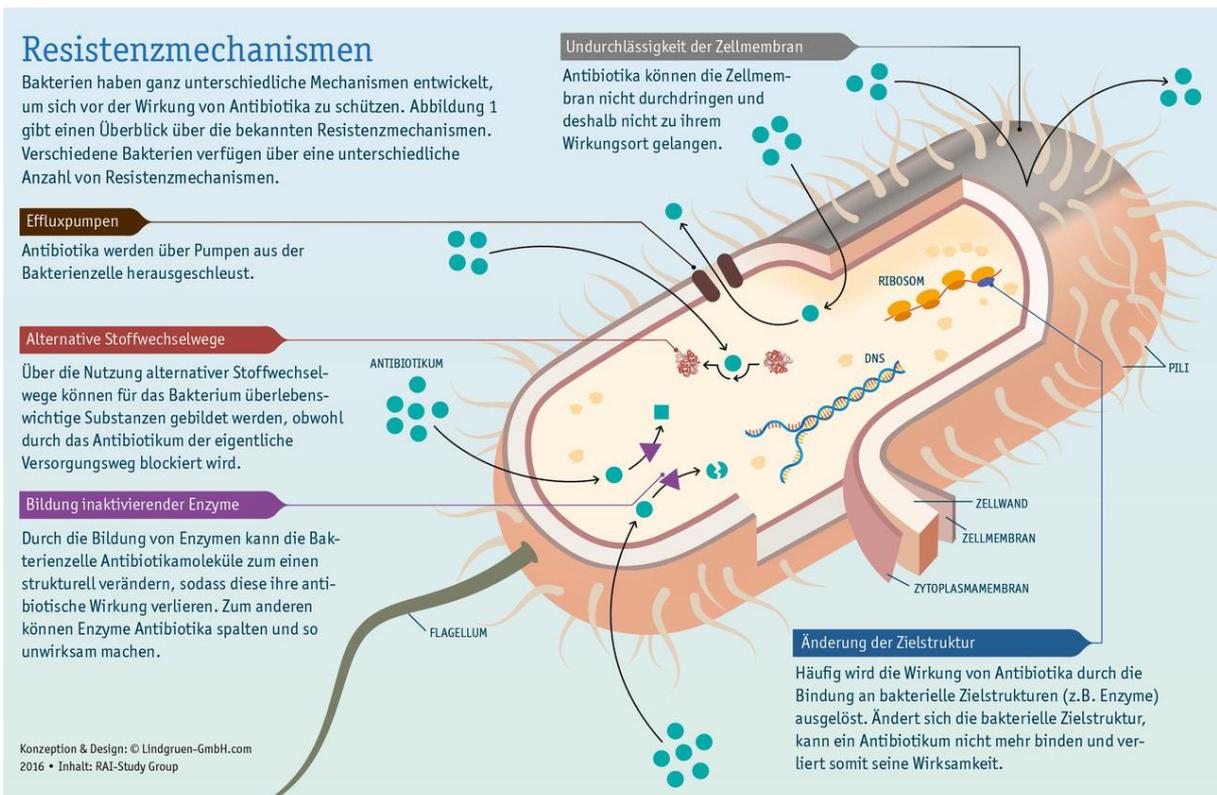


Abbildung 2-2 Resistenzmechanismen von Bakterien. Modifiziert nach Antão *et al.* (2018).

### 2.1.3 $\beta$ -Laktam-resistente Bakterien

$\beta$ -Laktam-resistente Bakterien besitzen die Fähigkeit  $\beta$ -Laktame (darunter Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme) enzymatisch zu spalten, indem der für diese Substanzen charakteristische  $\beta$ -Laktam-Ring hydrolysiert wird. Seit der Entdeckung und medizinischen Nutzung von Antibiotika wurden zunehmend neue Subtypen von sogenannten  $\beta$ -Laktamasen identifiziert. Seit den 1990er Jahren wurde ein rapider Anstieg identifizierter Enzyme verzeichnet (Davies und Davies 2010). Eine der zum derzeitigen Stand des Wissens relevantesten Gruppe an resistenten Bakterien stellen *Extendend-Spectrum- $\beta$ -Laktamase* (ESBL) produzierende gram-negative Enterobakterien dar. Die WHO veröffentlichte 2017 eine Prioritätenliste, die die kritischsten Organismen im klinischen Bereich zusammenfasst (Tabelle 2-2). Aus der Kategorie „kritisch“ mit höchster Priorität weisen alle der klinisch relevanten Bakterien eine Carbapenem- und/oder Cephalosporin-Resistenz auf, sind also resistent gegen bestimmte Gruppen der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika.

Tabelle 2-2 WHO-Liste für prioritäre Pathogene, für die neue Antibiotika benötigt werden (WHO 2017).

Bakterien	Antibiotikaresistenz
<b>Prioritätsklasse 1: Kritisch</b>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem (β-Laktam)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenem (β-Laktam)
<i>Enterobacteriaceae*</i>	Carbapenem, 3. Generation Cephalosporin (β-Laktam)
<b>Prioritätsklasse 2: Hoch</b>	
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomycin
<i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin, Vancomycin-Intermediat
<i>Helicobacter pylori</i>	Clarithromycin
<i>Campylobacter spp.</i>	Fluoroquinolon
<i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolon
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolon, Cephalosporin
<b>Prioritätsklasse 3: Medium</b>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicillin-Unempfindlichkeit
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicillin
<i>Shigella spp.</i>	Fluoroquinolon

\*Enterobacteriaceae beinhalten: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Preotus spp.*, *Providencia spp.* und *Morganella spp.*

Je nach Art der Hydrolyse von β-Laktam-Antibiotika, werden die Laktamasen in vier verschiedene Klassen (Ambler-Klassifizierung) unterteilt. In Klasse A, C und D findet man bei dieser Klassifizierung die Serin-β-Laktamasen. Diese besitzen in ihrem aktiven Zentrum einen Serinrest und können somit durch Clavulan-Säure gehemmt werden. Alle Enzyme aus diesen Klassen werden als ESBL eingestuft, da sie das für ESBL typische erweiterte Wirkungsspektrum gegen eine Vielzahl von β-Laktam-Antibiotika aufweisen. Wichtige Vertreter der Serin-ESBL sind TEM, CTX-M, OXA-11 und AmpC. Carbapenemasen wie OXA-48 und KPC findet man in den Ambler-Klassen A und D. Neben Serin β-Laktamasen gibt es auch Metallo β-Laktamasen (Ambler-Klasse B), die durch Histidin komplexierte zweiwertige Metallionen (Zn<sup>2+</sup>) im aktiven Zentrum charakterisiert sind. Diese Enzyme können durch Komplexbildungs-Reagenzien wie EDTA inhibiert werden, da diese dem Enzym die zweiwertigen Ionen entziehen.

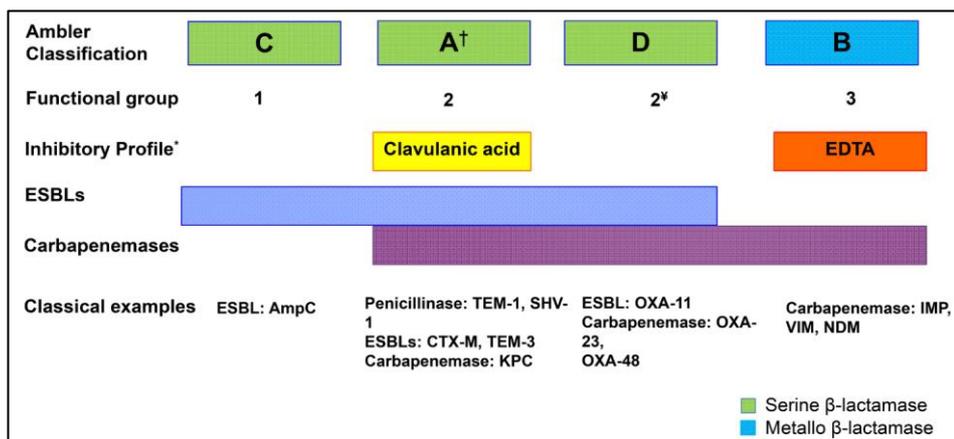


Abbildung 2-3 Ambler-Klassifizierung der β-Laktamasen (Munita und Arias 2016).

Bis heute wurden mehr als 1000 verschiedene β-Laktamasen beschrieben ([card.mcmaster.ca/ontology/36326](http://card.mcmaster.ca/ontology/36326) & [card.mcmaster.ca/ontology/36342](http://card.mcmaster.ca/ontology/36342)). Wahrscheinlich werden im Rahmen des normalen Prozesses der bakteriellen Evolution noch viele weitere entdeckt (Munita und Arias 2016). Auch der laut dem Bericht GERMAP (2015) zufolge hohe Anteil von verabreichten β-Laktamen in Krankenhäusern und in der Tierhaltung trägt zur Weiterentwicklung dieser Resistenzen bei. Neben den von der WHO definierten kritischen

pathogenen Stämmen werden  $\beta$ -Laktam-Resistenzen auch in der Umwelt bzw. unter oligotrophen Bakterien zunehmend relevanter (Mills und Lee 2019).

## 2.2 Verbreitung und Übertragung von Antibiotikaresistenzen

Antibiotika werden überall da in die Umwelt eingetragen, wo sie verabreicht werden. Krankenhäuser, tiermedizinische Einrichtungen sowie Tierzuchtbetriebe werden als höchst relevante Eintragsquellen eingestuft. Vor allem in der Tierhaltung findet durch die Verabreichung von Antibiotika eine Entwicklung von Antibiotikaresistenzen statt. Die resistenten Bakterien und Antibiotikarückstände werden durch Ausbringung von Gülle und dem Abwasser der Betriebe in die Umwelt eingetragen (Li *et al.* 2020; Stange und Tiehm 2020; Voigt *et al.* 2020b). Die freigesetzten Antibiotika können auf in der Umwelt vorkommende Mikroorganismen aufgrund ihrer meist subinhibitorischen Konzentrationen einen Selektionsdruck ausüben, der zur beschleunigten Entwicklung von Resistenzgenen führt (Jutkina *et al.* 2016; Wintersdorff *et al.* 2016). Die möglichen Wege der Transmission von ARB sind in Abbildung 2-4 dargestellt. Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass ARB oder ARG an nahezu jedem Ort auf der Erde identifiziert werden können. Sogar in pristinen Habitaten konnten Resistenzgene detektiert werden, die aufgrund der geringen Besiedlung des Landes nicht auf einen direkten Eintrag zurückzuführen sind (Hooban *et al.* 2020; Perron *et al.* 2015).

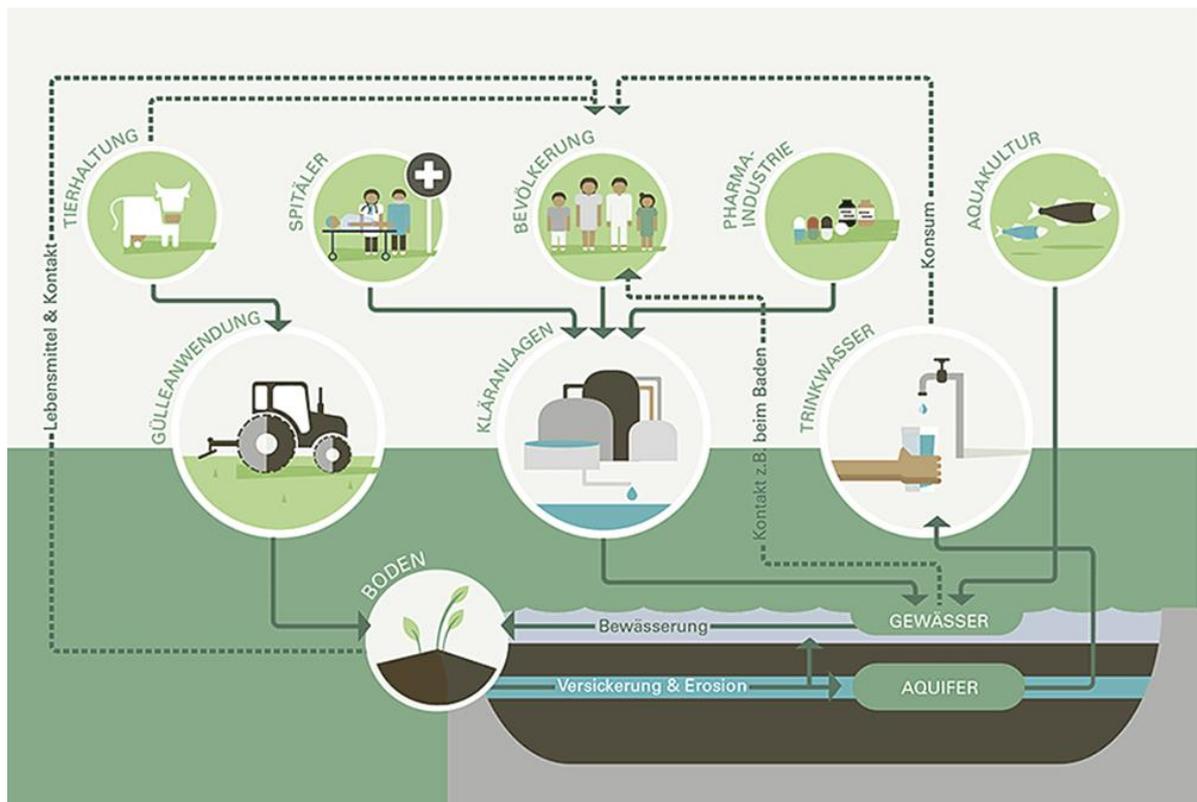


Abbildung 2-4 Potentielle Eintrags- und Verbreitungswege von Antibiotika und Antibiotikaresistenzen (eawag 2021).

Die weite Verbreitung von Resistenzen ist demnach nicht nur auf die Verbreitung durch Menschen, Tiere und Grund- und Oberflächenwässer zurückzuführen, sondern auch auf horizontalen Gentransfer (HGT) (Andersson und Hughes 2017; Bellanger *et al.* 2014; Cooper *et al.* 2017; Ibáñez-de-Aldecoa *et al.* 2017). Dieser beschreibt die Übertragung von Genen zwischen Bakterien (Konjugation), zwischen Bakterien und Viren (Transduktion) und der Aufnahme frei vorliegender DNA durch Bakterien (Transformation). Die drei Prozesse sind in Abbildung 2-5 dargestellt.

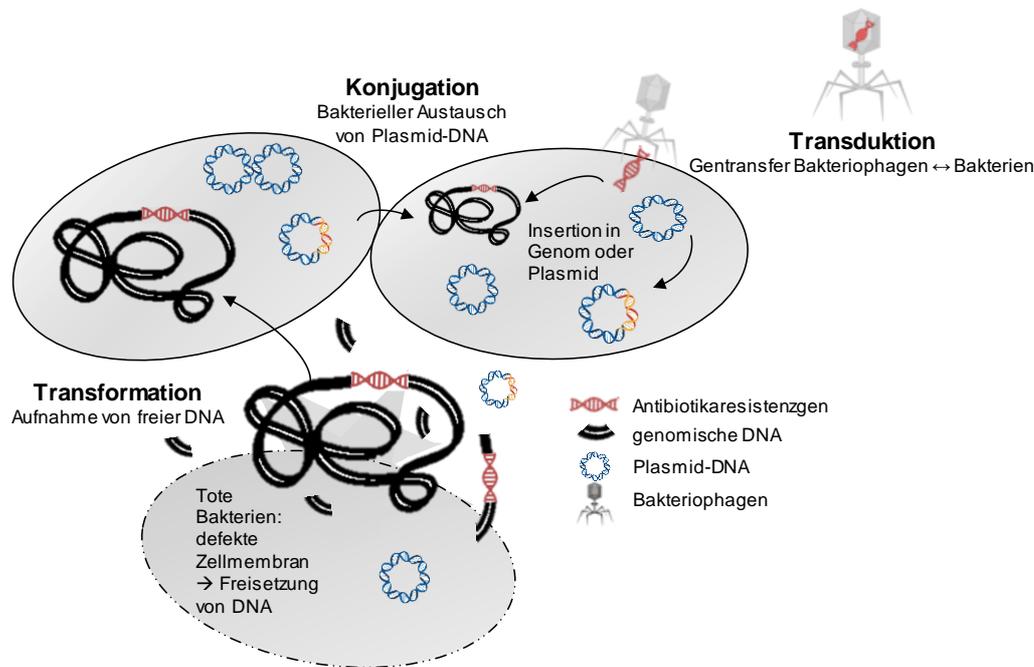


Abbildung 2-5 Relevante Prozesse des horizontalen Gentransfers (HGT).

Man geht davon aus, dass die vorherrschende Art der Übertragung von Resistenzgenen zwischen Bakterien ein Transfer von mobilen genetischen und mit ARG assoziierten Elementen (z.B. Plasmiden) ist (Lerminiaux und Cameron 2019). Dieser Austausch von Plasmiden kann über die Artenbarriere hinweg zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies erfolgen. Abiotische Stressoren, darunter subinhibitorisch konzentrierte AB-Rückstände in der aquatischen Umwelt, fungieren dabei vermutlich als Promotoren für die Konjugation (Zhang *et al.* 2013). Anhand der ARG-Konzentrationen in Bodenproben aus verschiedenen zeitlichen Epochen, konnten Knapp *et al.* (2010) den Anstieg von ARG aus verschiedenen AB-Klassen seit der Entdeckung von Penicillin 1940 bis 2008 demonstrieren und somit lokal begrenzt einen Hinweis auf die proportionale Korrelation zwischen Anstieg der AB-Konzentrationen und der ARG in der Umwelt liefern. Auch Resistenzgene mit klinischer Relevanz lassen sich in der Umwelt zunehmend nachweisen (Wintersdorff *et al.* 2016). Deshalb geht man davon aus, dass Umweltbakterien ein bedeutendes Reservoir für ARG darstellen. Diese oligotrophen und in der Regel hygienisch nicht-relevanten Bakterien sind den AB-Rückständen in der aquatischen Umwelt ausgesetzt und können somit zunehmend Resistenzen entwickeln und diese auf potentiell pathogene Bakterien übertragen (Andersson und Hughes 2017; Larsson *et al.* 2018). Dass der Transfer von ARG zwischen Umweltbakterien und *E. coli* prinzipiell möglich und von verschiedenen Umweltfaktoren beeinflussbar ist, konnten Merlin *et al.* (2011), sowie Bellanger *et al.* (2014) bereits experimentell zeigen. Ein weiterer wichtiger Prozess ist der Transfer von ARG zwischen Bakteriophagen (Bakterien-infizierenden Viren) und Bakterien. Man schätzt, dass etwa 20 % aller bakteriellen Genome durch phagenartige Elemente erworben wurden, was ihre evolutionäre Bedeutung unterstreicht (Brüssow *et al.* 2004). Die Exposition resistenter Bakterien gegenüber umweltbedingten/ chemischen Stressfaktoren (z. B. Antibiotika) oder die spontane Induktion kann einen Gentransfer zwischen Bakterien über Phagen (Transduktion) oder Phagen-artige Partikel, die durch zufällige Verpackung der Wirts-DNA entstehen, auslösen (Calero-Cáceres *et al.* 2019). Dass bereits einige Studien die Relevanz von ARG in Bakteriophagen zeigen konnten (Brown-Jaque *et al.* 2018; Calero-Cáceres *et al.* 2014; Colomer-Lluch *et al.* 2011; Quirós *et al.* 2014; Yang *et al.* 2018), beweist die Bedeutung dieses Übertragungsweges. Auch frei vorliegende/ extrazelluläre DNA (eDNA) kann potentiell zur Ausbreitung der Resistenzen beitragen, da sie in der Umwelt zum Teil als stabil eingestuft wird (vor allem im Boden) (Nielsen *et al.* 2007; Zarei-Baygi und Smith 2021) und ARG in der extrazellulären DNA-Fraktion gefunden werden konnten (Hao *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2018b; Zhang *et al.* 2018c). Aufgrund der geringen Molekülgröße ist es möglich,

dass eDNA-Fragmente durch Aufbereitungsverfahren nicht zerstört oder zurückgehalten werden, wodurch sie potentiell am Ende einer Behandlungsstraße noch intakt sein (Alexander *et al.* 2016; An *et al.* 2018; Liu *et al.* 2018; Manaia *et al.* 2018; Stange *et al.* 2019a; Zhang *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2015) und erneut von Bakterien aufgenommen werden können (für diese Hypothese gibt es keine konkreten Belege in der Literatur, trotzdem sollte sie für Risikobewertungen nicht vernachlässigt werden).

Um die Prozesse bei der Verbreitung und der Persistenz in Sedimenten besser verstehen zu können, muss ein Überblick über mögliche Formen von ARG in der Umwelt gewährleistet sein. Intrazelluläre DNA (chromosomal oder auf Plasmiden lokalisiert) in Bakterien oder inkapsuliert in Phagen, stellen womöglich die stabilsten Formen dar und sind somit die für die Verbreitung von Resistenzen am bedeutsamsten. Die Verbreitung von ARG in der aquatischen Umwelt in Form von resistenten Bakterien, ARG-tragenden Phagen und freien ARG kann außerdem stark von ihrer Assoziation mit Partikeln abhängen. Aufgrund der zumeist negativ geladenen Oberfläche von DNA und dem möglichen adsorptiven Verhalten von Bakterien und Phagen, kommt es zur Anheftung der drei Fraktionen an Sediment-Partikel unterschiedlicher Größen. Je nach Sedimentation oder Verteilung dieser Partikel bei unterschiedlichen Wetterereignissen kann dies zur schnelleren Verbreitung oder verstärkten Persistenz der Antibiotikaresistenzen führen. In Abbildung 2-6 sind die unterschiedlichen Möglichkeiten, wie Resistenzen in der aquatischen Umwelt assoziiert sein können sowie die möglichen Verteilungsprozesse, dargestellt. Hier wird deutlich, dass es viele Möglichkeiten gibt, wie ARG vorliegen können und dass diese Fraktionen in ständiger Wechselwirkung und im gegenseitigen Austausch sind. So können ARG (negative geladene DNA-Fragmente) assoziiert an Sedimentpartikeln vorkommen, was durch die häufig positive Oberflächenladung anorganischer Partikel möglich ist (Abbildung 2-6, (1)). Auch Phagen und andere Mikroorganismen können adsorbiert an Sedimentpartikeln vorkommen (Wang *et al.* 2016). Vermutlich für die Verbreitung der Resistenzen eine der relevantesten Formen ist das Vorkommen in Bakterien, also intrazellulär (2). Seltener beschrieben aber möglicherweise dennoch von großer Relevanz für die Verbreitung von ARG ist das Vorkommen in Phagen, die die Gene von Bakterien bei Infektion aufnehmen und sie anschließend in ein anderes Bakterium injizieren können (3). ARG können zudem als freie DNA vorliegen (4), zum Beispiel wenn es zu einer Lyse von bakteriellen Zellen kommt oder diese während dem aktiven Wachstum DNA ausscheiden (Nielsen *et al.* 2007).

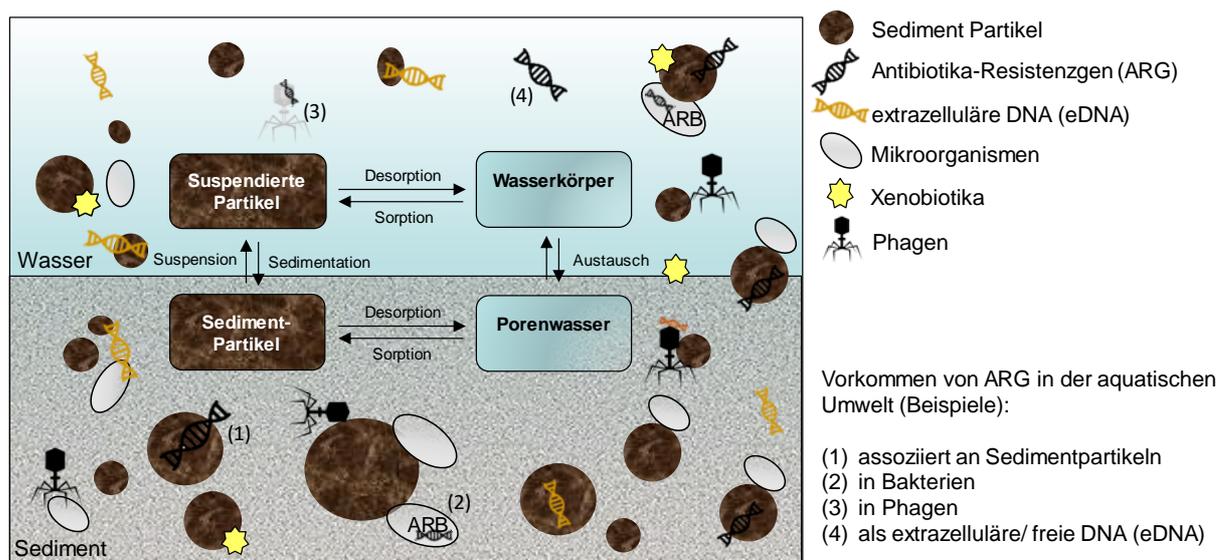


Abbildung 2-6 Zusammenspiel von ARG mit unterschiedlichen Fraktionen im Wasser und Sediment und deren Assoziationen mit Bakterien, Phagen und eDNA.

Zur Feststellungen in welchen der genannten Fraktionen (Sediment-Partikel-assoziiert, intrazellulär, in Phagen, als eDNA) gewisse Resistenzgene von Bedeutung sind, soll eine

Methode zum ARG-Nachweis in separaten Fraktionen entwickelt werden. Dies beinhaltet sowohl die Fraktionierung selbst (beispielsweise durch Filtration, Fällung oder Adsorption), als auch eine Aufkonzentrierung der Fraktionen für den anschließenden quantitativen Nachweis mittels qPCR. Bedeutend und bisher in der verfügbaren und bekannten Literatur nicht beschrieben ist die Trennung aller drei potentiell relevanten Fraktionen aus einer Wasser- oder Sedimentprobe, da meist nur eine Separierung von zwei der drei Fraktionen stattfindet. Für die Fraktionierung der Bakterien aus Umweltproben wird die Membranfiltration mit gering-Protein-bindenden Membranen der Porengrößen 0,2-0,45 µm durchgeführt (Alexander 2017; Calero-Cáceres *et al.* 2014; Christou *et al.* 2017; Hao *et al.* 2019; Lekunberri *et al.* 2017; Liu *et al.* 2018; Muniesa *et al.* 2005; Yang *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2018b; Zhang *et al.* 2018c). Dabei wird in einigen Quellen darauf hingewiesen, dass es durch Adhäsion an Partikeln, Biomasse oder der Membran durchaus zu einem Rückhalt von freier DNA und Viren kommen kann (Liang und Keeley 2013; Muniesa *et al.* 2005). Um den Rückhalt von Viren auf der Membran zu vermeiden, führten Muniesa *et al.* (2005) nach der Filtration Waschschritte mit PBS-Puffer durch, während Nagler *et al.* (2018) durch alkalischen Waschpuffer die Rücklösung von freier DNA erreichten. Für die Aufkonzentrierung der resultierenden und im Filtrat vorliegenden Phagen und der eDNA werden verschiedene Methoden vorgeschlagen. Für die Konzentration von eDNA werden zum Teil sogenannte „nucleic acid adsorption particle“ (NAAP)-Säulen verwendet (Liu *et al.* 2018; Wang *et al.* 2016). Über diese kann eine 100-fache Konzentrierung extrazellulärer DNA erreicht werden. Deren Herstellung ist jedoch mit großem Aufwand verbunden und es werden große Volumina der jeweiligen Wasserprobe benötigt. Corinaldesi *et al.* (2005) fraktionierten freie DNA durch eine Filtration des Überstandes nach zentrifugaler Abtrennung der Bakterien in einer Umweltprobe durch eine Membran mit 0,02 µm Porendurchmesser. Gängig ist außerdem die Separierung von freier DNA über Silica-Membranen (beispielsweise in Zentrifugations-Säulen). Hier können störende Proteine aus einer Lösung zunächst durch eine Phenol-Zugabe denaturiert und mittels Chloroform/Isopropanol in der organischen Phase abgetrennt werden. In Gegenwart chaotroper Salze bindet die freie DNA dann kovalent an die negativ geladene Silica-Membran und kann durch Entfernung der Salze wieder eluiert werden (Corinaldesi *et al.* 2005; Thatcher 2015). Eine Fällung der eDNA mittels Ethanol oder CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) ist ebenfalls möglich (Calero-Cáceres *et al.* 2014; Corinaldesi *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2018b; Zhang *et al.* 2018c). Phagen wiederum werden zur gezielten Quantifizierung der Viren-DNA durch einen DNase-Verdau von frei vorliegender DNA gereinigt und das Capsid anschließend mit Proteinase K aufgeschlossen (Calero-Cáceres *et al.* 2014; Yang *et al.* 2018). Des Weiteren wird eine zusätzliche Fällung mit PEG 6000 zur Konzentration der Phagen aus dem Filtrat vorgeschlagen (Lekunberri *et al.* 2017). Auch die immunomagnetische Separation von Viren aus Umweltproben wurde bereits durchgeführt (Hamza *et al.* 2011), welche allerdings den Nachteil der Antigen-spezifischen Viren-Selektion hat und somit nicht die Gesamtheit der in einer Probe vorliegenden Viren erfasst.

Da das Thema Antibiotikaresistenzen in der Umwelt in jüngster Vergangenheit rapide an Wichtigkeit gewonnen hat, wurden die genannten Methoden meist ohne vorherige Validierung auf Umweltproben angewendet. Liu *et al.* (2018) fügten interne Standards zu den Umweltproben hinzu, um die Wiederfindung der DNA-Fraktion zu bestätigen. Da es sich bei Gewässer- und Sedimentproben jedoch um komplexe Gemische handelt, kann durch interne Standards nicht vollständig sichergestellt werden, dass die Ergebnisse der Untersuchung separater Fraktionen auch die tatsächlich in der Probe vorliegenden Kompartimente widerspiegeln. Auch um zukünftig Ergebnisse besser vergleichen zu können, ist es nötig eine einheitliche Fraktionierungsmethode zu etablieren und unter Laborstandards zu validieren.

### 2.3 Nachweis von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt

Zum Nachweis von Resistenzen in der aquatischen Umwelt existieren zwei methodische Ansätze, die unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen. Auf molekularer Ebene lassen sich die Resistenzgene in Wasser- sowie Sedimentproben mittels qualitativer oder quantitativer PCR nachweisen. Auf mikrobiologischer Ebene können die resistenten Bakterien

durch kulturbasierte Verfahren direkt nachgewiesen werden. Beide Verfahren benötigen für die Analyse von Wasserproben eine Aufkonzentrierung der Probe durch Membranfiltration und die anschließende Anwendung von entweder speziellen Selektiv-Medien oder spezifischen PCR-Primern (gezeigt in Abbildung 2-7). Die unterschiedlichen Spezifitäten der Verfahren werden im Folgenden genauer erläutert.

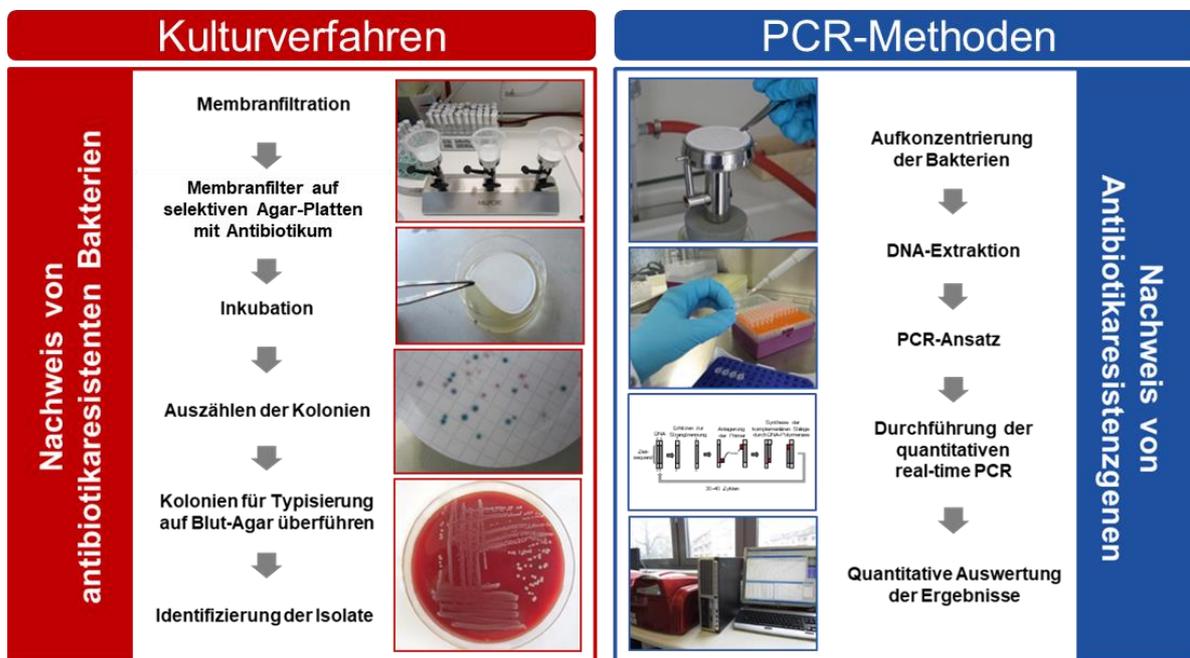


Abbildung 2-7 Vergleich von kulturbasierten und PCR-basierten Verfahren zum Nachweis von Resistenzen aus Umweltproben.

### 2.3.1 Molekularbiologische Nachweisverfahren

Das Verfahren der Polymerasekettenreaktion (*engl. Polymerase Chain Reaction, PCR*) basiert auf dem spezifischen Nachweis von für bestimmte Gene codierender DNA. Die DNA muss zunächst aus den Bakterien extrahiert und kann anschließend mittels speziell designten Primern in der PCR-Reaktion amplifiziert werden. Für die Analyse von Antibiotikaresistenzen aus Umweltproben eignet sich die quantitative PCR, da sie eine sehr sichere und spezifische Methode ist. Anhand einer Schmelzkurven-Analyse und/oder eine auf die PCR folgende Analyse der Fragmentgröße mittels Gelelektrophorese kann gewährleistet werden, dass das Gen spezifisch erfasst wird. Außerdem ist die Quantifizierung unabhängig von der Kultivierbarkeit von Bakterien und es lässt sich auch DNA nachweisen, die als freie DNA oder in Phagen vorliegt. Die Methode wird weltweit zum Nachweis von ARG angewandt, was den Vorteil der Vergleichbarkeit von Ergebnissen mit vielen anderen Studien hat und somit zu einer Erweiterung der allgemeinen Datenbasis und Kenntnis von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt beiträgt. Limitierungen der Methode sind vor allem im Umweltbereich durch die hohen Huminstoff-Konzentrationen in den Umweltproben gegeben. Aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zu Nukleotiden, werden sie bei der DNA-Aufreinigung häufig nicht ausreichend entfernt. In der PCR-Reaktion können sie dann zur Inhibition der Polymerase führen, was in falsch-negativen Ergebnissen resultieren kann. Durch eine Verdünnung der Probe und somit auch Verdünnung der Inhibitor-Konzentration kann dieses Problem nur bedingt reduziert werden. Es können zudem falsch-positive Ergebnisse auftreten, vor allem bei der Analyse von Wasserproben, die einer reaktiven Behandlungsmethode (z.B. Chlorung, Ozonung oder UV-Bestrahlung) zur Wasseraufbereitung unterzogen wurden. Da oftmals nur kurze Abschnitte eines Gens bei der qPCR amplifiziert werden (~100-300 bp, aufgrund einer besseren Effizienz der Polymerase für kurze Genfragmente), kann es vorkommen, dass auch eigentlich defekte Gene nachgewiesen werden, da der Effekt außerhalb des PCR-Fragments liegt. Um solche falsch-positiven Befunde zu minimieren, kann die Long-Amplikon qPCR Methode Anwendung

finden. Diese ermöglicht einen Nachweis vollständiger Gene, indem entsprechende Primer designiert werden, die das Gen am Anfang und am Ende flankieren. Bei Defekten innerhalb der Gensequenz kommt es zum Amplifikationsstop während der PCR-Reaktion, wodurch nur die relevanten und funktionellen Gene erfasst werden. Das Prinzip der LA qPCR ist schematisch in Abbildung 2-8 dargestellt.

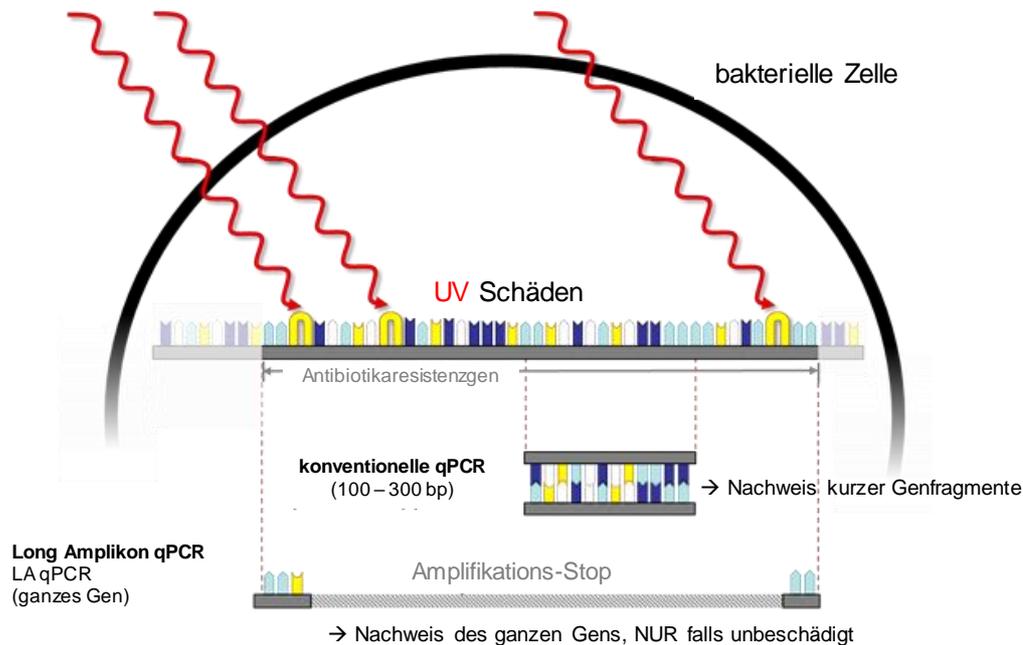


Abbildung 2-8 Vergleich des konventionellen, kurzen Zielbereichs der Short Amplikon (SA)-PCR mit dem längeren Bereich der Long Amplikon (LA) PCR. In diesem Beispiel werden mittels SA-PCR kurze Fragmente nachgewiesen, während die LA-PCR für beschädigte Gene negativ bleibt.

Durch Behandlungsverfahren wie die Bestrahlung mit UV-Licht, die Ozonung oder eine Chlorbehandlung können DNA-Schäden bei einer Wasserbehandlung induziert werden. Typische UV-Schäden sind Thymidin-Dimere, bei denen kovalente Bindungen zwischen zwei nebeneinanderliegenden Thymidinbasen entstehen, wodurch eine Polymerase die DNA-Sequenz nicht mehr ablesen kann und vom Strang dissoziiert. In der PCR würde ein so beschädigter DNA-Strang dann nicht mehr amplifiziert und erfasst werden. Ho *et al.* (2016), sowie Beck *et al.* (2014) konnten diesen Effekt für UV-behandelte Phagen anhand der Amplifizierung ihres Genoms mit langen und kurzen Amplikons bereits zeigen. Chang *et al.* (2017) untersuchten lange und kurze Amplikate der extrazellulären und auf Plasmiden lokalisierten Gene *tetA* und *blaTEM* nach UV-Behandlung im Zusammenhang mit ihrer anschließenden Transformierbarkeit. Neben der Nachweisbarkeit der ARG, nahm die Transformierbarkeit durch die Bestrahlung sogar noch stärker ab. Lange Amplikate von Resistenzgenen wurden ebenso in einer Studie von McKinney und Pruden (2012) verwendet, um die Inaktivierung-Effizienz von UV-Bestrahlung auf die entsprechenden intrazellulär in den Krankenhauskeimen VRE und MRSA vorliegenden ARG *mecA*, *ampC*, *vanA* und *tetA* zu ermitteln. Ein Vergleich zu kurzen bzw. „konventionell“ angewendeten Amplifikaten wurde hier jedoch nicht durchgeführt. Zudem handelte es sich nicht um vollständige Gene, sondern um vergleichbar lange Amplikate von ca. 1000 bp.

Chlor oder Ozon hingegen, was reaktive/oxidative Substanzen sind, verursachen andere Defekte der DNA. So kann Chlor beispielsweise Modifikationen von Purin- und Pyrimidin-Basen verursachen und somit auch zur Unterbrechung der Polymerasen-Reaktion führen. Zur Chlorbehandlung von Bakterien und der anschließenden Analyse der ARG mittels langen Amplifikaten gibt es eine Studie von Yoon *et al.* (2017), wobei auch hier kein Vergleich mit den konventionellen, kurzen Amplifikaten durchgeführt wurde. Mit den eingesetzten LA Methoden wurde hier gezeigt, dass intrazelluläre ARG eine vergleichsweise geringere Schädigungsrate,

als die extrazellulären auswies. Für intrazellulär vorliegende ARG (*tetA* und *vanA*) wurde der Vergleich von kurzen und langen Amplikons nach Chlor- und UV-Behandlung in einer Modellprobe untersucht, wobei der Effekt der stärkeren Reduktion der Genkopien mit der LA-Methode lediglich nach UV-Bestrahlung, nicht aber nach der Chlorbehandlung gezeigt werden konnte (Stange *et al.* 2019a). Zhang *et al.* (2019a) konnten mit kurzen und langen Amplikons der ARG *tetA* und *mecA* zeigen, dass Chlor sowohl chromosomale, als auch plasmid-lokalisierte ARG effektiv inaktivieren bzw. fragmentieren kann.

### 2.3.2 Kulturbasierte Nachweisverfahren

Klassische kulturbasierte Nachweisverfahren beruhen auf der Kultivierung von Bakterien auf selektiven Medien. Je nach Art der Bakterien können die Medienzusammensetzung, sowie die Inkubationstemperatur und –dauer angepasst werden, um möglichst eine Isolierung der gewünschten Bakteriengruppe zu erreichen. Bei der Kultivierung von hygienisch relevanten Bakterien, die eine Infektion bei Menschen und Tieren hervorrufen können, ist demnach auf körperähnliche Inkubationsbedingungen zu achten (z.B. Blut-ähnliche Nährstoffzusammensetzung, sowie Inkubation bei 36 °C). Für eine Kultivierung antibiotikaresistenter Bakterien, können bestimmte Antibiotika zu den Medien gegeben werden, oder die Bakterien nach Isolation ohne Selektion in weiteren Tests auf ihre Antibiotikaresistenzen untersucht werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass für den klinischen Bereich etablierte Verfahren auch für den Nachweis von resistenten Pathogenen oder Fäkalindikator-Bakterien in Oberflächen- und Grundwässer angewendet werden können (Schreiber *et al.* 2021). Die Isolation von resistenten Umweltbakterien gestaltet sich hingegen schwieriger. Man geht davon aus, dass 99 % der Bakterien bisher nicht *in vitro* kultiviert werden konnten, was beispielsweise auf eine geringe Prävalenz oder besonders langsames Wachstum von oft oligotrophen Umweltorganismen zurückzuführen sein kann, die in kulturellen Analysen dann übersehen werden (Vartoukian *et al.* 2010). Strategien, um auch un- oder schwer kultivierbare Bakterien zu isolieren, basieren auf einer Anpassung von Inkubationsbedingungen auf in der aquatischen Umwelt vorherrschende niedrigere Temperaturen und Nährstoffkonzentrationen, sowie eine ausgedehnte Inkubationszeit (Zengler *et al.* 2002). Hier findet häufig R2A Medium Anwendung, welches mit nur 2,8 Gramm organischem Substrat pro Liter ca. 10-fach geringer als herkömmliche Komplexmedien (z.B. LB-Medium) dosiert ist und sich somit für die Isolation von oligotrophen Stämmen eignet. Es ist davon auszugehen, dass durch Zugabe bestimmter Antibiotika zu den Kultur-Medien außerdem die Isolation von oligotrophen ARB erreicht werden kann. Bisher gibt es dazu allerdings nur wenige Studien (Garcia-Armisen *et al.* 2013; Piotrowska *et al.* 2017).

## 2.4 Trinkwasseraufbereitung

Süßwasser, in Form von Oberflächen- oder Grundwasser, ist eine der wichtigsten Ressourcen weltweit. Es muss für die Nutzung als Trinkwasser oder für die Industrie und Landwirtschaft meist aufbereitet werden, und wird nach entsprechend länderspezifischen Standards geprüft. Ca. 70 % des Trinkwassers wird aus Grund- und Quellwasser gewonnen (Umweltbundesamt 2019). Grundwasser wird durch die Versickerung von Regenwasser im Boden gebildet. Wenn der Boden geeignet ist (z.B. feinkörniger unbelasteter Sandboden) und die Mächtigkeit dieser Filterschicht ausreichend groß ist, bildet diese Sedimentpassage einen sehr wirksamen Schutz der Trinkwasserressource, die Verunreinigung durch die physikalische Filterwirkung, durch Adsorption und durch mikrobiellen Abbau wirksam zurückhalten oder entfernen kann. Somit hat das Grundwasser den Vorteil, dass es ohne aufwändige Behandlungsmaßnahmen als Trinkwasser genutzt werden kann (DVGW W 290). Auch Oberflächenwasser aus Seen, Talsperren oder Flüssen als Rohwasserressource werden als Quellen für Trinkwasser genutzt. Natürlich sind Oberflächenwässer deutlich stärkeren Umwelteinflüssen ausgesetzt und durch Verschmutzungen belastet. Aufbereitetes Abwasser enthält auch nach der Behandlung noch Bakterien und Viren und wird in die Vorfluter (Oberflächengewässer) eingeleitet. Aus diesem Grund sind bei der Nutzung von Oberflächenwasser häufig aufwendigere Trinkwasseraufbereitungsverfahren wie Partikel-Entfernung und Desinfektion notwendig. Außerdem ist darauf zu achten, dass der Nährstoffgehalt des Wassers niedrig ist und ein Eintrag von Verunreinigungen in das Trinkwasserverteilungsnetz ausgeschlossen werden kann.

Aufbereitungsstrategien sind darauf ausgelegt, die wichtigsten organischen Verunreinigungen/ Partikel (DVGW W 217) und hygienerelevanten Mikroorganismen aus dem Trinkwasser zu eliminieren, beziehungsweise diese zu inaktivieren (DVGW W 290). Abbildung 2-9 zeigt eine mögliche Aufbereitungsabfolge für Trinkwässer, wie sie weltweit in auf die Anforderungen angepasster Weise Anwendung findet. In jedem Fall sind ausreichend Kenntnisse über die Wasserchemie und -hygiene erforderlich, um zu entscheiden, welche Aufbereitungsstrategien sich für unterschiedliche Rohwässer eignen (DVGW W 202). Eine Vor-Oxidation/ Belüftung kann nötig sein, wenn z. B. flüchtige Stoffe eliminiert und organische Substanzen bereits zum Teil umgesetzt werden sollen. Dieser Schritt ist vor allem wichtig, falls im späteren Verlauf noch biologische Abbauprozesse stattfinden sollen, da die biologische Aktivität durch Teil-Oxidation von unpolaren Stoffen, sowie Einbringung von Sauerstoff in das System stimuliert wird. Bei der Koagulation/Flockung werden ionische oder nichtionische Substanzen zugegeben, die mit den zu entfernenden Substanzen im Wasser reagieren und ausfallen („flocken“) und anschließend sedimentieren. Das Ziel ist es, kolloidale und partikuläre sowie gelöste organische und anorganische Wasserinhaltsstoffe zu entfernen (DVGW W 217). Das überstehende Wasser kann leicht vom Sediment getrennt und weiter aufbereitet werden. Anwendung findet die Flockung vor allem in der Aufbereitung von Oberflächenwasser aus Seen, Talsperren und Flüssen oder oberflächenwasserbeeinflussten Grundwässern. Bei einer Passage über einen Sandfilter können partikuläre organische und anorganische Kontaminanten eliminiert werden (DVGW W 213). Statt oder nach der Sandfiltration können in modernen Trinkwasseraufbereitungsanlagen auch Membranfiltrationen eingesetzt werden, um Partikel zu entfernen. Bei der Oxidation, wobei es sich häufig um eine Ozonung handelt, werden verbliebene organische Komponenten in polare, nicht adsorbierbare und leicht bioverfügbare Moleküle oxidiert. Eine vollständige Mineralisierung der Stoffe findet nicht statt (DVGW W 225). Ist ein folgender biologischer Abbau zur Reduzierung des DOC (*engl. dissolved organic carbon*, gelöster organischer Kohlenstoff) nötig, wird zum Beispiel biologisch aktivierte Aktivkohle (BAC) verwendet, die unpolare Substanzen durch Adsorption zurückhält und ein aufwachsender Biofilm die vor-metabolisierten/-oxidierten Stoffe weiter abbaut. Die biologische Aktivierung der Aktivkohle ist nur sinnvoll, wenn bekanntermaßen biodegradierbare Metaboliten entstanden sind. Andernfalls nutzt man granulierten Aktivkohle (GAC), die ohne biologische Aktivierung eingesetzt wird (DVGW W 239). Vor oder während der Einspeisung in das Trinkwasserverteilungsnetz findet meist noch eine finale Desinfektion des Wassers statt,

welche mit mittels reaktiver Verfahren durchgeführt wird. Diese werden im folgenden Unterkapitel im Detail beschrieben.

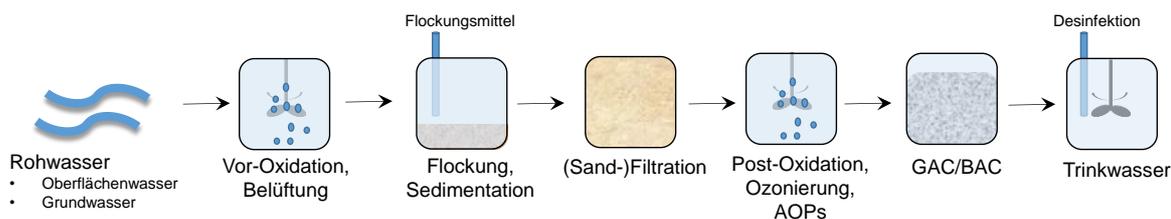


Abbildung 2-9 Mögliche Behandlungsverfahren in der Trinkwasseraufbereitung (nach Ivančev-Tumbas 2014).

Aufgrund der schnellen Ausbreitung und Übertragung von Resistenzgenen in der Umwelt (Brown 2019; Brown *et al.* 2020; Sidhu *et al.* 2020; Stange *et al.* 2019b; Stoll *et al.* 2012) wurden ARG in mehreren Oberflächengewässern und Trinkwasseraufbereitungsanlagen weltweit nachgewiesen (Bergeron *et al.* 2015; Guo *et al.* 2014; Hu *et al.* 2018; Stange *et al.* 2016; Stange *et al.* 2019a; Stange *et al.* 2019b). Sie können in Pathogenen, Umweltbakterien und als extrazellulär gebundene oder ungebundene DNA (Torti *et al.* 2015) vorkommen. So können sie das Ende einer Aufbereitungskette erreichen und in die Wassernetze gelangen. Die unvollständige Eliminierung von ARG während der Wasseraufbereitung stellt ein gewisses Risiko für die menschliche Gesundheit dar, da horizontale Gentransferprozesse zur weiteren Verbreitung von Antibiotikaresistenzen unter verschiedenen Bakterienarten beitragen können (Wintersdorff *et al.* 2016). Es gibt kaum Nachweise für ARG in deutschen Trinkwässern. Es wurden jedoch einige Daten veröffentlicht, die das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzen in Trinkwasserreservoirs (Khan *et al.* 2016; Stange und Tiehm 2020; Voigt *et al.* 2020b) und in abgefüllten Mineralwässern (Gautam 2021; Rosenberg und Duquino 1989) belegen. Im gechlorten Trinkwasser in China werden jedoch häufig noch ARG nachgewiesen (Guo *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2016). Bei der Nutzung von belastetem Oberflächenwasser sind konventionelle Trinkwasseraufbereitungsverfahren meist unzureichend, um ARG vollständig zu entfernen. Außerdem existieren weltweit noch keine Standards oder Grenzwerte für ARG in Trinkwasser oder Rohwässern. Für Rohwässer mit hoher Belastung kann es sinnvoll sein, die Aufbereitung anzupassen um die Verbreitung von ARG einzudämmen. In Wasseraufbereitungslagen werden derzeit verschiedene Ansätze zur Entfernung von ARG und ARB eingesetzt, wobei die Ozonung, UV- und Chlorbehandlung und vor allem die Membranfiltration aufzuführen sind (Le *et al.* 2018; Li *et al.* 2017; Slipko *et al.* 2019; Sun *et al.* 2019).

#### 2.4.1 Reaktive Verfahren

Die reaktiven Verfahren während einer Ab- oder Trinkwasserbehandlung können individuell und abhängig von der Wassermatrix gewählt werden. Gängige Methoden für die effektive Entfernung von Mikroorganismen sind die UV-Bestrahlung, die Chlorbehandlung und die Ozonung.

Für die Inaktivierung von Mikroorganismen durch UV-Licht wird eine Strahlung im Wellenlängenbereich von 240 bis 290 nm (UV) angewendet. Nukleinsäuren absorbieren in diesem Wellenlängenbereich. In Folge einer photochemischen Reaktion kann es dabei zur Bildung von Dimeren, bevorzugt an den Pyrimidinbasen kommen (Ellison und Childs 1981). Diese Dimerbildung hemmt die Transkription und Replikation von Nukleinsäuren (WHO 2004) was zum Sterben der Mikroorganismen führt. Bei der Trinkwasseraufbereitung wird die UV-Dosis so gewählt, dass die Nukleinsäuren in einem irreparablen Maß geschädigt werden (WHO 2004) und die Desinfektionswirkung somit garantiert und nicht durch Reparaturmechanismen wieder aufgehoben wird.

Weltweit handelt es sich bei der finalen Desinfektion vor Einspeisung des aufbereiteten Wassers in das Trinkwassernetz häufig um eine Chlorung (DVGW W 290). Der Chlorgehalt

variiert stark, je nach Belastung des Wassers und Aufbereitungseffizienz des Wasserwerks. In Deutschland beträgt der Grenzwert für freies Chlor im Trinkwasser 0,3 mg/L und dieser Grenzwert wird nur in den seltenen Fällen von Kontamination im Netz überschritten (DVGW W 290). In anderen Ländern kann dieser Wert deutlich höher sein, da aufgrund einer höheren Grundbelastung des Rohwassers oder höheren Außentemperaturen ein Wachstum von pathogenen Organismen wahrscheinlicher ist. Chlor wird seit vielen Jahren als Desinfektionsmittel eingesetzt, wobei meist Chlor/Hypochlorit oder Chlordioxid eingesetzt wird. Die biozide Wirksamkeit wird durch die Konzentration der unterchlorigen Säure bestimmt, während das Hypochlorit-Ion darauf nur einen geringen Einfluss hat (WHO 2004). Die undissoziierte Form (HOCl) kann die Zellmembran wesentlich besser durchdringen als das Hypochlorit-Ion (OCl<sup>-</sup>) und attackiert Enzyme im Zellinneren (Ghernaout 2017). Auch Cytochrome, Proteine und Nukleotide sind als sehr anfällig für einen oxidativen Abbau durch HOCl beschrieben, da so Stoffwechselprozesse und die Proteinbiosynthese durch Modifikationen von Purin- und Pyrimidin-Basen (Patton *et al.* 1972) gestört werden (Haas und Engelbrecht 1980; Venkobachar *et al.* 1977).

Ozon ist das am häufigsten in der Trinkwasseraufbereitung eingesetzte Oxidationsmittel. Es gilt als sehr effizientes Desinfektionsmittel für Bakterien und Viren. Ozon ist großtechnisch herstellbar, wobei hochenergetische Elektronen ein Sauerstoffmolekül in zwei Sauerstoffatome spalten und diese in einer nachfolgenden Reaktion mit einem weiteren Sauerstoffatom zu einem Ozonmolekül reagieren. Ozon ist thermodynamisch instabil und zerfällt wieder spontan zu molekularem Sauerstoff und einem Sauerstoffradikal. Somit fungiert es als starkes Oxidationsmittel und reagiert mit anorganischen und organischen Verbindungen. Als desinfizierende Wirkmechanismen von Ozon werden die direkte Reaktion mit Bestandteilen der Zellen und die indirekte Reaktion von radikalischen Spezies, die beim Zerfall von Ozon entstehen, unterschieden. Es ist bekannt, dass Ozon ungesättigte Bindungen angreift und Aldehyd-, Keton- oder Carbonyl-Verbindungen bildet. Aminosäuren, Proteine, funktionelle Gruppen von Proteinen (z.B. Disulfidbrücken) und Nukleinsäuren reagieren sehr schnell mit Ozon (Langlais *et al.* 1991). So werden initial Zellwände und Membranen von Mikroorganismen durch Ozon angegriffen (Bünning und Hempel 1996). Durch Oxidation von Lipiden der Zellmembran kann die gesamte Membranstruktur modifiziert und die Permeabilität somit erhöht werden. Dadurch gelangen Ozonmoleküle ins Cytoplasma, wo eine Reaktion mit der DNA stattfinden kann. Gemäß der Liste der Aufbereitungsstoffe nach § 11 der TrinkWV dürfen max. 10 mg/L Ozon angewandt werden. Nach Abschluss der Desinfektion darf der Restozongehalt im Wasser 0,05 mg/L nicht überschreiten (DVGW W 225).

### 2.4.2 Membranfiltration

Die Membranfiltration ist eine weltweit aufkommende Methode zur Trinkwasseraufbereitung (Hoslett *et al.* 2018; Lipp *et al.* 2012; Ming Chew *et al.* 2015; Xia *et al.* 2004). Die Membranen für Ultra- (UF) und Nanofiltrationen (NF) bestehen häufig aus Polymeren (z.B. Polyethersulfon, PES). Die UF, die durch Porengrößen im Bereich von 2 bis 100 nm oder 5 bis 5000 kDa MWCO definiert ist, bietet den Vorteil Bakterien, Algen und Makromoleküle zurückzuhalten. Für die Aufbereitung von Abwasser konnte auch der Rückhalt von ARG durch UF bereits gezeigt werden (Breazeal *et al.* 2013). Je nach Zusammensetzung eines aufzubereitenden Wassers ist die Eingliederung der UF in Behandlungsketten individuell anzupassen. Die UF kann beispielsweise in Algen-reichen Gewässern direkt vor der Ozonung eingesetzt werden. Dadurch bleibt die Zellwand der Algen intakt und es kommt nicht zur Freisetzung von Algtoxinen oder anderen Stoffen, die einen schlechten Geschmack oder Geruch (sog. Taste & Odor (T&O) Stoffe) verursachen (Kueppers 2019). Da Polymere wie Polyethersulfon (PES) hydrophob sind, neigen Polymermembranen zum Fouling (Ahmed *et al.* 2016). Dies führt zur Verstopfung der Membranporen und zur Verringerung der Membranleistung und erhöht die Betriebskosten, da ein zusätzlicher Reinigungsprozess erforderlich ist. Es gibt Faktoren, die das Fouling von Membranen verursachen, wie z. B. die Ablagerung von anorganischen Komponenten auf der Membranoberfläche/ die Verstopfung von Absorptionsporen, Mikroorganismen und die chemische Zusammensetzung des Feeds. Dies führt entweder zu

reversiblen oder irreversiblen Membranfouling. Reversibles Fouling entsteht durch die Anlagerung von Partikeln an der Membranoberfläche, irreversibles Fouling tritt auf, wenn die Partikel stark an der Membranoberfläche haften und nicht durch physikalische Reinigung entfernt werden können. Wenn sich während des kontinuierlichen Filtrationsprozesses eine starke Matrix der verschmutzten Schicht mit dem gelösten Stoff bildet, wird aus reversiblen Fouling eine irreversible Foulingschicht. Bei Polymermembranen ist eine Oberflächenmodifizierung des Polymers unerlässlich, um die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Membran auf die zurückzuhaltenden Stoffe im Wasser anzupassen und den Rückhalt somit zu optimieren und die Membran beständiger gegen Reinigungen und Desinfektionen zu machen (Nqombolo *et al.* 2018).

Für den Rückhalt von kleinsten organischen Molekülen, darunter zum Beispiel DNA-Moleküle, Pharmazeutika oder per- und polyfluorierte Alkylverbindungen (PFAS) reicht die UF nicht aus. Eine NF, mit einem Porengrößenbereich von 1 bis 2 nm oder einem MWCO von 100 bis 5000 Da, eignet ebenfalls für den Rückhalt von Viren. Sollen kleinste organische Moleküle und Salze zurückgehalten werden ist die Umkehrosmose meist Mittel der Wahl. Eine sogenannte Layer-by-Layer (LbL)-Beschichtungs-Methode, die auf Ultrafiltrationsmembranen angewendet werden kann, wird aktuell entwickelt und optimiert, um den Cut-Off der Membran deutlich zu reduzieren (von ca. 100 kDa auf 300 Da) und dabei die Permeabilität im Vergleich zu einer Nanofiltrations-Membran weniger stark zu verringern (Gregurec *et al.* 2015). Die Schichten bestehen dabei aus Poly-(4-styrenesulfonsäure) (PSS) und Polydiallyldimethylammonium Chlorid (PDADMAC), die durch ein spezifisches Verfahren alternierend auf die Membranoberfläche aufgebracht werden (Niestroj-Pahl *et al.* 2020). Eine Darstellung der Basismembran und der Beschichtungsart ist in Abbildung 2-10 gezeigt.

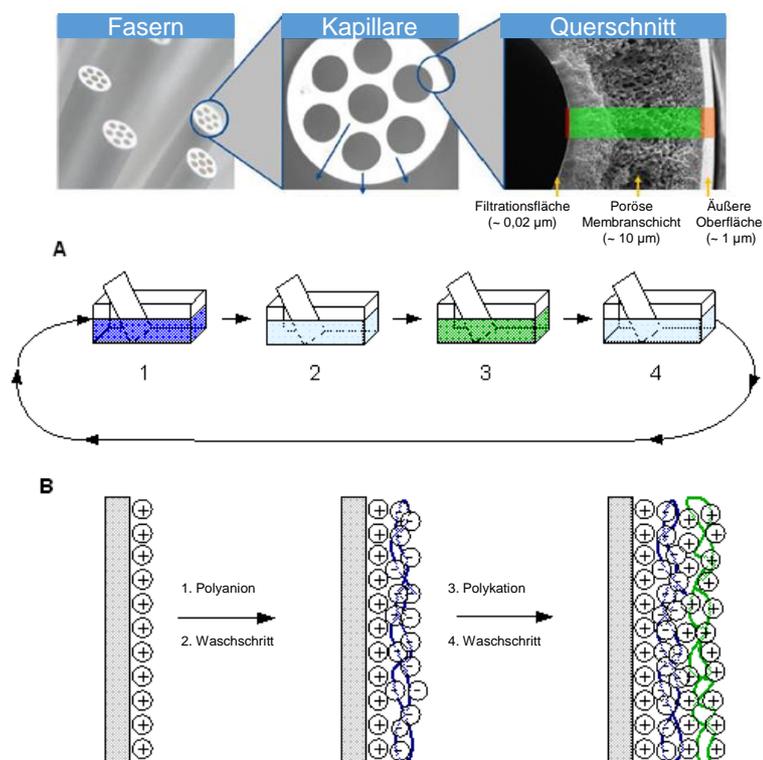


Abbildung 2-10 Multibore® UF-Membran aus Polyethersulfon (100 kDa MWCO, Inge GmbH) und Methode der Layer-by-Layer-Beschichtung der Firma Surflay Nanotec GmbH.

Aufgrund der individuell anpassbaren Beschichtungsmöglichkeiten und daraus resultierenden Membranpotentiale können chemisch-physikalische Eigenschaften der Membran auf die zurückzuhaltenden Stoffe im Wasser, wie z.B. DNA-Moleküle, angepasst werden. Da herkömmliche Methoden oft nicht ausreichen, um Restkonzentrationen von ARG zu beseitigen (Hu *et al.* 2018), gewinnt die Forschung im Bereich der neuen Membranfiltrationstechnologien

zunehmend an Bedeutung. ARG können in Umweltbakterien (Stange *et al.* 2019a) und als extrazellulär gebundene oder ungebundene DNA (Torti *et al.* 2015) vorkommen und durch unvollständige Elimination an das Ende einer Aufbereitungskette bzw. in die Wassernetze gelangen. Die unvollständige Beseitigung von ARG während der Wasseraufbereitung stellt ein gewisses Risiko für die menschliche Gesundheit dar, da horizontale Gentransfer-Prozesse zur weiteren Verbreitung von Antibiotikaresistenzen unter verschiedenen Bakterienarten (auch auf pathogene Bakterien) beitragen könnten (Wintersdorff *et al.* 2016). In Kläranlagen werden derzeit verschiedene Ansätze zur Entfernung von ARG aus dem Wasser geprüft (Le *et al.* 2018; Li *et al.* 2017; Slipko *et al.* 2019; Sun *et al.* 2019). LbL-beschichtete Membranen gewinnen nicht nur für die Wasserfiltration, sondern auch für das Recycling von Abfalllösungen (Paltrinieri *et al.* 2019; Remmen *et al.* 2019), die Umkehrosmose (Ishigami *et al.* 2012) und Entsalzungsprozesse an Forschungsinteresse (Fadhillah *et al.* 2013). Forschungsbedarf besteht bei dieser neuartigen Technologie in der Anpassung der Beschichtung (Reihenfolge der Aufbringung von Polyanionen und Polykationen) für die Anwendung auf bestimmte aus dem Wasser zu eliminierende Stoffe, der Rückspülstabilität und der Robustheit der Schichten gegen Reinigungs- und Desinfektionsmittel. In dieser Arbeit wurden zwei Beschichtungstypen im Hinblick auf den Rückhalt von ARG untersucht und eine geeignete LbL-Membran in Pilotversuchen zum Rückhalt von ARG aus Oberflächenwasser getestet.

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Verwendete Materialien, Medien und Chemikalien**

Listen der verwendeten Materialien (darunter Geräte), Medien und Chemikalien sind unter Anhang 8.1 dargestellt.

#### **3.2 Beprobung von Rohwasser und Sedimenten**

Zur Erweiterung der Datenbasis bezüglich des Vorkommens von ARG und ARB in der aquatischen Umwelt, wurden im Laufe der praktischen Arbeit mehrere Rohwasser-Proben untersucht. Die Entnahme der Proben erfolgte hierbei zum Teil durch andere Institutionen, wobei jedoch auf Einhaltung der gegebenen Proben-Abfüll-Vorschriften geachtet wurde. Die Abfüllung von Grundwasser- oder Oberflächenwasserproben erfolgte je nach Möglichkeit durch die Abfüllung an entsprechenden Hähnen (die dann zuvor mit 70 % Ethanol gereinigt wurden) oder direkte Schöpfung in das Probenahme-Gefäß. Dafür wurden stets sterile Kunststoffflaschen verwendet, die nach zweimaligem Austausch des Volumens mit der Probe und bis zur weiteren Spülen der sterilen Flaschen spätestens 24 h nach Befüllung gekühlt transportiert oder gelagert wurden. Von den in Tabelle 3-1 aufgelisteten deutschen Wasserversorgerunternehmen wurden im Rahmen des DVGW-Projektes „EVA (Entwicklung valider Verfahren zum Nachweis von Resistenzen, W201830)“ regelmäßig Wasserproben aus unterschiedlichen Bereichen zur Verfügung gestellt. Weitere Probenahmen zur Beschaffung von Realwasser-Proben für die Weiterentwicklung von Kulturverfahren fanden am Rhein in der Nähe von Karlsruhe statt. Diese sind in der Tabelle 3-1 unter TZW aufgeführt.

Ein Wasserversorger, der Proben zur Untersuchung auf Resistenzgene und antibiotikaresistente Bakterien zur Verfügung stellte, war der Zweckverband Landeswasserversorgung Langenau (ZV LWV). In der beprobten Wasseraufbereitungsanlage wird das Trinkwasser aus 40 % aufbereitetem Oberflächenwasser aus der Donau und 40 % beigemischt Grundwasser aus dem Grundwasserspeicher Donauried gewonnen.

Nach der Rohwasserentnahme wird dem Wasser zunächst Eisen-(III) als Flockungsmittel (VorR) zugesetzt und der sedimentierte Schlamm anschließend abgeführt. Dem vorgereinigten Wasser wird anschließend Ozon beigemischt (O3), um durch Oxidation eine erste Desinfektion und Eliminierung anderer organischer Substanzen zu bewirken. Die anschließenden Mehrschicht- und Aktivkohlefiltrationen, sowie Desinfektion des Wassers mit UV-Strahlung konnten für die Untersuchungen auf ARG und ARB leider nicht zur Verfügung gestellt werden. Nach Beimischung des mineralischen und hygienisch hoch qualitativen Grundwassers geht das Wasser ins Verteilungsnetz ein.

Tabelle 3-1 Wasserproben von deutschen Wasserversorgern, die im Laufe der Arbeit zur Verfügung gestellt wurden mit Probenahme (PN)-Daten und Einordnung in Wassertypen-Kategorie: OW (Oberflächenwasser), TWA (Trinkwasseraufbereitung) mit Vorreinigung (VorR) und Ozonung (O3). Volumen der für die DNA-Extraktion verwendete Wasserprobe in mL.

Institut/ Wasserversorger	Datum	Proben-ID	Volumen [mL]	Beschreibung
WWU	08.10.2019	OW1	1000	Schöpfprobe Ruhr (OW)
		OW2	1000	Schöpfprobe Stever (OW)
	15.11.2019	OW3	1000	Schöpfprobe Ruhr (OW)
		OW4	1000	Schöpfprobe Stever (OW)
	02.12.2019	OW5	1000	Schöpfprobe Ruhr (OW)
		OW6	1000	Schöpfprobe Stever (OW)
	08.01.2020	OW7	1000	Schöpfprobe Ruhr (OW)
		OW8	1000	Schöpfprobe Stever (OW)
	05.02.2020	OW9	1000	Schöpfprobe Ruhr (OW)
		OW10	1000	Schöpfprobe Stever (OW)
	07.04.2020	OW11	1000	Schöpfprobe Ruhr (OW)
		OW12	1000	Schöpfprobe Stever (OW)
	05.05.2020	OW13	1000	Schöpfprobe Ruhr (OW)
		OW14	640	Schöpfprobe Stever (OW)
	09.06.2020	OW15	1000	Schöpfprobe Ruhr (OW)
		OW16	500	Schöpfprobe Stever (OW)
	04.02.2021	OW17	1000	Schöpfprobe Ruhr (OW)
		OW18	500	Schöpfprobe Stever (OW)
TZW	02.12.2019	OW19	1000	Schöpfprobe Rhein (OW)
	27.01.2020	OW20	1000	Schöpfprobe Rhein (OW)
	10.08.2020	OW21	1000	Schöpfprobe Rhein (OW)
	18.01.2021	OW22	1000	Schöpfprobe Rhein (OW)
	25.05.2021	FRA1	1000	Schöpfprobe Alz (OW)
	17.08.2021	FRA1	1000	Schöpfprobe Alz (OW)
ZV LWV	17.02.2020	OW23	700	Rohwasser Donau (OW)/ Zulauf TWA
		VorR 1	1000	Vorreinigung (Fe <sup>3+</sup> -Koagulation/Sedimentation)
		O3 1	1000	Ozonung
	07.04.2020	OW24	750	Rohwasser Donau (OW)/ Zulauf TWA
		VorR 2	1000	Vorreinigung (Fe <sup>3+</sup> -Koagulation/Sedimentation)
		O3 2	1000	Ozonung
	16.06.2020	OW25	500	Rohwasser Donau (OW)/ Zulauf TWA
		VorR 3	750	Vorreinigung (Fe <sup>3+</sup> -Koagulation/Sedimentation)
		O3 3	1000	Ozonung
	25.08.2020	OW26	1000	Rohwasser Donau (OW)/ Zulauf TWA
		VorR 4	750	Vorreinigung (Fe <sup>3+</sup> -Koagulation/Sedimentation)
		O3 4	1000	Ozonung
	20.10.2020	OW27	1000	Rohwasser Donau (OW)/ Zulauf TWA
		VorR 5	750	Vorreinigung (Fe <sup>3+</sup> -Koagulation/Sedimentation)
		O3 5	1000	Ozonung
	01.12.2020	OW28	1000	Rohwasser Donau (OW)/ Zulauf TWA
		VorR 6	1000	Vorreinigung (Fe <sup>3+</sup> -Koagulation/Sedimentation)
		O3 6	1000	Ozonung
	24.08.2021	OW29	1000	Rohwasser Donau (OW)/ Zulauf TWA
		VorR 7	1000	Vorreinigung (Fe <sup>3+</sup> -Koagulation/Sedimentation)
		O3 7	1000	Ozonung

WWU: Westfälische Wasser- und Umweltanalytik GmbH

TZW: Technologiezentrum Wasser

ZV LWV: Zweckverband Landeswasserversorgung Langenau

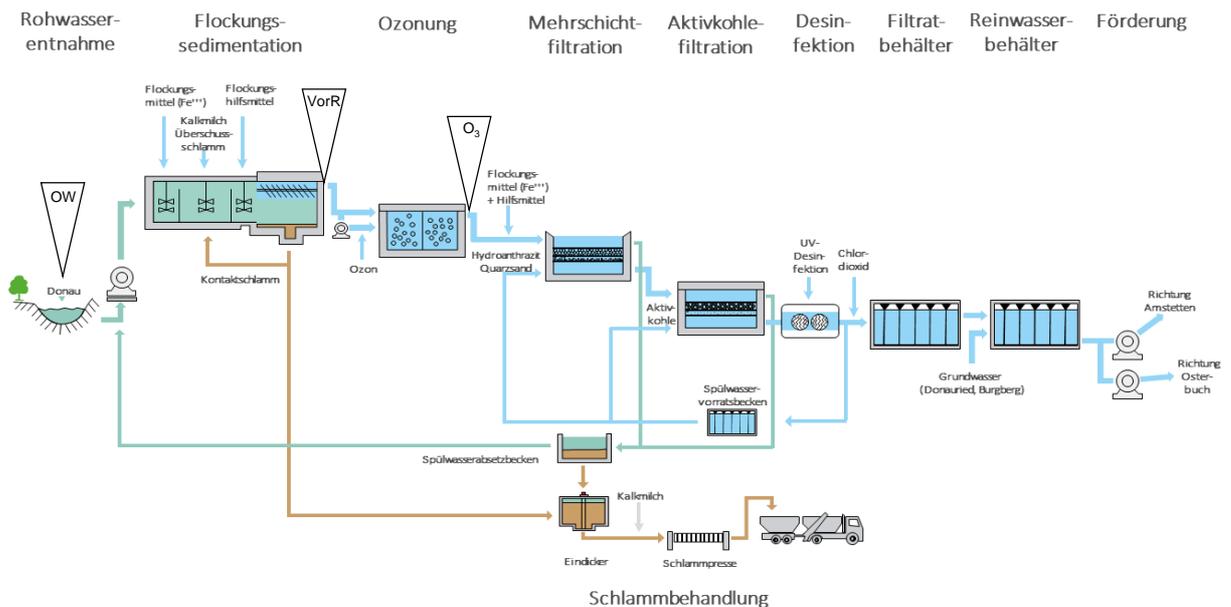


Abbildung 3-1 Aufbereitung von Donauwasser in der Trinkwasseraufbereitung des Zweckverband Landeswasserversorgung Langenau mit Kennzeichnung der zur Verfügung gestellten Proben und der Entnahmestellen: Oberflächenwasser (OW), nach der ersten Vorreinigung (VorR, Flockung/Sedimentation) und nach Ozonung (O3). Zur Verfügung gestellt von M. Hörmann, ZV LWV.

### 3.2.1 Feld-Probenahme-Kampagnen

Zusätzlich zu den Wasserproben, die von deutschen Wasserversorgungsunternehmen für Experimente und Methodenweiterentwicklungen zur Verfügung gestellt wurden, wurden fünf Probenahme-Kampagnen im Rahmen des durch den BMBF geförderten Deutsch-Chinesischen Projektes SIGN2 (02WCL1471A) durchgeführt. Hierfür wurden direkt Oberflächenwasser- und Sediment-Proben aus dem Tai See entnommen bzw. umliegende Wasserwerke beprobt.

#### 3.2.1.1 Beprobung von Rohwasser und Sediment-Kernen aus dem Tai See

Der Tai See (*chin.* 太湖 Tàì Hú) ist der fünft größte Süßwassersee Chinas. Der Flachwasser-See liegt in der Provinz Jiangsu und umfasst bei einer durchschnittlichen Tiefe von 1,9 m eine Fläche von 2340 km<sup>2</sup>. Das Einzugsgebiet des Tai Sees als Süßwasserquelle umfasst 36.895 km<sup>2</sup>, wozu auch die drei Millionen-Städte Suzhou, Wuxi und Shanghai zählen und der See somit ein Trinkwasser-Reservoir für über 10 Millionen Menschen darstellt (Qin *et al.* 2015). Die Qualität des Wassers wird nicht nur durch die seit den 1980er Jahren stark anthropogen und industriell beeinflussten See-Zuflüsse (King und Tong 1994) stark beeinträchtigt, sondern auch durch regelmäßig auftretende Algenblüten aus Cyanobakterien hervorgerufen, die mit zu hohen Nährstoffkonzentrationen und der daraus resultierenden Eutrophierung des Sees einhergehen. In am See lokalisierten Trinkwasserwerken wird das Wasser des Tai Sees durch mechanische, chemische und biologische konventionelle Behandlungsmethoden aufbereitet und gelangt nach Aufbereitung über Verteilungsnetze zu den Verbrauchern in den Städten des Einzugsgebiets. Da um den Tai See sehr viel Industrie und Landwirtschaft angesiedelt ist, wird der Flachwasser-See durch Einträge aus kommunalen und industriellen Abwässern stark beeinflusst. Durch hohe Pharmazeutika-Konzentrationen (darunter Antibiotika), die in verschiedenen Bereichen des Tai Sees nachweisbar sind (Hu *et al.* 2017), stellt die Entwicklung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen ein Problem für die Wasserqualität dar (Chen *et al.* 2019). Das zur Verfügung gestellte Trinkwasser ist häufig belastet mit Schadstoffen, Pathogenen oder Stoffen die einen unangenehmen Geschmack und Geruch

(T&O) verursachen. Demnach ist es nicht zum direkten Konsum geeignet. Um mikrobiologische Parameter im See selbst und entlang der Behandlungskette zu untersuchen, wurden Schöpfproben für die spätere DNA-Extraktion und anschließende Analyse mittels qPCR an den in Tabelle 3-2 aufgeführten Probenentnahme-Stellen zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Die Karte in Abbildung 3-2 zeigt die Positionen der Probenentnahme-Stellen für Seewasser und Sedimente.

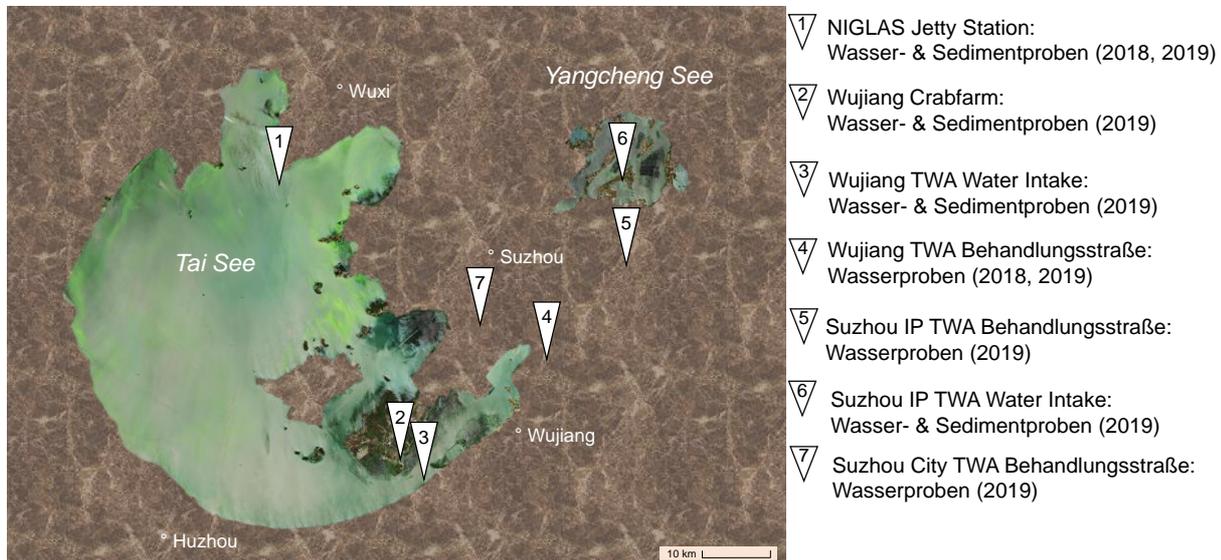


Abbildung 3-2 Lokalisationen der Entnahmestellen am Tai See von Wasserproben und Sedimentkernen während insgesamt drei Kampagnen in 2018 (November) und 2019 (März, August).

Zusätzlich wurden von Projektpartnern des KIT (Institut für angewandte Hydrogeologie) Sedimentkerne mit einem eigens entwickelten Beprobungs-Instrument entnommen und im Tiefenprofil geschnitten. Dafür wurde ein Uwitec-Kernbohrer (Uwitec, Mondsee, Österreich) verwendet. Die Tiefe der Kerne ist durch die Probenahmerohre und die Beschaffenheit des Sedimentes begrenzt und beträgt maximal 50 cm. Von allen in Tabelle 3-2 aufgeführten Sedimentkernen wurden entsprechend 0,5-1 g Feuchtmass entnommen und bis zur DNA-Extraktion bei -20 °C gelagert. Um die ARG in den Sedimenten mit den in der darüber liegenden Wasserphase vergleichen zu können, wurden für ausgewählte Proben die Feststoffgehalte der im Wasser gelösten Schwebstoffe durch Projektpartner des KIT ermittelt. Dazu wurde ein Polycarbonatfilter (Porengröße 0,45 µm) trocken und leer gewogen, eine definierte Menge der Wasserprobe filtriert und der Filter nach Trocknung erneut gewogen. Die Differenz ist als Feststoffgehalt (FS) definiert. Wie viele Anteile der FS-Konzentration organisch und anorganisch sind, konnte leider nicht differenziert werden.

Tabelle 3-2 Wasser- und Sedimentproben der Probenahmekampagnen in China, in chronologischer Reihenfolge, mit Bezug auf die in Abbildung 3-2 gekennzeichneten PN-Stellen. TWA=Proben der Wasserwerks-Behandlungsstraße, S=Sedimentkernproben, W=Rohwasserproben, SP sind die durch Filtration und Einwaage ermittelten suspendierten Partikel in der Wasserprobe, Volumen in mL der für die DNA-Extraktion verwendete Wasserprobe, Masse in g der für die DNA-Extraktion verwendeten Sedimentprobe. n.e.=nicht ermittelt.

Kampagne	Datum	PN-Stelle	Probenart	Proben-ID	SP [mg/L]	Volumen [mL]	Masse [g]	Beschreibung	
Nov 18	23.11.2018	4	TWA	Wu A	n.e.	345		Zufluss	
			TWA	Wu C	n.e.	500		Koagulation	
			TWA	Wu D	n.e.	500		Sedimentation	
			TWA	Wu E	n.e.	500		Sandfilter	
			TWA	Wu F	n.e.	500		Post-Ozonung/ GAC	
	25.11.2018	1	TWA	Wu G	n.e.	500		Chlorung/Reinwasser	
			W	NJ0 A	-	200		Oberflächenwasser	
			W	NJ0 B	-	250		Mittlere Tiefe (0,7 m)	
	26.11.2018	1	W	NJ0 C	-	250		Seegrund-Wasser (1,6 m)	
			W	NJ1 A	-	250		Oberflächenwasser	
			W	NJ1 B	-	250		Mittlere Tiefe (0,7 m)	
				W	NJ1 C	-	250		Seegrund-Wasser (1,6 m)
	Mrz 19	21.03.2019	3	W	Wu A	44,2	500		Oberflächenwasser
W				Wu C	95,8	400		Sedimentkern-Wasser	
S				Wu A	-		0,837	0-6 cm	
S				Wu B	-		0,599	6-12 cm	
21.03.2019		2	S	Wu C	-		0,629	12-18 cm	
			TWA	Wu A	n.e.	350		Zufluss	
			TWA	Wu C	n.e.	400		Koagulation	
			TWA	Wu D	n.e.	500		Sedimentation	
			TWA	Wu E	n.e.	500		Sandfilter	
			TWA	Wu F	n.e.	500		Post-Ozonung/ GAC	
			TWA	Wu G	n.e.	500		Chlorung/Reinwasser	
			W	CFI A	14,0	350		Oberflächenwasser	
21.03.2019		2	W	CFI C	74,5	300		Sedimentkern-Wasser	
			S	CF A	-		0,690	0-6 cm	
			S	CF B	-		0,503	6-12 cm	
			S	CF C	-		0,678	12-18 cm	
			S	CF D	-		0,780	18-24 cm	
			S	CF E	-		0,532	24-30cm	
			S	CF F	-		0,588	ab 30 cm	
			25.03.2019	7	TWA	SC A	n.e.	430	
TWA		SC B			n.e.	520		Vor-Ozonung	
TWA		SC C			n.e.	450		Koagulation	
TWA		SC D			n.e.	570		Sedimentation	
TWA		SC E			n.e.	500		Sandfilter	
TWA		SC F			n.e.	530		Post-Ozonung	
TWA		SC G			n.e.	550		BAC	
TWA		SC H			n.e.	550		Chlorung/Reinwasser	
27.03.2019		1	W	NJ0 A	n.e.	330		Oberflächenwasser	
			W	NJ0 B	n.e.	400		Mittlere Tiefe (0,7 m)	
			W	NJ0 C	n.e.	430		Seegrund-Wasser (1,6 m)	
29.03.2019		5	TWA	SIP A	n.e.	500		Zufluss	
			TWA	SIP B	n.e.	450		Vor-Ozonung	
			TWA	SIP C	n.e.	500		Sedimentation	
			TWA	SIP D	n.e.	500		Post-Ozonung	
			TWA	SIP E	n.e.	500		BAC	
			TWA	SIP F	n.e.	500		Chlorung/Reinwasser	
			S	SIPI A	-		0,659	0-5 cm	
			S	SIPI B	-		0,615	5-10 cm	
			S	SIPI C	-		0,606	10-12,5 cm	
			W	SIPI A	n.e.	500		Oberflächenwasser	
W	SIPI C	n.e.	250		Sedimentkern-Wasser				
Aug 19	20.08.2019	1	W	NJ0 A	n.e.	300		Oberflächenwasser	
			W	NJ0 B	n.e.	300		Mittlere Tiefe (1,2 m)	
			W	NJ0 C	n.e.	300		Seegrund-Wasser (2,4 m)	
	21.08.2019	1	S	NJ A	-		0,627	0-3 cm	
			S	NJ B	-		0,575	3-6 cm	
			S	NJ C	-		0,566	6-10 cm	
	22.08.2019	1	W	NJ1 A	26,9	300		Oberflächenwasser	
			W	NJ1 B	n.e.	300		Mittlere Tiefe (1,2 m)	
			W	NJ1 C	32,2	300		Seegrund-Wasser (2,4 m)	
			W	NJ2 A	n.e.	300		Oberflächenwasser	
			W	NJ2 B	n.e.	300		Mittlere Tiefe (1,2 m)	
			W	NJ2 C	n.e.	300		Seegrund-Wasser (2,4 m)	
	23.08.2019	7	TWA	SC A	n.e.	450		Zufluss	
			TWA	SC B	n.e.	500		Vor-Ozonung	
			TWA	SC C	n.e.	500		Koagulation	

Kampagne	Datum	PN-Stelle	Probenart	Proben-ID	SP [mg/L]	Volumen [mL]	Masse [g]	Beschreibung
			TWA	SC D	n.e.	500		Sedimentation
			TWA	SC E	n.e.	600		Sandfilter
			TWA	SC F	n.e.	600		Post-Ozonung
			TWA	SC G	n.e.	600		BAC
			TWA	SC H	n.e.	500		Chlorung/Reinwasser
	25.08.2019	1	W	NJ5 A	n.e.	300		Oberflächenwasser
			W	NJ5 B	n.e.	300		Mittlere Tiefe (1,2 m)
			W	NJ5 C	n.e.	300		Seegrund-Wasser (2,4 m)
	26.08.2019	1	W	NJ6 A	n.e.	300		Oberflächenwasser
			W	NJ6 B	n.e.	300		Mittlere Tiefe (1,2 m)
			W	NJ6 C	n.e.	300		Seegrund-Wasser (2,4 m)
	28.08.2019	1	W	NJ8 A	n.e.	160		Oberflächenwasser
			W	NJ8 B	n.e.	170		Mittlere Tiefe (1,0 m)
			W	NJ8 C	n.e.	280		Seegrund-Wasser (2,0 m)
	29.08.2019	5	TWA	SIP A	n.e.	500		Zufluss
			TWA	SIP B	n.e.	500		Vor-Ozonung
			TWA	SIP C	n.e.	500		Koagulation
			TWA	SIP D	n.e.	500		Sedimentation
			TWA	SIP E	n.e.	500		Sandfilter
			TWA	SIP F	n.e.	500		Post-Ozonung
			TWA	SIP G	n.e.	500		BAC
			TWA	SIP H	n.e.	600		Chlorung/Reinwasser
			TWA	SIP I	n.e.	600		Zufluss Verteilung

n.e. = nicht ermittelt

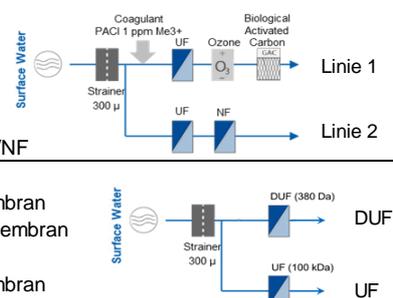
### 3.2.1.2 Beprobung von Wasserwerken am Tai See und Pilot-Versuchen zur Membranfiltration

Insgesamt ergab sich während der Jahre 2018 und 2019 dreimal die Möglichkeit, Wasserwerke, die am Tai See oder dem weiter nordöstlich gelegenen Yangcheng See angesiedelt sind, zu beproben. Dabei handelte es sich um das Wujiang Wasserwerk (Nr. 4, Wu), das Suzhou City Wasserwerk (Nr. 7, SC) mit Wasserzulauf vom Tai See und das Suzhou Industrial Park Wasserwerk (Nr. 5, SIP) mit Wassereinspeisung vom Yangcheng See (Lokalisations-Nr. lt. Abbildung 3-2). Die Schritte der Behandlungsstraßen wurden unter Berücksichtigung der Wasser-Verweilzeiten beprobt. Die Behandlungsstraßen ähnelten sich unter den drei Wasserwerken und beinhalteten im Wesentlichen (1) Rohwasserzulauf, (2) Prä-Ozonung, (3) Koagulation, (4) Sedimentation, (5) Sandfiltration, (6) Post-Ozonung, (7) BAC oder GAC, (8) Chlorung im Reinwasser. In Tabelle 3-2 sind die jeweiligen beprobten Schritte aufgeführt.

Um die Anwendbarkeit der Ultrafiltrations-Technologie am Tai See zu untersuchen, wurde am Standort des Wujiang Wasserwerks (Abbildung 3-2, Nr.4) eine Pilotanlage der Firma Inge GmbH installiert und betrieben. Diese beinhaltete eine reduzierte konventionelle Behandlungsstraße mit integrierter UF (Koag./UF/O3/BAC, Linie 1) und eine Straße mit hintereinandergeschalteter UF (100 kDa)- und NF (200 Da)-Filtration (Linie 2, 6 m<sup>2</sup> Membranoberfläche, in Kapillaren angeordnet, siehe Abbildung 3-3). Die am Standort Wujiang installierte Pilotanlage sollte im Laufe des Projektes mit beschichteten Membranen aufgerüstet werden, um den Effekt on-site zu testen. Bei der Beschichtung handelt es sich um eine spezielle Layer-by-Layer (LbL)-Beschichtung aus alternierend aufgebracht Polyanionen- und Polykationenschichten (Surflay Nanotec GmbH), die der UF-Membran (Multibore®, Inge GmbH) eine höhere Filtrationsleistung (sog. Dichte-Ultrafiltration, DUF) von ca. 380 Da MWCO verleiht. Aufgrund der weltweiten SARS-CoV2-Pandemie wurden weitere Probenahmekampagnen mit 6 m<sup>2</sup> Modulen, die eigentlich für das am Tai See liegende Wasserwerk geplant waren, für die Beprobung einer mobilen Pilotanlage in Deutschland verwendet. Hier wurde in der ersten Kampagne (September 2020) Wasser aus der Ruhr (Pegel Bachum, Arnsberg, DE) entnommen und Wasser aus der Alz (Altötting, DE) in der zweiten Kampagne (August 2021). Alle Proben, die während den Pilotkampagnen entnommen wurden sind in Tabelle 3-3 gezeigt.

Tabelle 3-3 Pilotkampagnen zur Membranfiltration. Kampagnen in China (2018, 2019) im Wujiang Wasserwerk und an zwei Standorten in Deutschland (2020, 2021).

Kampagne	Datum	PN-Stelle	Probenart	Proben-ID	Volumen [mL]	Beschreibung
Nov 18	23.11.2018	4	Pilot Wu	PI A	325	Zulauf
			Pilot Wu	PI B	500	Linie 1
			Pilot Wu	PI C	500	Linie 2
Mrz 19	21.03.2019	4	Pilot Wu	PI A	300	Zulauf
			Pilot Wu	PI UF	500	Linie 2 - nach UF
			Pilot Wu	PI C	500	Linie 2 - nach UF/NF
Sep 20	30.09.2020	DE - Arnsberg	Pilot Ru	PI A	1000	Zulauf
			Pilot Ru	PI DUF	1000	beschichtete Membran
			Pilot Ru	PI UF	1000	unbeschichtete Membran
Aug 21	31.08.2021	DE - Altötting	Pilot Alz	PI A	600	Zulauf
			Pilot Alz	PI DUF	1000	beschichtete Membran
			Pilot Alz	PI UF	1000	unbeschichtete Membran



\* Abbildung modifiziert von inge GmbH, C. Staaks



Abbildung 3-3 Membran-Kapillar-Modul (6 m<sup>2</sup>) mit beschichteten UF-Membranen (Multibore®, Inge GmbH).

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

Die angewendeten molekularbiologischen Methoden basieren auf dem Nachweis oder dem generellen Umgang mit DNA oder RNA. Bei der Durchführung aller Methoden wurde stets auf Nuklease-freie Arbeitsbedingungen und adäquate Lagerung der Proben geachtet.

#### 3.3.1 DNA-Extraktion

Je nach Anwendung wurden unterschiedliche DNA-Extraktions-Kits angewendet. Diese sind im Folgenden aufgeführt und beschrieben.

##### 3.3.1.1 Aufkonzentrierung einer wässrigen Probe

Um bestimmte Gene aus Umweltproben mit der qPCR messen zu können, wurden Wasserproben vor der DNA-Extraktion durch Membranfiltration aufkonzentriert. Hierbei wurden 200-1000 mL der Wasserprobe mittels Vakuumfiltration über einen Membranfilter (Supor Polyethersulfon (PES) Filter, 0,2 µm Porengröße, PALL Corporation) gegeben. Der Filter wurde direkt in die DNA-Extraktion eingesetzt oder bis zur späteren Extraktion bei -20°C aufbewahrt.

Für die Etablierung einer Kaskadenfiltration zur fraktionsbasierten Untersuchung von an Sediment-Partikeln assoziierten ARG wurden weitere Filter mit größeren Poren verwendet. Es wurden Polycarbonatfilter mit den Porengrößen 5 und 1,2 µm (Merck Millipore) sowie ein weiterer Supor PES-Filter mit 0,45 µm (PALL Corporation) verwendet. Zur weiteren Aufkonzentrierung der Fraktion < 0,2 µm (freie DNA und virale Nukleinsäuren) wurde zudem

eine zusätzliche Aufkonzentrierungs-Einheit verwendet, die eine Verringerung des Volumens unter Druck ermöglichte. Die Amicon Stir Cell 400 (Merck Millipore) wurde mit einer 5 kDa MWCO PES Membran (Merck Millipore) eingesetzt.

### **3.3.1.2 Extraktion von genomischer DNA aus Umweltproben**

Die Extraktion genomischer DNA (gDNA) erfolgte mit dem FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) laut Herstellerangaben. Ein mechanischer Zellaufschluss wurde initial mit Lysing Matrix E Beads in einem Fast-Prep-24 Instrument (MP Biomedicals) für 40 s bei 6,0 m/s durchgeführt. Dafür wurde die in der Aufkonzentrierung mit Biomasse und Partikeln beladene Filterhälfte mit dem Filterkuchen nach Innen in ein steriles Gefäß gegeben, die Beads hinzugefügt und die beiden Puffer für den Zellaufschluss laut Protokoll zugegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

### **3.3.1.3 Extraktion DNA aus Phagen und Viren**

Die Extraktion von DNA aus Phagen und Viren wurde mittels der automatisierten Extraktion mit dem innuPREP Virus DNA/RNA Kit–FX (Analytik Jena) im innoPure C16 touch (Analytik Jena) Extraktionsroboter durchgeführt. Durch dieses Kit wird ermöglicht, dass genomische und andere DNA zunächst entfernt wird, und die Viren-DNA somit nach Aufschluss des Capsids (Virushülle) separat extrahiert werden kann. Zuvor wurde die zu untersuchende Probe über externe mechanische Lyse der Biomasse mit Lysing Matrix E Beads in einem Fast-Prep-24 Instrument (MP Biomedicals) für 40 s bei 6,0 m/s aufgeschlossen. Die Extraktionslösungen wurden nach Herstellerangaben vorgelegt, das Extraktionsprogramm gestartet und die Viren DNA in 100 µL eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

### **3.3.2 Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Zur Bestimmung der DNA Konzentration wurde das Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher) laut Herstellerangaben verwendet und die Proben mit den Qubit Fluorometer (life technologies) vermessen. Eine Kalibrierung mit den mitgelieferten dsDNA Standards wurde vor jeder Messung durchgeführt.

### **3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Zur quali- oder quantitativen Bestimmung bestimmter Gene wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Die unterschiedlichen Methoden sind im Folgenden detailliert beschrieben.

#### **3.3.3.1 Qualitative PCR**

Für den qualitativen Nachweis bestimmter ARG in Umweltisolaten oder die Herstellung von Genfragmenten für Laborversuche wurde die konventionelle PCR angewendet. Biomasse einer Reinkultur wurde dafür unter sterilen Bedingungen von einem festen Nährmedium oder direkt aus einer Kryokultur in 100 µL sterilfiltriertes PCR-Wasser (UltraPure™, Life Technologies) überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 95°C zur Freisetzung der DNA und anschließender Zentrifugation bei 14.000 x g für 5 min oder der alternativen DNA-Extraktion mit dem Bacterial Xpress-Kit (Merck Millipore) wurde die DNA-Suspension als Template für die PCR eingesetzt. Alternativ wurde ein Genstandard als Template genutzt. Die Volumina der Komponenten für den PCR-Ansatz sind in Tabelle 3-4 dargestellt.

Für die PCR wurden die Zyklus-Zeiten und -Temperaturen laut Tabelle 3-5 verwendet.

Tabelle 3-4 PCR-Reagenzien und Pipettier-Volumina.

Komponente	Vol./Ansatz [ $\mu\text{L}$ ]
Nuklease-freies Wasser	8
MyTaq™-Redmix 2x	12,5
Primer (forward) 10 pmol/ $\mu\text{L}$	1,25
Primer (reverse) 10 pmol/ $\mu\text{L}$	1,25
Template DNA	2
Gesamt	25

Tabelle 3-5 PCR-Bedingungen für die Kolonie-PCR. Die Elongationszeit wurde hierbei abhängig von der Genlänge gewählt, bei der Annahme einer Polymerase-Aktivität von 1 kb/30s.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Polymerase-Aktivierung	95	180	1
Denaturierung	95	20	
Annealing	55	20	35
Elongation	72	variabel	
Finale Elongation	72	6000	1

### 3.3.3.2 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die Kopienzahlen der 16S ribosomalen DNA, des Klasse 1-Integrase-Gens und verschiedener in Tabelle 3-6 aufgelisteter Resistenzgene wurden mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR) unter Verwendung der entsprechend publizierten Primer-Kombinationen bestimmt. Alle qPCRs wurden mit einem Rotor-Gene 6000 Cycler (Corbett) und dem SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) durchgeführt. Der Mix enthält eine Polymerase, die sich vor allem für die Amplifizierung von langen Genfragmenten als stabiler und weniger anfällig gegen Inhibitoren erwiesen hat (McKinney und Pruden 2012). Zum Zwecke der Methodenoptimierung wurde die Polymerase im Laufe der Arbeit durch den SsoAdvanced™ Universal SYBR®Green Supermix (Bio-Rad) ausgetauscht, hierbei jedoch die Reproduzierbarkeit durch mehrere Vergleichsmessungen bestätigt. Das Temperaturprofil für die Amplifikation war wie folgt: 2 min 98 °C (Initialphase zur Enzymaktivierung), 45 Zyklen von 20 s bei 98 °C (Denaturierung), 20 s bei einer Primer-spezifischen Annealing-Temperatur ( $T_A$ ) und einer Fragmentlängen-abhängigen Elongationszeit ( $t_E$ ) bei 72 °C, gefolgt von einer Schmelzkurvenanalyse. Die verwendete  $T_A$  und  $t_E$  sind für jedes Gen in Tabelle 3-6 aufgeführt.

Alle Proben und Standards wurden in Duplikaten analysiert. Die qPCR-Standards wurden aus den seriellen Verdünnungen bekannter Mengen von linearisierten Zielgen-haltigen Plasmiden hergestellt. Zur Qualitätskontrolle wurden der Regressionskoeffizient ( $R^2$ ) der Standardkurve sowie die Amplifikationseffizienz bestimmt und eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Es wurden nur qPCR-Läufe mit  $R^2$ -Werten  $> 0,990$  und Effizienzen zwischen 90 und 105 % berücksichtigt. Die korrekten Längen der Amplifikationsprodukte wurden mit dem QIAxcel® Advanced System (Qiagen) verifiziert.

Tabelle 3-6 Primer und qPCR-Bedingungen der untersuchten Gene

Gen	Amplikon-Länge [bp]	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	T <sub>A</sub> [°C]	t <sub>E</sub> [s]	Referenz
16S rDNA	160	CCTACGGGAGGCAGCAG	ATTACCGCGGCTGCTGGC	68	20	Muyzer <i>et al.</i> 1993
<i>intf1</i>	196	GCCTTGATGTTACCCGAGAG	GATCGGTGCAATGCGTGT	63	20	Barraud <i>et al.</i> 2010
<i>sul1</i>	163	CGCACCGGAAACATCGCTGC AC	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTC G	68	20	Pei <i>et al.</i> 2006
<i>sul2</i>	722	CGGCATCGTCAACATAACC	GTGTGCGGATGAAGTCAG	65	25	Maynard <i>et al.</i> 2003
<i>blaCMY-2</i>	172	CGTTAATCGCACCATCACC	CGTCTTACTAACCGATCCTAGC	68	20	Kurpiel und Hanson 2011
<i>blaTEM</i>	112	TTCCTGTTTTTGCTACCCAG	CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG	66	20	Bibbal <i>et al.</i> 2007
<i>blaCTXM-32</i>	155	CGTCACGCTGTTGTTAGGAA	CGCTCATCAGCAGATAAAG	63	20	Stalder <i>et al.</i> 2014
<i>blaSHV</i>	857	TCGCCTGTGTATTATCTCCC	CGCAGATAAATCACCACAATG	55	30	Maynard <i>et al.</i> 2003
<i>blaNDM-1</i>	154	ATT AGC CGC TGC ATT GAT	CAT GTC GAG ATA GGA AGT G	60	20	Naas <i>et al.</i> 2011
<i>blaOXA-48</i>	177	TGTTTTGGTGGCATCGAT	GTAAMRATGCTTGGTTCGC	55	20	Monteiro <i>et al.</i> 2012
<i>blaKPC-3</i>	196	CAGCTCATTCAAGGGCTTTC	GGCGGCGTTTACTGTATT	59	20	Findlay <i>et al.</i> 2012
<i>blaVIM-2</i>	382	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	AATGCGCAGCACCAG GATAG	63	20	Roche Diagnostics, zitiert in Li <i>et al.</i> 2015
<i>vanA</i>	1030	CATGAATAGAATAAAAGTTGC AATA	CCCCTTAAACGCTAATACGATC AA	60	35	Clark <i>et al.</i> 1993
<i>ermB</i>	405	CATTTAACGACGAAACTGGC	GGAACATCTGTGGTATGGCG	63	20	Gevers <i>et al.</i> 2003
<i>mcr-1</i>	183	GGGCCTGCGTATTTAAGCG	CATAGGCATTGCTGTGCGTC	68	20	Hembach <i>et al.</i> 2017
<i>mecA</i>	91	CGCAACGTTCAATTTAATTTT GTTAA	TGGTCTTTCTGCATTCCTGGA	63	20	Volkmann <i>et al.</i> 2004

Der Ansatz der qPCR-Reaktionen ist in Tabelle 3-7 aufgeführt.

Tabelle 3-7 qPCR-Reagenzien und Pipettier-Volumina.

Komponente	Vol./Ansatz [µL]
Nuklease-freies Wasser	3,2
SsoAdvanced™ Universal SYBRGreen® Supermix 2x	5
Primer (forward) 10 pmol/µL	0,4
Primer (reverse) 10 pmol/µL	0,4
Template DNA	1
Gesamt	10

### 3.3.3.3 Gradienten PCR

Für die Etablierung neuer Primer-Kombinationen wurde mittels der Gradienten-PCR die optimale Annealing-Temperatur experimentell ermittelt. Durch das qPCR-System Mastercycler ep realplex (Eppendorf) ermöglicht die simultane Testung von 12 Annealing-Temperaturen gegeben. Der 25 µL-Ansatz der qPCR-Reaktionen wurde hierbei wie in

Tabelle 3-5 beschrieben pipettiert, nur dass auch hier der SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) bzw. der SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) verwendet wurde. Annealing-Temperaturen wurden im Bereich von 55 – 70 °C (Gradient) getestet, während sich die Elongationszeit bei 72 °C an der Länge des getesteten Gens orientierte, wobei von einer Polymerase-Prozessivität von etwa 1 kb/30s ausgegangen wurde. Zur Ermittlung der T<sub>A</sub> mit der besten Effizienz (zwischen 90 und 105 %) und dem gleichzeitig maximalsten R<sup>2</sup> wurden Standards mit Konzentrationen von 10<sup>1</sup> bis 10<sup>6</sup> Genkopien/mL vermessen. Eine Positivkontrolle sowie eine Negativkontrolle wurden stets mitgeführt. Auch hier wurde zur Sicherung der Qualität der qPCR-Reaktion eine abschließende Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und die PCR-Produkte in der Kapillargelelektrophorese überprüft.

### 3.3.4 Automatisierte Kapillargelelektrophorese

Um die spezifische Amplifikation in der PCR bzw. qPCR zu prüfen, wurden die PCR-Produkte hinsichtlich ihrer Länge mit dem QIAxcel Advanced System (Qiagen) qualitativ analysiert. Als Referenz für die Fragmentgrößen wurde der QX Alignment Marker 15 bp/3000 bp (Qiagen) verwendet und stets ein Standard aus der PCR-Reaktion als Vergleichsfragment mitgeführt. Für die Analyse von Fragmenten größer als 3000 bp wurde der QX Alignment Marker 15 bp/6000 bp (Qiagen) verwendet.

### 3.3.5 16S rDNA Sequenzierung

Zum Sequenzieren wurden 20 µL der mittels Kolonie-PCR vervielfältigten 16S rDNA Probe (EuB8 Forward-Primer AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, EuB1509 Reverse-Primer GGTTACCTTGTTACGACTT, Hendrickson *et al.* 2002) an die Firma StarSEQ® GmbH (Mainz) geschickt. Pro Sequenzierungsreaktion wurde außerdem 1 µL des Primers der Konzentration 10 pmol/µL mitgeschickt. Die Sequenzierungsmethode die hierbei zur Anwendung kommt ist die Sanger-Sequenzierung. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels ChromasPro (Version 2.6.4, Technelysium Pty Ltd) alignt. Für die bioinformatische Auswertung wurden die ermittelten Nukleotidsequenzen mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda MD, USA) analysiert.

## 3.4 Mikrobiologische Methoden

Mikrobiologische Methoden wurden zum Nachweis von Bakterien angewendet und weiterentwickelt. Die kulturbasierten Verfahren, sowie weitere methodische Ansätze sind im Folgenden beschrieben. Bei der Anwendung aller hier beschriebenen Arbeitsansätze wurde stets auf die Einhaltung von sterilen Arbeitsbedingungen und den bewussten Umgang mit potentiell gefährlichen Keimen geachtet.

### 3.4.1 Membranfiltration

Um die Konzentration an Bakterien in einer Wasserprobe hinsichtlich einer auswertbaren Menge zu erhöhen, wurde die Membranfiltration angewendet (Feuerpfeil *et al.* 2008). Die Filtration erfolgt mittels Vakuum über einen Membranfilter (EZ-Pak, 0,45 µm Porengröße, Merck Millipore). Der Membranfilter wurde anschließend auf einem festen Selektivnährmedium unter bestimmten Bedingungen inkubiert, die in den folgenden Abschnitten im Detail beschrieben sind.

### 3.4.2 Kulturverfahren

Parallel zu den molekularbiologischen Methoden, die auf dem reinen Nachweis von DNA bzw. bestimmter Gene beruhen, ist es wichtig auch kulturbasierte Verfahren anzuwenden. Es wurden vor allem Kulturverfahren zur Bestimmung von hygienisch relevanten Bakterien, ARB und Phagen/Viren angewendet.

#### 3.4.2.1 Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien auf chromogenem Vollmedium

Zum Nachweis von Extended-Spectrum  $\beta$ -Laktamasen-bildenden Enterobakterien wurde der CHROMagar™ ESB (MAST Group, weiterhin als ChromESBL abgekürzt) verwendet. Dieser enthält eine Kombination aus verschiedenen Antibiotika (genaue Zusammensetzung unbekannt), und erlaubt durch chromogene Reaktionen bestimmter Bakterien eine erste Einordnung anhand der Koloniefärbung. Kolonien mit rosa bis burgunderroter Färbung können als  $\beta$ -Glucuronidase-bildende *Escherichia coli* eingeordnet werden. Grüne/blau bis braun-grüne Kolonien von  $\beta$ -Glucosidase-bildenden Stämmen werden laut Hersteller zu den Gattungen KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) sowie *Proteae* (*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*) zugeordnet, während hell- bis dunkelbraun gefärbte Kolonien zu

Deaminase-exprimierenden Stämmen gehören. Nach Membranfiltration laut Kapitel 3.4.1, wurden die Platten für 36 Stunden bei 41 °C inkubiert. Für eine genaue Typisierung wurden die Kolonien auf Blutagar-Platten (Columbia Agar mit 5 % Schafblut) vereinzelt und durch das MALDI-TOF-MS (siehe Kapitel 3.5) Verfahren genauer identifiziert.

### 3.4.2.2 Mikrodilutionstest zum Nachweis einer enzymatisch vermittelten β-Laktam-Resistenz

Ausgewählte Isolate, die auf antibiotikahaltigen R2A-basierten Medien wuchsen, wurden auf die Expression von genetisch kodierten β-Laktamase-Gruppen, nämlich ESBL, AmpC, KPC, MBL, D-Carbapenemasen (einschließlich OXA-48-ähnlicher Enzyme), mit dem Micronaut-S β-Laktamasen-Test (Merlin Diagnostika GmbH) gemäß den Anweisungen des Herstellers getestet. Um auswertbare Ergebnisse für Umweltisolate zu erhalten, wurden die folgenden Anpassungen vorgenommen: Die Kolonien wurden auf R2A-Medium (Merck) angezüchtet, bevor sie in 0,9 % Natriumchlorid auf eine Dichte des Standards McFarland 0,5 resuspendiert wurden. Nach der Resuspension wurden 50 µL jeder Kultur in die Mueller-Hinton-Broth (im Lieferumfang des Tests enthalten) gegeben. Nach dem Mischen wurden 100 µL der Suspension in jede Vertiefung der Micronaut-S-Platte mit 96 Vertiefungen gegeben und die Platte 24 Stunden lang bei 21 °C bebrütet. Nach Überprüfung der erhöhten Trübung in der Wachstumskontrolle (GC) wurden 30 µL Presto Blue Cell Viability agent (ThermoFisher Scientific) in jede Vertiefung gegeben und weitere 12 bis 24 Stunden lang bebrütet, bis ein deutlicher Farbumschlag von blau nach rosa erfolgte. Die Ergebnisse wurden visuell und photometrisch ausgewertet, indem entweder die rosafarbenen Vertiefungen als "positiv" für bakterielles Wachstum definiert oder die beiden Wellenlängen 570 nm und 595 nm gemessen wurden. Bei  $E_{570nm} - E_{595nm} > 0$  wurden die Kolonien ebenfalls als "positiv" für bakterielles Wachstum definiert. Aufgrund der Methodenanpassung wurden die Platten nur qualitativ ausgewertet und keine MHK-Werte bestimmt. Ein Schema des Assays ist in Abbildung 3-4 zu sehen.

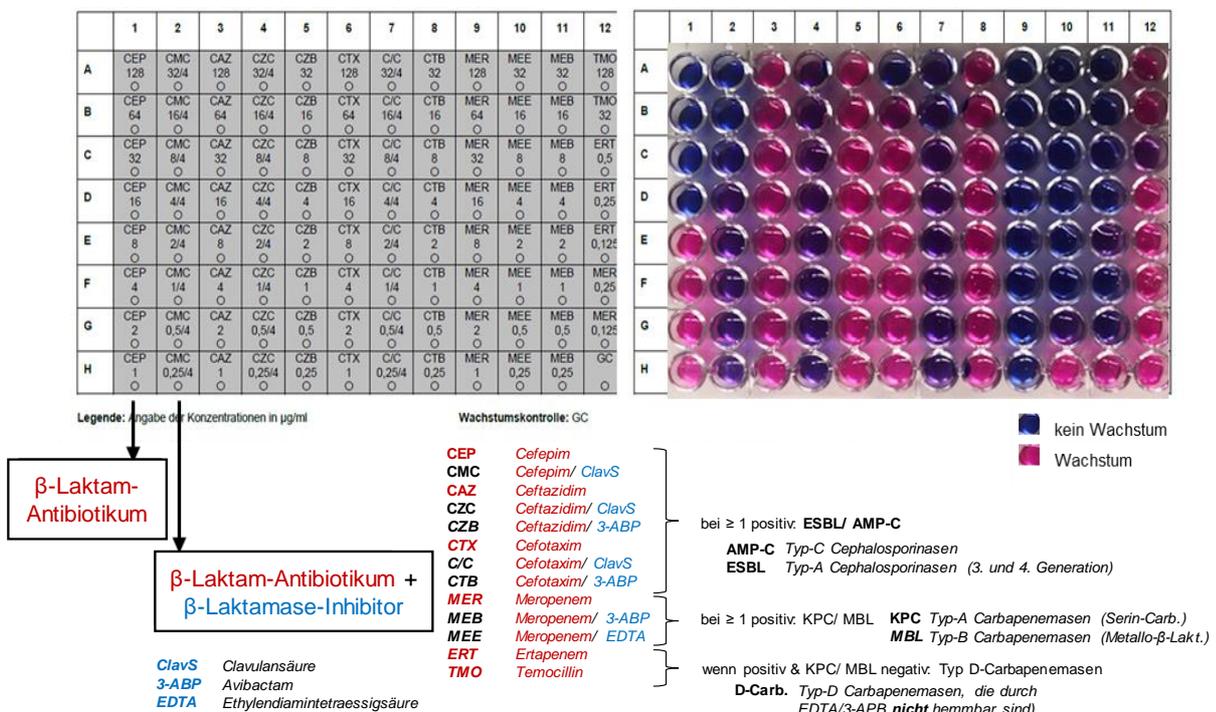


Abbildung 3-4 Micronaut-S Test zum Nachweis von β-Laktamasen.

### 3.4.3 Herstellung von kryogenen Lagerungskulturen

Um gewonnene Isolate über einen längeren Zeitraum zu konservieren, wurden Kryokulturen mit dem KRYOBANK System (Mast Diagnostica) erstellt. Dafür wurde eine kleine Menge der

Einzelkultur steril in ein Kryoröhrchen überführt. Nach kurzem Invertieren wurde die Flüssigkeit entfernt und das Röhrchen bei -75 °C eingefroren.

#### 3.4.4 Durchflusszytometrie

Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurde ein Durchflusszytometer (Modell S3 Cell Sorter) der Firma Bio-Rad verwendet. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Vereinzelung zuvor angefärbter Bakterien in einer Probe durch hydrodynamische Fokussierung und der anschließenden separaten Anregung durch einen Laser. Das spezifische Fluoreszenzsignal jedes Bakteriums wird detektiert und die Intensität geplottet.

Zum Anfärben der Zellen wurde die Probe mit SybrGreen (Thermo Fisher) versetzt, gevortext und für 13 Minuten bei 37 °C im abgedunkelten Thermoblock bei 400 rpm inkubiert. Während der Inkubation kommt es zur Interkalation des SybrGreens in die DNA der Bakterien, wodurch sie nach entsprechender Anregung durch Fluoreszenz nachweisbar werden. Nach der Färbung wurden 100 µL in ein Inkubationsröhrchen gegeben und im Durchflusszytometer gemessen. Die Anregung durch den Laser erfolgte bei 488 nm und die Emission bei 522 nm wurde detektiert. Je nach Intensität des detektierten Signals konnten die Zellen durch Gating in LNA (low nucleic acid) und HNA (high nucleic acid) eingeteilt werden. Die Summe aus beiden Gates ergibt die Gesamtzellzahl in der Probe.

### 3.5 Matrix-gestützte Laser-Desorption Ionisierung mit Time-of-Flight-Massenspektrometrie

Die Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI-TOF-MS) ist eine Ionisationstechnik, welche einen empfindlichen Nachweis von großen, nichtflüchtigen und labilen Molekülen durch Massenspektrometrie zulässt (Hercules 2008). Bei der MALDI-TOF-MS werden aus den Proteinen der bakteriellen Isolate durch Laserstrahlung Ionen erzeugt und deren Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) über die Flugzeit (*time-of-flight*) in einem elektrischen Feld ermittelt. Die vom Detektor registrierten Massenspektren sind spezifisch für die jeweiligen Bakterienarten (ähnlich eines molekularen Fingerabdrucks) und werden durch das BioTyper Software Packet (Version: 4.1.80, Bruker Daltonik) vollautomatisch mit der Referenzdatenbank abgeglichen. Die Software erzeugt einen Zahlenwert, den Score Value, der Auskunft über die Validität des Differenzierungsergebnisses gibt (Abbildung 3-5), der Aufschluss über die Validität des Ergebnisses gibt (Schubert und Wieser 2011). Score Values  $\geq 2$  erlauben eine Zuordnung der Spezies, zwischen 1,7 und 2,0 kann das Bakterium auf der Gattungsebene relativ sicher identifiziert werden. Unterhalb eines Score Values von 1,69 kann keine Identifikation erfolgen. Die Referenzdatenbank enthält mehr als 7300 IVD-CE zertifizierte Referenzspektren, die regelmäßig aktualisiert werden (MALDI BioTyper IVD-CE Broschüre, 2018). Die Art identifizierter Isolate wurde nur erfasst, wenn der Score Value zwischen 2,0 und 3,0 lag. Andernfalls, also bei einem Score Value von 1,7 bis 1,99 oder verschiedenen Arten unter den 10 ersten Treffern, wurde die Identität der Isolate nur auf Gattungsebene festgehalten, da diese dann trotzdem mit hoher Wahrscheinlichkeit richtig eingeordnet wurde.

Wertebereich	Beschreibung
2.00 - 3.00	Sehr wahrscheinliche Identifikation
1.70 - 1.99	Wahrscheinliche Identifikation
0.00 - 1.69	Keine Identifikation möglich

Abbildung 3-5 Einordnung der Massenspektren durch Score Value.

Die Isolate wurden mittels erweitertem Direkttransfer (eDT) präpariert. Hierbei wird Biomasse einer zuvor vereinzelt Kolonie mit einem sterilen Holzstäbchen vom Agar auf einem Spot des Targets aufgetragen. Zur Senkung des pH-Wertes zur optimalen Kristallisierung von Matrix und Analyt (Hercules 2008), sowie zur Desintegration der Zellwände und Membranen und Freisetzung der Proteine wird 1  $\mu$ L einer 70 %-Ameisensäure hinzugegeben (Schubert und Wieser 2011). Nach Trocknung wird 1  $\mu$ L Matrix (Bruker Daltonik) auf den Spot gegeben. Sie besteht aus kleinen organischen Molekülen, welche die Ablation und Ionisierung der Probenbestandteile erleichtert und damit leichter die Laserstrahlung absorbiert (Caprioli *et al.* 1997). Die Matrix wird direkt, oder bis zu maximal 7 Tage vor der Analyse in Matrix-Solvent (50 % Acetonitril, 47,5 % Wasser und 2,5 % Trifluoressigsäure (TFA), Bruker Daltonik) angesetzt. Eine schematische Darstellung der Methode ist in Abbildung 3-6 gezeigt.

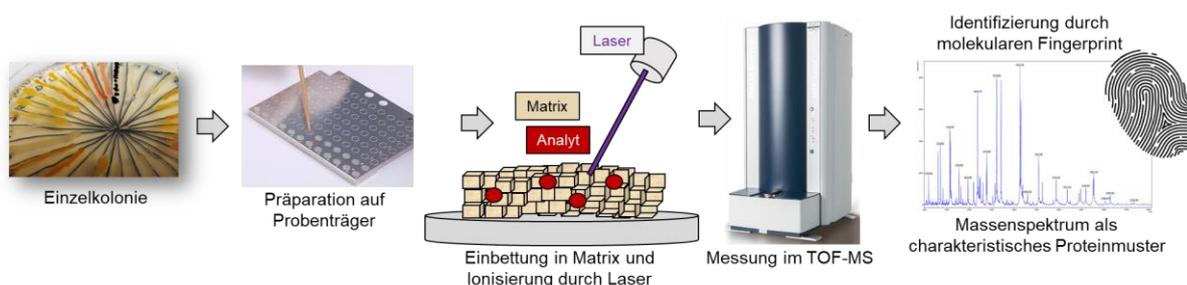


Abbildung 3-6 Prinzip der Isolat-Identifizierung mit MALDI-TOF-MS.

### 3.6 Herstellung von Standards für die Quantifizierung von Genen

Für die Herstellung von neuen Standards für die Quantifizierung von Genen in der qPCR (lt. Kapitel 3.3.3.2) wurden klassische Klonierungsmethoden angewendet. Die zusammenfassende Abfolge der einzelnen Schritte ist in Abbildung 3-7 gezeigt.

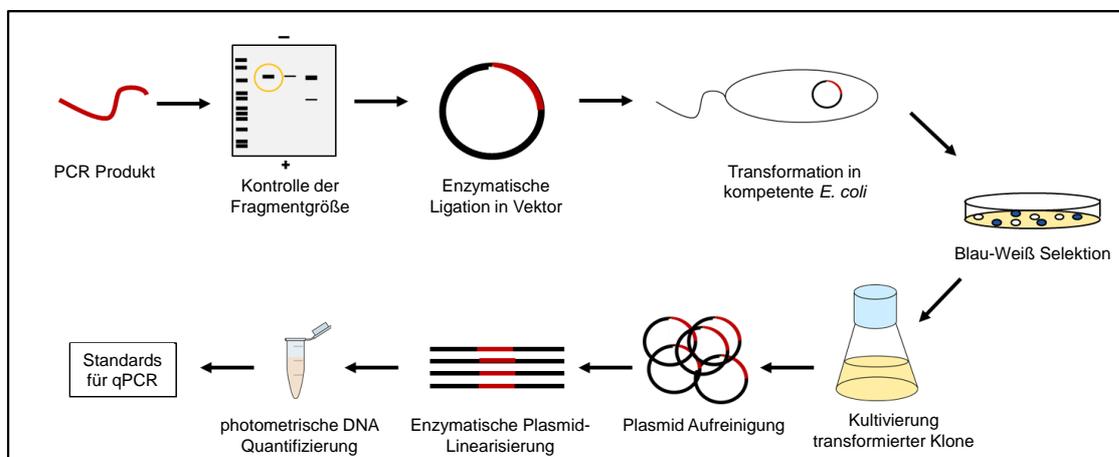


Abbildung 3-7 Ablauf zur Herstellung neuer Standards für die Anwendung in der qPCR.

Kurz zusammengefasst wurde eine Test-PCR mit dem entsprechenden Primer-Paar durchgeführt, wofür die extrahierte gDNA verschiedener erwartungsgemäß auf das Gen positiv zu testenden Umweltproben als Template verwendet wurde. Nach positiver Detektion des Gen-Fragments wurde es in das pGEM-T Vector System kloniert und in den *E. coli* K12 JM109 Stamm transformiert, wo die positiven Klone durch Blau/Weiß, sowie Antibiotika-Selektion identifiziert werden konnten. Entsprechende Klone wurden für eine Plasmid-Aufreinigung verwendet, das Plasmid durch enzymatischen Verdau linearisiert, die Konzentration der Plasmid-DNA photometrisch bestimmt und somit die Genkopien-Konzentration für die qPCR berechnet und entsprechend eingestellt.

### 3.6.1 Klonierung mit dem pGEM-T Vector System

Die Fragmentgröße des PCR-Produkts wurde laut Kapitel 3.3.4 mit der Kapillargelelektrophorese überprüft. Ein korrektes PCR-Produkt wurde anschließend mit dem High Pure PCR-Purification Kit (Roche) aufgereinigt und in das pGEM-T Vector System II Kit (Promega) nach Herstellerangaben ligiert. Die Transformation wurde mit kompetenten *E. coli* K12 JM109 (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Positive Kolonien wurden durch Blau Weiß-Selektion auf selektiven Platten („LAXI“, lt. Tabelle 8-4, Anhang) ermittelt. Durch das Wachstum von Kolonien auf den Antibiotika-haltigen Platten kann zum einen die erfolgreiche Aufnahme des Plasmids bestätigt werden, da der *E. coli*-Stamm nur so die entsprechende Antibiotika-Resistenz exprimieren und damit wachsen kann. Die weiße Farbe der positiven Klone bestätigt die erfolgreiche Ligation des Zielgenfragments in den Vektor, da das in der Multiple-Cloning-Site befindliche Gen, dessen Expression für die Blau-Färbung der Kolonien verantwortlich ist, bei erfolgreicher Ligation zerstört wird und so seine Funktionalität verliert. Positive (weiße) Kolonien wurden in 100-mL-Ansätzen mit LB-Medium (siehe Tabelle 8-4, Anhang) als Übernachtskulturen bei 37 °C inkubiert und die Kulturen für die Plasmid-Aufreinigung verwendet.

### 3.6.2 Plasmid-Aufreinigung und -Linearisierung

Für die weitere Herstellung von qPCR Standards wurde das Plasmid mit dem Purification Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aus der Zellkultur extrahiert und aufgereinigt. Die folgende Linearisierung des Vektors wurde mit dem Enzym Apal (Sigma-Aldrich) mit entsprechendem Puffer des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden 5 µg Plasmid-DNA zu 10 µL Puffer, 2,5 µL Enzym und 20 µL ultrareinem Wasser gegeben und der Ansatz für 6 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms fand anschließend für 15 Minuten bei 65 °C statt. Der geschnittene Vektor wurde in der Kapillargelelektrophorese überprüft und danach mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die resultierende DNA-Konzentration wurde laut Kapitel 3.3.2 mit dem Qubit-Nanophotometer bestimmt. Aus der Konzentration wurde mit Formel (3-1) die Zahl der Genkopien berechnet.

$$\frac{\text{Genkopien}}{\mu\text{L}} = \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \text{ DNA} \times \frac{\text{mol}}{660 \text{ g}} \times \frac{1}{n_i + n_v} \times \frac{6,023 \times 10^{23}}{10^6 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}} \frac{1}{\text{mol}} \quad (3-1)$$

Dabei ist 660 g/mol das durchschnittliche Molekulargewicht von Doppelstrang-DNA,  $6,023 \times 10^{23}$  die Anzahl der Teilchen pro Mol und  $n_i$  bzw.  $n_v$  die Anzahl der Nukleotide des Inserts bzw. Vektors (3000 bp). Die Lösung mit dem linearisierten Plasmid wurde auf  $10^9$  Genkopien/µL eingestellt, eine Verdünnungsreihe von  $10^8$ - $10^1$  Genkopien/µL angesetzt und diese in einer qPCR auf ihre Verwendbarkeit getestet.

## 3.7 Etablierung neuer Methoden zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen

### 3.7.1 Fraktions-basierte Untersuchungen in Wasser und Sediment-Partikeln

ARG und ARB können durch die landwirtschaftliche Nutzung von Schlamm aus Tierhaltungsbetrieben und Fermentationsrückständen oder den Eintrag von Kläranlagenabläufen kommunaler Abwässer in die Umwelt gelangen. Heute weiß man, dass die Umwelt einen ausschlaggebenden Faktor für die Verbreitung von Resistenzen darstellt (Li *et al.* 2020; Smalla *et al.* 2018; Westphal-Settele *et al.* 2018; Wintersdorff *et al.* 2016). Für die Weiterverbreitung der Resistenzen werden sowohl vertikale, als auch horizontale Gentransfer-Prozesse als sehr relevant eingestuft (Andersson und Hughes 2017; Bellanger *et al.* 2014, 2014; Cooper *et al.* 2017; Ibáñez-de-Aldecoa *et al.* 2017). Zum horizontalen Gentransfer zählen die Konjugation (artübergreifender Transfer von Genen zwischen Bakterien), die Transduktion (Übertrag von Genen durch Bakteriophagen) und die Transformation (Aufnahme freier DNA durch Bakterien). Das Vorkommen von ARG in der Bakterienfraktion, sowie in den Fraktionen Viren und freie DNA (eDNA) sind somit von großem Interesse für eine Abschätzung der Verbreitung und Persistenz von ARs in der Umwelt. Auch natürliche Ad- und Desorptionsprozesse von biologischen Molekülen oder Mikroorganismen an Sedimentpartikeln unterschiedlicher Größen in Seen, Grund- oder Fließgewässern, sowie Sedimentation und Suspension von Sedimentpartikeln können zur Ausbreitung von ARG beitragen und sind deshalb für die Methodenetablierung zur Untersuchung von Wasserproben auf Resistenzgene von großem Interesse. Es sollten geeignete Methoden zur Fraktionierung von Sedimentpartikeln, Bakterien, Viren und freier DNA mit Modellwasser und Modellbakterien, -viren und freier DNA in bekannten Konzentrationen auf die Wiederfindung und auf die unerwünschte Co-Fraktionierung nach der Separierung geprüft und die nötige Anwendung weiterer Bearbeitungsschritte wie DNA-Extraktion und qPCR getestet werden. Aufgrund des verbreiteten Einsatzes der Membranfiltration für die Bakterienfraktionierung, sollte diese auch hier verwendet werden. Jedoch sollte zusätzlich die Durchlässigkeit für Viren und eDNA bei dieser Filtration geprüft werden. Eine Aufkonzentrierung der freien DNA und der Viren im Filtrat soll zunächst durch Ultrafiltration (5 kDa MWCO) erfolgen und die Trennung der Viren- und DNA-Fraktionen aufgrund geringer Kosten und einfacher experimenteller Anwendung durch Adsorptionsmethoden getestet werden. Ziel war es, möglichst methodisch anspruchslöse Separierungsmethoden zu finden, die auch unter einfachen und limitierten Standort- oder Laborbedingungen, wie zum Beispiel der in-situ Probenahme und der anschließenden externen Probenverarbeitung, angewendet werden können.

#### 3.7.1.1 Kaskadenfiltration zur Untersuchung von Sediment-Partikel-assoziierten Antibiotikaresistenzen

Um Resistenzgene in Partikel-assoziierten Fraktionen verschiedener Größen, sowie Fraktionen  $< 0,2 \mu\text{m}$  (eDNA und Phagen) nachweisen zu können, wurde eine Kaskadenfiltration über Membranen mit unterschiedlicher Porengrößen (von  $5 \mu\text{m}$  bis  $0,2 \mu\text{m}$ ) durchgeführt, um zunächst unterschiedlich große Sedimentpartikel zu separieren und diese nach einer DNA-Aufreinigung mittels qPCR auf Resistenzgene zu untersuchen. Für die Kaskade wurden Polycarbonat-Membranen (PC) mit  $5$  und  $1,2 \mu\text{m}$  Porengröße (Merck) und Polyethersulfon (PES)-Membranen mit  $0,45$  und  $0,2 \mu\text{m}$  Porengröße (Supor, PALL) verwendet, die bereits in anderen Studien erfolgreich zum späteren Nachweis mittels qPCR genutzt wurden (Calero-Cáceres *et al.* 2014; Lekunberri *et al.* 2017; Liang und Keeley 2013). Eine Modellprobe von insgesamt  $10 \text{ mL}$  mit den in Tabelle 3-8 aufgelisteten Komponenten wurde auf Basis von Reinstwasser angesetzt. Eine Vakuumfiltrationseinheit aus Kunststoff wurde für die nacheinander geschalteten Filtrationen genutzt. Das Filtrat wurde jeweils in einem unter der Membran platzierten sterilen  $50 \text{ mL}$  Gefäß aufgefangen und für die weitere Analyse verwendet.

Tabelle 3-8 Modell-Komponenten und deren Konzentrationen für Vorversuche zur Kaskadenfiltration.

Komponente	Konzentration in Reinstwasser
<i>Escherichia coli</i> DSM 1103	10 <sup>6</sup> Zellen/mL
eDNA-Fragment <i>intl1</i> (196 bp)	1 mg/L
eDNA-Fragment <i>sul2</i> (722 bp)	1 mg/L
Bakteriophage phiX174 DSM 4497	10 <sup>9</sup> Phagen/mL
Silica-Partikel (sicastar® plain, Micromod, 100 & 500 nm)	Je 50 mg/mL

### 3.7.1.2 Fraktionierung von Phagen und freier DNA aus aquatischen Umweltproben

Nach der Kaskadenfiltration sollte das Filtrat zunächst durch eine Rührzellen-Ultrafiltration (Amicon Stir Cell 400, Merck Millipore) aufkonzentriert werden, um anschließend eine Fraktionierung der freien DNA (eDNA) und Phagen durch Adsorption bzw. enzymatischen DNA-Verdau durchzuführen (Yang *et al.* 2018). Hierbei wurden verschiedene Bedingungen getestet: Eine vorherige Benetzung des Filters mit 250 mM AlCl<sub>3</sub>-Lösung kann zum Rückhalt von Phagen führen, die auch im Hinblick auf die Wiederfindung von freier DNA getestet werden sollte (Haramoto *et al.* 2005). Für die folgende weitere Fraktionierung von eDNA und Phagen wurde eine adsorptive und eine enzymatische Methode getestet. Die Probe bestand hierbei aus zuvor replizierten ARG-Fragmenten als eDNA mit je 10<sup>9</sup> GC/mL in der Arbeitslösung (*ermB* mit 405 bp und *vanA* mit 1030 bp), sowie 10<sup>9</sup> Phagen/mL Arbeitslösung des Bakteriophagen phiX174. Für die adsorptive Separierung wurde eine Silicasäule laut Herstellerangaben equilibriert, mit der Modellprobe beladen, gewaschen und die eDNA anschließend eluiert (Plasmid Purification Midi Kit, Qiagen). Für die enzymatische Methode wurde DNase I (Thermo Fisher) mit einer Endkonzentration von 100 U/mL zur Modellprobe gegeben, 1 h bei 37°C inkubiert und die Phagen DNA anschließend mit dem Virus DNA/RNA Extraktionskit (IPC16 innuPREP, Analytik Jena) lt. Herstellerangaben extrahiert. Die Inaktivierung der DNase wurde durch die im Kit enthaltene Zugabe von Proteinase K gewährleistet.

## 3.7.2 Etablierung von kulturbasierten Verfahren zum Nachweis von antibiotikaresistenten Umweltbakterien

### 3.7.2.1 Vorversuche zur Etablierung der Methode

Um resistente Bakterien im Kulturverfahren zu erfassen, werden bislang vor allem spezielle und selektive feste Medien angewendet. Bei den von MAST Diagnostica erhältlichen chromogenen Standardmedien für ESBL-bildende *Enterobacterales* kann eine grobe Zuordnung der Kolonien zu bestimmten Bakteriengruppen anhand der Koloniefarbe erfolgen. Eine weitergehende Bestimmung der Bakterienart (z.B. mittels MALDI-TOF-MS) ist jedoch nötig. Abbildung 3-8 zeigt schematisch die Vorgehensweise der Bakterienisolation auf dem selektiven Medium.

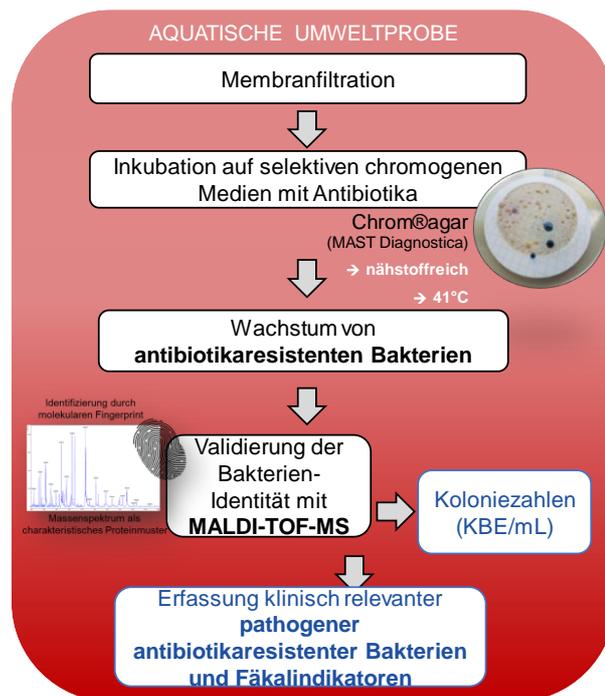


Abbildung 3-8 Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien mit hygienischer Relevanz auf nährstoffreichen Selektivmedien mit Antibiotika.

Schreiber *et al.* (2021) konnten zeigen, dass die Anwendung der chromogenen Selektivmedien auch für die Untersuchung von Oberflächen-, Grund- und Trinkwässern auf hygienisch relevante Kolonien angewendet werden kann. Im Rahmen eines großen Verbundprojektes wurden Kulturverfahren für die Untersuchung von aquatischen Umweltproben vereinheitlicht und es wurde gezeigt, dass ARB mit klinischer Relevanz vor allem in Oberflächenwässern, nicht jedoch in Grundwasser verbreitet sind (Schwartz und Schmithausen 2020). Oligotrophe ARB in der aquatischen Umwelt sind gegenüber den ARB mit klinischer Relevanz (darunter Pathogene und Fäkalindikatoren) für eine Risikobewertung nicht zu vernachlässigen (Berendonk *et al.* 2015). Weltweit werden auch in Grund- und Trinkwässern immer wieder ARG detektiert. Diese stehen meist nicht mit dem Auftreten solcher klinisch relevanter Keime in Verbindung, was ein Indiz für ein hohes Vorkommen der ARG in Umweltbakterien ist. Hinsichtlich dieser Vermutungen sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Kulturverfahren etabliert werden, das es erlaubt, auch die resistenten Umweltbakterien zu isolieren. Aufgrund der hohen Relevanz von Resistenzen gegen Cephalosporinen der 3. und 4. Generation und Carbapeneme (Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika), die in den von der WHO als besonders „kritisch“ eingestuften Pathogenen vorkommen (WHO 2017), wurde der Fokus für die Entwicklung solcher Kulturverfahren auf  $\beta$ -Laktam resistente Umweltbakterien gelegt. Vor allem die hohe klinische Relevanz von Carbapenem-resistenten Stämmen ist alarmierend, da diese Antibiotika in Deutschland und vielen anderen Ländern als Reservesubstanzen eingestuft sind. Sie werden als letztes Mittel eingesetzt, wenn andere Antibiotika bei der Behandlung der bakteriellen Infektion unwirksam sind (GERMAP 2015). Anhand von Literaturrecherchen wurden Antibiotika und deren Konzentrationen ausgewählt. In Tabelle 3-9 sind Publikationen zusammengefasst, in denen die Zugabe verschiedener Kombinationen von Cephalosporinen und Carbapenemen zu nährstoffreichen Medien zwecks der Isolation von  $\beta$ -Laktamase- oder ESBL-produzierenden Bakterien mit klinischer Relevanz beschrieben ist. Auch Publikationen, die chromogene ESBL-Vollmedien verwendeten sind aufgeführt.

Tabelle 3-10 fasst Quellen zusammen, die die Verwendung von mit Antibiotika versetzten R2A Medien beschreiben. Zur Orientierung des Kohlenstoff-Gehaltes der publizierten Medien, ist in Abbildung 3-9 die ungefähre Kohlenstoff (C)-Konzentration aufgelistet. Da Kohlenstoff bei allen publizierten Medien in Form von Pepton, Hefe- oder Fleischextrakten zugegeben wurde, ist die C-Konzentration lediglich als Richtwert einzustufen. Da der Konzentrationsbereich aller eingesetzten Antibiotika im mg/L Bereich liegt, wurden die Zusammensetzungen von Rupp und Fey (2003) (2 mg/L Cefotaxim, 2 mg/L Ceftazidim, 4 mg/L Cefpodoxim, im Folgenden als BL1 abgekürzt) und Diab *et al.* (2018) (2 mg/L Meropenem, 4 mg/L Ceftazidim, im Folgenden als BL2 abgekürzt) exemplarisch als Grundlage für erste Experimente ausgewählt. Auch in Berichten der WHO (2017) und RKI (2021) werden Resistenzen gegen Antibiotika aus den entsprechenden Gruppen als höchst prioritär angesehen, was die Verwendung dieser Substanzen bestätigt. Die Konzentrationen wurden im Vergleich zu den Empfehlungen z.B. der HPA (UK Health Protection Agency, überarbeitet in Pitout und Laupland 2008) höher gewählt, um leicht reduzierte Zellzahlen zu erhalten, was eine detailliertere Datenauswertung ermöglicht.

Tabelle 3-9 Zusammensetzungen verschiedener in der Literatur beschriebener Kohlenstoff-reicher Medien für die Isolation von antibiotikaresistenten/  $\beta$ -Laktamase-produzierenden Bakterien.

Referenz	Medien	AB-Zusammensetzung	Anwendung	Inkubation
Rupp und Fey 2003	Müller-Hinton Agar	1 mg/L Cefotaxim* 1 mg/L Cefazidime* 4 mg/L Cefpodoxim*	Isolation ESBL-produzierender Enterobakterien mit klinischer Relevanz	n.a., 24 h
Glupczynski <i>et al.</i> 2007	McConkey Agar	2 mg/L Ceftazidim*	Isolation ESBL-produzierender Enterobakterien aus klinischen Proben	37 °C, 18 - 48 h
Réglier-Poupet <i>et al.</i> 2008	ChromID Agar (bioMérieux)	Cefpodoxim* (Konz. unbekannt)	Isolation ESBL-produzierender Enterobakterien aus klinischen Proben	37 °C, 24 - 48 h
	BLSE Agar (McConkey and Drigalski)	1,5 mg/L Cefotaxim* 2 mg/L Ceftazidim*	Isolation ESBL-produzierender Enterobakterien aus klinischen Proben	37 °C, 24 - 48 h
Girlich <i>et al.</i> 2019	CHROMAgar™ ESBL/mSuperCARBA (MAST Group)	"Selektiver Mix" (Konz. Unbekannt)	Isolation von ESBL- und Carbapenemase-produzierenden Enterobacteriaceae aus angereicherten Stuhlproben	37 °C, 24 h
Gekenidis <i>et al.</i> 2018	Brilliance ESBL plates (Oxoid)	"Selektiver Mix" (Konz. Unbekannt)	Isolation antibiotikaresistenter Indikatorbakterien aus Beregnungswasser	37 °C, 48 h
	CHROMAgar (MAST Group)	1 mg/L Ciprofloxin 8 mg/L Ceftazidim*	Isolation antibiotikaresistenter Indikatorbakterien aus Beregnungswasser und Biotypisierung mit MALDI-TOF	37 °C, 24 h
Haberecht <i>et al.</i> 2019	CHROMAgar ESBL (DRG Diagnostics)	"Selektiver Mix" (Konz. Unbekannt)	Isolation antibiotikaresistenter <i>Escherichia coli</i> aus der aquatischen Umwelt	37 °C, 24 h
Naiemi <i>et al.</i> 2009	BLSE Agar (McConkey and Drigalski)	1,5 mg/L Cefotaxim* 2 mg/L cetazidime*	Isolation ESBL-produzierender Enterobacteriaceae aus klinischen Proben	37 °C, 18 - 24 h
	ESA (MacConkey Agar)	1 mg/L Cefotaxim* 1 mg/L Ceftazidim*	Isolation ESBL-produzierender Enterobacteriaceae aus klinischen Proben	37 °C, 18 - 24 h
Adelowo <i>et al.</i> 2018	1) Müller-Hinton Agar	6 mg/L Ceftazidim*	Isolation ESBL-produzierender Enterobacteriaceae aus klinischen	35 °C, 18 - 24 h
	2) Eosin Methylen Blau	6 mg/L Cefpodoxim*	Abwässern, Flüssen	
Diab <i>et al.</i> 2018	McConkey Agar	4 mg/L Ceftazidim* 2 mg/L Meropenem**	Isolation ESBL-produzierender Enterobacteriaceae aus Schachtbrunnen, Quellwasser and Flussmündungen	37 °C, 24 h
Caltagirone <i>et al.</i> 2017	1) McConkey Agar	8 mg/L Cefotaxim*	Isolation ESBL-produzierender Enterobacteriaceae aus Brunnen, Flusswasser und Kläranlagen	37 °C, 24 h
	2) Plate Count Agar			
Schreiber <i>et al.</i> 2021	ESBL CHROMAgar (Mast Diagnostica)	"Selektiver Mix" (Konz. Unbekannt)	Isolation und Differenzierung von ESBL-produzierenden Bakterien und Carbapenem-resistenten Bakterien aus der aquatischen Umwelt	37 °C, 18 - 24 h
Oh <i>et al.</i> 2019	Tryptic soy broth	keine ABs, anschließende Empfindlichkeitsprüfung	Isolation resistenter <i>Janthinobacterium lividum</i> aus infizierten Fischen	20 °C, 48 h

\*Cephalosporine der 3. und 4. Generation

\*\*Carbapeneme

Tabelle 3-10 Zusammensetzungen verschiedener in der Literatur beschriebener Kohlenstoff-arter Medien für die Isolation von zum Teil antibiotikaresistenten oligotropher Bakterien.

Referenz	Medien	AB-Zusammensetzung	Anwendung	Inkubation
Schwartz <i>et al.</i> 2003	R2A	32 mg/L Ceftazidim*	Isolation antibiotikaresistenter Bakterien aus Abwasser-, Oberflächenwasser- und Trinkwasser -Biofilmen	22 °C, 7 d
		32 mg/L Cefazolin		
Oh <i>et al.</i> 2009	1) 10*x verd. LB	100 mg/L Tetracyclin	Isolation antibiotikaresistenter Bakterien aus Umweltproben,	25 °C, 72 h
	2) R2A	100 mg/L Vancomycin		
Siedlecka <i>et al.</i> 2020	R2A	8 mg/L Ceftazidim*	Isolation antibiotikaresistenter Bakterien aus Trinkwasser-Verteilungssystemen	22 °C, 7 d
Chakraborty <i>et al.</i> 2013	1) NPA	keine ABs	Isolation fakultativ oligotropher Bakterien aus Flusswasser	30 °C, 72 h
	2) R2A			
Garcia-Armisen <i>et al.</i> 2013	1) R2A	4 und 50 mg/L Amoxicillin	Isolation und Identifikation antibiotikaresistenter Bakterien aus Flusswasser	20 °C, 7 d
	2) DNB (100 x verd. Nutrient Broth)	4 und 300 mg/L Tetracyclin		
	3) LB	16 to 300 mg/L Sulfomethaxol		
Piotrowska <i>et al.</i> 2017	R2A	10 mg/L Streptomycin	Isolation antibiotikaresistenter Bakterien aus Sedimenten und Krabbenzucht-Wässern und Identifikation durch 16S rRNA	Raumtemp., 24 - 48 h
		10 mg/L Tetracyclin 10 mg/L Erythromycin		
Yasir 2018	1) R2A	keine ABs, anschließende Empfindlichkeitsprüfung	Analyse bakterieller Gemeinschaften und Charakterisierung antibiotikaresistenter Stämme in Höhlenmikrobiomen und	17 und 37 °C, 7 d
	2) R2A halb konzentriert			
Zhang <i>et al.</i> 2018a	R2A	16 mg/L Rifampin	Isolation von <i>Cupriavidus metallidurans</i> von Trinkwasser-Filtern	28 °C, 48 h

\*Cephalosporine der 3. und 4. Generation

\*\*Carbapeneme

Medium	C- Konzentration [g/L]
Drigalski Agar	36
Müller-Hinton Agar	32
McConkey Agar	30
Tryptic soy broth	22,5
Chrom Agar	22
Eosin Methylen Blau	20
Plate Count Agar	8,5
R2A	2,8
R2A (1:2)	1,4
NPA	0,2
NB (1:100)	0,02
LB (1:1000)	0,0015

Verwendung von Trypton, Pepton, Hefe- oder Fleischextrakten bei allen Medien!

Abbildung 3-9 Richtwert für Kohlenstoff (C)-Konzentration in den in Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10 aufgeführten Medien.

Da bisher der Fokus bei der Isolation von ESBL-produzierenden Bakterien meist auf klinisch relevanten Enterobakterien lag, sind die in Tabelle 3-9 Studien häufig auf Basis nährstoffreicher Medien durchgeführt worden. Für die Isolation von Umweltbakterien sind hingegen angepasste Inkubationsbedingungen und ein reduziertes Nährstoffangebot notwendig. Das R2A Medium nach Reasoner und Geldreich (1985) ist ein gängiges Medium, um oligotrophe Organismen aus der aquatischen Umwelt zu isolieren (Zengler *et al.* 2002). Im Zusammenhang mit der Detektion von Resistenzen in Umweltisolaten wurde es bereits in vielen Studien angewendet (Chakraborty *et al.* 2013; Garcia-Armisen *et al.* 2013; Piotrowska

et al. 2017; Yasir 2018; Zhang et al. 2018a). Es enthält nur eine geringe Menge organisches Substrat (2,8 g/L) und ist somit optimal auf den Lebensraum oligotropher Organismen angepasst. Die Inkubation findet dabei auch unter angepassten Bedingungen statt, um den langsam wachsenden Umweltstämmen bei 21 °C und 2 bis 10 Tagen das Wachstum zu ermöglichen. Für die durchgeführten Versuche wurden 2 Tage Inkubationszeit gewählt, um die Praktikabilität zu gewährleisten. Yasir (2018) verwendete das R2A Medium halbkonzentriert, sowie niedrigere Inkubationstemperaturen um eine optimierte Isolation der gewünschten Umweltbakterien zu erzielen. Die Verwendung von halbkonzentriertem R2A Medium wurde auch für diese Arbeit getestet. Da Oberflächen- und Grundwasser Temperaturen von 10 bis 20 °C aufweisen, wurde zusätzlich zu den von Reasoner und Geldreich (1985) empfohlenen 21 °C eine Inkubationstemperatur von 12 °C getestet, wofür die Inkubationszeit aufgrund langsameren Wachstum auf 4 Tage erhöht werden musste. In Tabelle 3-11 sind die in den Vorversuchen zur Methodenetablierung getesteten Inkubationsbedingungen zusammengefasst. Zusätzlich wurde im ersten Schritt getestet ob sich die direkte Ausplattierung einer Wasserprobe, oder die Membranfiltration besser eignet. Aufgrund von besserer Differenzierbarkeit der Isolate und Vergleichbarkeit mit anderen etablierten Kulturverfahren, wurde die Membranfiltration (siehe Kapitel 3.4.1) und Inkubation des Filters auf den Medien als Methode der Wahl eingesetzt (siehe Anhang 8.4.1.1 für Bilder der Agarplatten).

Tabelle 3-11 Inkubationsbedingungen für die Vorversuche zur Etablierung kulturbasierter Verfahren zum Nachweis  $\beta$ -Laktam resistenter Umweltbakterien.

	R2A			1/2 R2A		
	ohne AB	BL1	BL2	ohne AB	BL1	BL2
12°C, 4 Tage		1 mg/L Cefotaxim 1 mg/L Ceftazidim 4 mg/L Cefpodoxim	4 mg/L Ceftazidim 2 mg/L Meropenem		1 mg/L Cefotaxim 1 mg/L Ceftazidim 4 mg/L Cefpodoxim	4 mg/L Ceftazidim 2 mg/L Meropenem
21°C, 2 Tage		1 mg/L Cefotaxim 1 mg/L Ceftazidim 4 mg/L Cefpodoxim	4 mg/L Ceftazidim 2 mg/L Meropenem		1 mg/L Cefotaxim 1 mg/L Ceftazidim 4 mg/L Cefpodoxim	4 mg/L Ceftazidim 2 mg/L Meropenem

Für die Vorversuche wurden drei Oberflächenwasser verwendet (Ruhr, Stever, Rhein vom Dezember 2019, siehe Tabelle 3-1). Die Proben wurden entsprechend in mehreren Verdünnungen ( $10^{-1}$ - $10^{-3}$  mit 0,9 % NaCl) filtriert, um den Bereich einer auswertbaren Kolonienzahl zwischen 1 und 200 koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL zu erreichen.

### 3.7.2.2 Untersuchung von Oberflächenwasser Proben auf $\beta$ -Laktam resistente Umweltbakterien

Auf Basis der Vorversuche wurde R2A Medium mit (a) 2 mg/L Cefotaxim, 2 mg/L Ceftazidim, 4 mg/L Cefpodoxim nach Rupp et al. (2003) (BL1) und (b) 2 mg/L Meropenem, 4 mg/L Ceftazidim nach Diab et al. (2018) (BL2) versetzt. Zusätzlich wurde das R2A-Medium auch ohne Antibiotika verwendet, um oligotrophe Bakterien im Allgemeinen zu isolieren. Verschiedene Volumina von 0,05 bis 0,5 sowie 1, 10 oder 100 mL, je nach Probentyp, wurden durch einen Filter (0,45  $\mu$ m Porengröße, EZ-Pak, Merck Millipore) vakuumfiltriert, um mindestens 1 und maximal 200 Kolonien zu erhalten. Der Filter wurde 48 Stunden lang bei 21 °C auf dem Agar bebrütet. Die KBE pro mL wurden nach DIN EN ISO 8199 berechnet, indem die Gesamtzahl der Kolonien auf mindestens zwei und höchstens drei Agarplatten mit unterschiedlichem Filtervolumen dividiert durch das Gesamt-Filtrationsvolumen gezählt wurde. Eine oder mehrere Kolonien, die sich phänotypisch von den anderen unterschieden, wurden auf antibiotikafreien R2A-Agar übertragen und erneut für 48 h bei 21 °C bebrütet, um anschließend eine MALDI-TOF-MS (Bruker) basierte Stammidentifizierung gemäß den Herstelleranweisungen und weitere Mikrodilutionstests zur Bestimmung des von den Isolaten exprimierten  $\beta$ -Laktamase-Typs durchzuführen. Die meisten Kolonien wurden bei -75°C mit dem KRYOBANK-System (MAST Diagnostica) kryokonserviert.

### 3.7.3 Etablierung von Long-Amplikon (LA) qPCR Methoden zum Nachweis intakter Antibiotikaresistenzgene

Für die Etablierung von qPCR-Methoden, die einen quantitativen Nachweis ganzer Resistenzgene aus Umweltproben ermöglichen, wurden Primer auf der Basis vollständiger ARG-Sequenzen aus der CARD-Datenbank designt, diese auf Umweltproben angewendet um die entsprechenden LA-Fragmente zu generieren und anschließend Standards für die qPCR herzustellen. Nach erfolgreicher Etablierung der qPCR wurden die Methoden im Vergleich mit den konventionellen „short“ Amplikon qPCR auf Modell- und Rohwasser-Proben angewendet und in Behandlungsexperimenten eingesetzt. Der gesamte Ablauf zur Etablierung von LA qPCR Methoden für ARG ist als Übersicht in Abbildung 3-10 gezeigt.



Abbildung 3-10 Nötige Schritte für die Etablierung neuer LA qPCR Methoden für die Detektion von Antibiotikaresistenzgenen.

#### 3.7.3.1 Primer-Design

Als Templates für das Design von Primern im Zuge der Etablierung von Long-Amplikon qPCR (LA qPCR) Methoden für ARG wurden die Gensequenzen aus der CARD-Datenbank verwendet (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, <https://card.mcmaster.ca/>). Die verwendeten Gensequenzen sind im Anhang 8.5.1. aufgelistet. Die Oligonukleotide wurden entsprechend ihres GC-Gehalts, ihrer Basenabfolge, ihrer 3' GC-Clamp und ihrer Schmelztemperatur ( $T_m$ ) teilweise durch den Austausch einzelner Basen angepasst. Dabei wurde nach den Kriterien laut Kumar und Chordia (2015) vorgegangen: Die  $T_m$  soll 55-60 °C betragen, bei einem GC-Gehalt von 30 bis maximal 80 %. Außerdem wurde beachtet, dass keine Basenrepetitionen auftreten (z.B. TTTT) und am 3'-Ende des Oligonukleotids nur noch G- und C-Basen vorkommen, was eine verbesserte Bindestabilität am DNA-Template-Strang gewährleisten soll.

Ein erster Test der Primer-Kombinationen wurde in-silico durch den Primer-BLAST Tool der NCBI-Datenbank durchgeführt (Ye *et al.* 2012). Hierfür wurden die Primer-Sequenzen in die Maske eingegeben. Von den gesetzten Einstellungen wurde lediglich der Eintrag in „Organism“ entfernt und als „Database“ >nr< eingestellt. Nach anschließendem Starten des BLASTs wurden nach einiger Berechnungszeit theoretische Fragmente angezeigt, die durch Annealing dieser eingefügten Primer ermittelt werden konnten. Diese Sequenzen wurden auf ihre Gen-Zugehörigkeit und Fragment-Länge überprüft. Somit konnte in einer ersten theoretischen Analyse, basierend auf der NCBI-Gen-Datenbank, getestet werden, ob die gewünschten PCR Produkte auch experimentell erzielt werden könnten.

Nach erfolgreichem in-silico-Test wurden die Primer bei Thermo Fisher Scientific bestellt und auf Umweltproben oder Isolate für einen ersten in-vitro Test angewendet. Für die anschließende Amplifizierung der ARG-Fragmente mit den entsprechenden Primerpaaren, wurden Standards für die qPCR Methode laut Kapitel 3.6 hergestellt. Nach erfolgreicher

Herstellung der Standardfragmente für die qPCR und Einstellung deren Konzentration mittels photometrischer Vermessung auf  $10^8$  GC/Reaktion, wurden die optimalen Annealing-Temperaturen und Schmelztemperaturen der LA-Fragmente experimentell in einer Gradienten PCR lt. Kapitel 3.3.3.3 ermittelt. Zum Vergleich wurden die Schmelztemperaturen der erwarteten Fragmente vorab anhand von Gleichung (3-2) berechnet (Tsai 2007) mit % GC als prozentualer GC-Gehalt des Fragmentes der mit dem online-Tool von biologicscorp.com ermittelt wurde.

$$T_m = 69,3 + 0,41 \cdot (\% GC) \quad (3-2)$$

### 3.7.3.2 Behandlungsexperimente zum Vergleich der Short und Long-Amplikon qPCR

Reaktive Wasserbehandlungsverfahren, wie UV-Bestrahlung, Chlorung oder Ozonung, entfalten ihre Wirkung zum einen durch Zerstörung der bakteriellen Zellen, zum anderen durch Reaktion mit der bakteriellen DNA. Es können sich DNA Bruchstücke oder Dimere zwischen den einzelnen Basen bilden, was dazu führt, dass die Erbinformation nicht mehr abgelesen werden kann und somit die Proteinbiosynthese gestoppt wird. In einem Großteil der verfügbaren Literatur über die Elimination von ARG in Wasserbehandlungsverfahren, erfolgt der Nachweis der ARG über qPCR mit kurzen Fragmenten von 100 bis 300 bp. Da es sich dabei nur um einen kleinen Teil der eigentlichen ARG-Sequenz handelt, kann es zu einem positiven Nachweis nach einer solchen Behandlung kommen, obwohl das Gen nicht mehr intakt ist. In UV-Bestrahlungs- und Chlorungs-Experimenten mit intra- und extrazellulär vorliegenden ARG sollte gezeigt werden, dass die Reduktion der ARG durch die Behandlungen durch die Anwendung der LA qPCR deutlich besser abgebildet werden kann, als durch die konventionell etablierten Methoden.

Für die Versuche wurden Modellproben auf Basis von sterilem Reinstwasser angesetzt. Die in Tabelle 4-2 aufgeführten Primer für *blaTEM* und *sul1* wurden verwendet, um die entsprechenden Genfragmente in einer PCR zu amplifizieren. Die Konzentration der *sul1*-PCR-Produkte, mit einer Genlänge von 840 bp, wurde mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) aufgereinigt und mit dem Qubit Nanophotometer (life technologies) nach Anfärbung der DNA mit dem Qubit® dsDNA BR Kit vermessen und laut Gleichung (3-1) auf eine Konzentration von  $10^9$  GC/mL eingestellt. Die gleichermaßen aufgereinigten und vermessenen Fragmente des *blaTEM*-Gens mit einer Länge von 861 bp wurden verwendet um sie, wie bei der Standardherstellung, in das pGEM-T Vektorsystem zu ligieren und anschließend in den kompetenten *E. coli* Stamm JM109 zu klonieren (siehe Kapitel 3.6.1 und 3.6.2). Nach der Klonierung wurden die Zellen in LB-Medium mit 50 µg/mL Ampicillin unter Schütteln bei 37 °C kultiviert, durch Zentrifugation bei 2000 x g für 10 min geerntet und in sterilem Leitungswasser resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Durchflusszytometrie vermessen und die Arbeitslösung auf  $10^5$  Zellen/mL eingestellt. Mit der am Tag der Durchführung frisch angesetzten Arbeitslösung (bestehend aus  $10^9$  GC/mL frei vorliegenden *sul1*-Fragmenten und  $10^5$  Zellen/mL mit *blaTEM* klonierten *E. coli*) wurden Chor- und UV-Behandlungsexperimente durchgeführt.

Für das Chlorbehandlungs-Experiment wurden die Wasserproben, die mit exemplarischen Bakterien und Resistenzgenfragmente versetzt wurden, in sterile 100-mL-Glasflaschen transferiert. Natriumhypochlorit wurde aus einer standardisierten Stammlösung (ca. 120 mg/L) zugegeben, um verschiedene Konzentrationen (0-1,5 mg/L, in Duplikaten) an freiem Chlor zu erhalten. Die Proben wurden vorsichtig von Hand gemischt und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentrationen von freiem Chlor und Gesamtchlor wurden mit einem NANOCOLOR® Röhrchentest (Macherey-Nagel) gemessen. Nach einer Kontaktzeit von 30 min wurde Natriumthiosulfatlösung (1,5%) zugegeben, um die Reaktion zu beenden.

Die UV-Behandlung wird nach einem standardisierten Protokoll von Bolton *et al.* (2015) eine kollimierte Niederdruck-Strahlenbestrahlung bei 253,7 nm in Duplikaten durchgeführt. Das UV-Gerät (siehe Abbildung 3-11) enthält eine Niederdruck-Quecksilberlampe, die horizontal in einem Gehäuse montiert ist. Die Unterseite des Gehäuses hat eine kreisförmige Öffnung oder Blende, die es ermöglichte, UV-Licht zu der unter der Öffnung befindlichen Probe durchzulassen. Von der Probe werden 10 mL in sterile Petrischalen (94 mm) gefüllt und auf einem Magnetrührer unter der Öffnung des UV-Gerätes platziert.

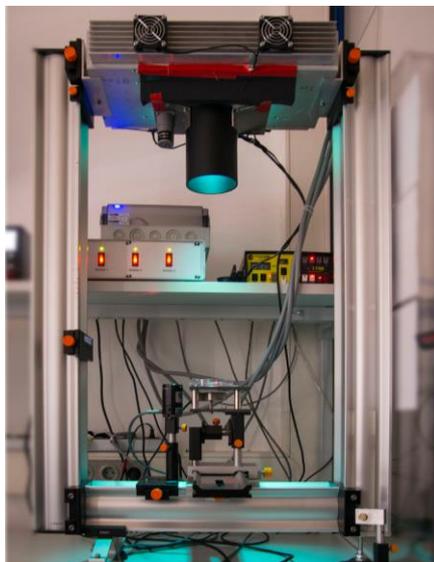


Abbildung 3-11 Kollimiertes Bestrahlungssystem zur Niederdruck-Bestrahlung von Proben bei 253,7 nm.

Die Bestrahlungsstärke wurde mit dem Referenzradiometer IL Metronic MUV 2.4 (Sensortechnik GmbH) bestimmt. Die an die Suspension abgegebene Dosis wurde mit Hilfe der integrierten Software berechnet, die eine Reihe messbarer Faktoren berücksichtigt, darunter die einfallende Bestrahlungsstärke, die Gleichmäßigkeit des Bestrahlungsfeldes, die Ultraviolett-Transmission der Probe, die Reflexion an der Probenoberfläche und die Divergenz des Strahls beim Eintritt in die Probe. Verschiedene Bestrahlungsenergien (0-800 J/m<sup>2</sup>, in Duplikaten) werden durch die Anwendung unterschiedlicher Belichtungszeiten eingestellt. Nach der Bestrahlung wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Nach den Behandlungen und der Abstopfung der Versuche durch Natriumthiosulfat (Chlor-Experimente) oder Dunkelheit (UV-Versuche) wurden jeweils Proben für die direkte qPCR-Analyse der freien ARG entnommen sowie Proben, die anschließend zur DNA-Extraktion der intrazellulären ARG mit dem Bacterial XPress Kit (Merck Millipore) verwendet wurden.

### 3.8 Laborversuche zur Elimination von Resistenzgen-Fragmenten durch Layer-by-Layer beschichtete und unbeschichtete Ultrafiltrations-Membranen

Für die Versuche zum Rückhalt von DNA-Fragmenten wurden PES Ultrafiltrations (UF)-Membranen der Firma Inge GmbH verwendet (Multibore®, 100 kDa MWCO, DuPont). Dafür wurden spezielle Einzelfasermodule mit einer Fläche von 0,05 m<sup>2</sup> und einem Totvolumen von ca. 12 mL verwendet (siehe Abbildung 3-12). Eine spezielle Layer-by-Layer-Beschichtung, bei der alternierend Polykationen (Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC), 20% Lösung, MW 250–350 kDa, Sigma Aldrich) und Polyanionen (Poly-(4-styrenesulfonsäure) (PSS), MW 1000 kDa, Sigma Aldrich) auf die Membranoberfläche aufgebracht werden, wurde von der Firma Surflay Nanotec GmbH entwickelt und in den beschriebenen Experimenten vergleichend getestet. Durch die innovative Beschichtungstechnologie für UF-Membranen kann ein hoher Flux durch die UF-Membran-Basis mit einer erhöhten Filtrationsleistung durch

die Beschichtung erreicht werden. Dabei wird der Rückhalt von Ionen und geladener organischer Moleküle, wie DNA, durch die geladenen Oberflächeneigenschaften der Beschichtung zusätzlich beeinflusst. Die Beschichtung kann je nach Anwendung somit speziell auf den zurückzuhaltenden Stoff angepasst werden. Für das Experiment zum Rückhalt von DNA-Fragmenten wurden zwei Beschichtungsarten verglichen. Bei 4DL wurden insgesamt vier Doppelschichten der Polyan- bzw. Polykationen aufgebracht, mit PDADMAC (positives Zeta-Potential) als primäre Schicht direkt auf der Membranoberfläche. Bei 4,5DL wurde eine zusätzliche Schicht PSS (negatives Zeta-Potential) als primäre Schicht vor den vier Doppelschichten PDADMAC/PSS aufgetragen. Beide Module (4DL und 4,5DL) wurden mittels PEG-Filtration charakterisiert und wiesen einen Cut-Off von ca. 384 Da auf, was dem Cut-Off von Nanofiltrationsmembranen gleicht (Niestroj-Pahl *et al.* 2020).

Für die Herstellung der ARG-Fragmente wurden Resistenzgene mit definierter Länge zu autoklaviertem Reinstwasser dosiert. Die Fragmente wurden mit spezifischen Primern (siehe Tabelle 3-12) mittels PCR amplifiziert und anschließend mit Nuklease-freiem Wasser (UltraPure™ Distilled Water, Thermo Fisher) auf definierte Konzentrationen von ca.  $10^6$  Genkopien/ $\mu\text{L}$  in der Arbeitslösung nach fluorometrischer Messung der DNA-Konzentration mit dem Qubit Nanophotometer verdünnt.

Tabelle 3-12 Verwendete Genfragmente für Filtrationsexperimente. Die Molekülgrößen wurden durch die Eingabe der Gensequenz des Amplifikats mit dem Tool Nuc-MW von EnCor-Biotechnology Inc. berechnet.

Gen	Amplikon-Länge [bp]	Molekülgröße der dsDNA [kDa]	Primer/ Referenz
<i>16S rDNA</i>	1500	941	Hendrickson <i>et al.</i> (2002)
<i>vanA</i>	1030	641	Clark <i>et al.</i> (1993)
<i>sul2</i>	722	446	Maynard <i>et al.</i> (2003)
<i>ermB</i>	405	263	Gevers <i>et al.</i> (2003)
<i>intl1</i>	196	212	Barraud <i>et al.</i> (2010)
<i>mecA</i>	91	56	Volkman <i>et al.</i> (2004)

Die aufgelisteten Gene wurden aufgrund ihrer Fragment-Längen für die etablierten qPCR-Reaktionen und ihrer Relevanz in Umweltwasserproben ausgewählt. Vor und nach der Membranfiltration (insgesamt 1 bis 5 Stunden Filtrationsprozess) wurden eine Feed-Probe und eine Probe des vereinten und gemischten Permeats entnommen und als Vorlage für die qPCR verwendet. Zusätzlich wurde eine Probe des Retentats nach Abschluss des Filtrationsprozesses entnommen.

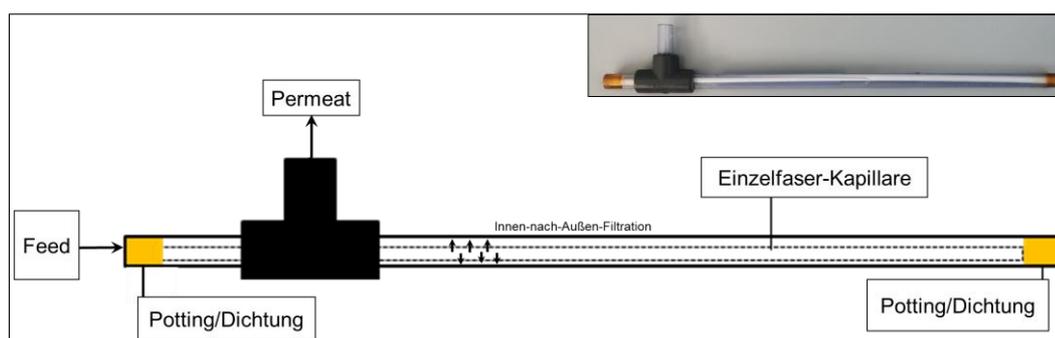


Abbildung 3-12 Modul mit einer modifizierten Einzelfaserkapillare für die ARG-Filtrationsexperimente.

Um die Wirkung der LbL-Beschichtung zu bewerten, wurden unbeschichtete und beschichtete PES-Membran-Kapillaren für die Filtrationen verwendet. Die Arbeitslösung wurde mit einer Peristaltikpumpe durch die Module gepumpt. Vor dem Betrieb mit der ARG-Lösung wurden alle Module mit sterilem Reinstwasser betrieben, um die mit Glycerin konservierten Trockenmodule zu rehydrieren und die Durchflussrate zu bestimmen. Die Flussraten für die durchgeführten Dead-End-Filtrationen unterschieden sich geringfügig zwischen den getesteten Kapillaren und lagen zwischen 0,9 und 2,2 mL/min. Alle Schläuche und Adapter

wurden zuvor mit einer 500 ppm NaOCl-Lösung und destilliertem Wasser gespült. Der Aufbau des Experimentes ist in Abbildung 3-13 dargestellt.



Abbildung 3-13 Aufbau der Filtrations-Versuche mit Einzelfaser-Membranen. 1) Reservoir mit ARG-Fragmenten, 2) Schlauchpumpe, 3) Zulauf zum Membranmodul, 4) Ablauf des Filtrats nach Innen-nach-Außen-Filtration, 5) Ablauf für Spülung (Durchfluss durch Kapillar-Innenraum), 6) Reservoir zur Sammlung der Filtrat-Fraktion mit Aufzeichnung der Volumen-Zunahme.

Um die Effizienz der größenabhängigen Entfernung der Genfragmente von den Membranen zu bestimmen, wurde der Siebkoeffizient  $S_0$  nach Gleichung (3-3) gemäß der Arbeiten von Latulippe *et al.* (2007) und Ager *et al.* (2009) ermittelt.

$$S_0 = \frac{GC(Fil) [\mu L^{-1}] \cdot V(Fil)[mL]}{GC(Feed)[\mu L^{-1}] \cdot V(Feed)[mL]} \quad (3-3)$$

Dabei ist  $GC(Fil)$  die im Filtrat gemessene Genkopienkonzentration,  $V(Fil)$  das Volumen der Filtrat-Fraktion (gepoolt),  $GC(Feed)$  die gemessene Genkopienkonzentration im Feed und  $V(Feed)$  das absolute Volumen, das für die Filtration verwendet wurde.

Zusätzlich wurde durch die Ermittlung der Retention nach Gleichung (3-4) auch der spezifische Cut-Off für Genfragmente ( $MWCO_{DNA}$ ) der unbeschichteten Membran graphisch bestimmt. Dieser ist definiert durch die Molekülgröße, bei der eine 90 %-ige Retention erzielt wird. Aufgrund der limitierten Anzahl von Genfragmenten für die Bestimmung wurde zur Vereinfachung eine lineare Regression angewendet und der Bereich der beiden Fragmente, zwischen denen die 90 % erreicht wurden, als Cut-Off-Annäherung festgelegt.

$$Retention [\%] = 1 - \left( \frac{C_{Fil(t)}}{C_{Feed}} \right) \cdot 100 \quad (3-4)$$

Dabei ist  $c_{Fil(t)}$  die Konzentration der Genkopien im Filtrat nach einer bestimmten Zeit und  $c_{Feed}$  die Konzentration der Genkopien im Feed.

Um auch die an die Membran gebundenen ARG zu bestimmen, wurde ein 24-Stunden-Inkubationsexperiment mit beschichteten und unbeschichteten Einzelfaserkapillaren durchgeführt. Im Einzelnen wurden 50 mL der ARG-Arbeitslösung ( $10^6$  GC/ $\mu$ L in autoklaviertem Reinstwasser) in ein steriles 50-mL-Reaktionsröhrchen überführt und mit 10 cm (in 5 Stücke von 2 cm Länge geschnitten) der Membran bei Raumtemperatur für 24 h

inkubiert, entsprechend den von Latulippe *et al.* (2007) durchgeführten Experimenten. Vor der Inkubation wurden die Membranen in fünf gleich große Stücke von 2 cm geschnitten und Längsschnitte erstellt. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-DNA direkt von den Membranen mit dem Fast DNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Dazu wurde die an die Membranen gebundene DNA mit Lysing Matrix E Beads in einem FastPrep-24 Gerät (MP Biomedicals) mechanisch eluiert. Zusätzlich wurde die Arbeitslösung nach 0 und 24 Stunden beprobt, um festzustellen, ob die Genfragmente in der Lösung durch die Adsorption an die Membran reduziert werden. Eine Negativkontrolle wurde parallel zu einem Röhrchen mit der ARG-Arbeitslösung ohne Membran und für jede getestete Membran bzw. ein Röhrchen mit der Membran ohne ARG-Fragmente durchgeführt. Die Quantifizierung der Genfragmente erfolgte mittels qPCR.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in aquatischen Umweltproben

#### 4.1.1 Resistenzgen-Monitoring im Tai See, China

##### Saisonale Unterschiede

Um das Aufkommen von Resistenzgenen im Tai See saisonal zu erfassen, wurden im November 2018 (Herbst), März 2019 (Frühling) und August 2019 (Sommer) Schöpfproben mittels qPCR auf ein breites Spektrum von ARG untersucht. Die untersuchten ARG umfassen Vertreter verschiedener Resistenzgenklassen, darunter Sulfonamid- (*sul1*, *sul2*),  $\beta$ -Laktam- (*blaTEM*, *blaCTX-M-32*, *blaNDM-1*), Methicillin- (*mecA*) und Colistin-Resistenzen (*mcr-1*). Parallel dazu wurden die bakterielle DNA (*16S rDNA*) und das mit Gentransfer assoziierte Integrase-Gen *intl1* quantifiziert. An jeder Probenahme-Stelle wurde Wasser aus drei Horizonten der Wassersäule (Oberfläche, mittlere Tiefe, über Boden) entnommen und die gemessenen Werte gemittelt.

In Abbildung 4-1 sind die gemittelten Werte für die drei Jahreszeiten dargestellt. Die Konzentration des *16S* Gens variiert kaum zwischen Herbst, Frühling und Sommer und liegt zwischen 6,3-6,9 log ( $\pm 0,1-0,6$ ) Genkopien pro mL (GC/mL), wobei der niedrigste Wert im Herbst zu finden ist. Aufgrund der niedrigeren Temperatur kann es hier zu geringerem Bakterienwachstum im See gekommen sein. Als einziges der untersuchten ARG weist *sul1* im Herbst mit 5,1 log ( $\pm 0,5$ ) GC/mL die im Vergleich zu Frühling und Sommer höchste Genkopienzahl auf. Bei sogar leicht reduzierten *16S*-Konzentrationen spricht das für eine deutlich erhöhte Abundanz von Sulfonamid-resistenten Bakterien. Dies kann mit höherer Verabreichung von Sulfonamid-Antibiotika in der kalten Jahreszeit und damit höheren Rückständen im Abwasser mit folgendem Eintrag in das Oberflächenwasser zusammenhängen. Jiang *et al.* (2011) konnten beispielsweise deutlich erhöhte Konzentrationen von Sulfomethazin im Dezember im Fluss Huangpu (Shanghai) feststellen und beschreiben außerdem die verstärkte Persistenz des Antibiotikums in der aquatischen Umwelt, aufgrund einer hohen Hydrophilie und damit Mobilität im Fließgewässer. Dadurch kann das Antibiotikum lange Strecken im Fluss zurücklegen und dabei in subinhibitorischen Konzentrationen auch die Resistenzentwicklung von Bakterien fördern. Auch Sulfioxazole werden zur Behandlung von Krankheiten beim Menschen eingesetzt und können zur Entwicklung von Sulfonamid-Resistenzen beitragen (Liu *et al.* 2017).

Im Gegensatz zu *sul1* sind die meisten untersuchten ARG (darunter *blaCTX-M-32*, *blaNDM-1*, *mecA*, *mcr-1*), sowie auch das Integrase-Gen *intl1*, im Sommer mit höheren Genkopienzahlen vertreten als im Herbst: Durch die höheren Temperaturen kann es zu stärkerem Wachstum von ARB (z.B. Pseudomonaden) kommen. Da die Konzentrationen der *16S rDNA* hingegen nicht signifikant steigen spricht das dafür, dass das verstärkte Wachstum der ARB im Sommer zu einer Verdrängung/ Unterdrückung von oligotrophen Umweltorganismen führt, die sich in den Wintermonaten bei kälteren Temperaturen wegen besserer Adaption vermutlich verstärkt durchsetzen können. Möglicherweise handelt es sich auch um frei oder in Phagen vorliegende DNA, was ebenso die Konstanz der *16S rDNA* bei gleichzeitiger Erhöhung der ARG erklären könnte. Calero-Cáceres und Muniesa (2016) konnten beispielsweise die höhere Persistenz von *blaTEM*-tragenden Phagen bei niedrigeren Wassertemperaturen (4 °C) experimentell belegen. Der enorme Anstieg von *mecA* von nicht nachweisbaren Genkopien (< BG) im Winter, 2,0 log ( $\pm 0,1$ ) GC/mL im Frühling bis 4,0 log ( $\pm 1,8$ ) GC/mL im Sommer könnte zum einen mit erhöhter Produktion von Antibiotika für den Herbst zusammenhängen, die antizyklisch stattfinden muss. Auch möglich ist ein erhöhter Eintrag von Gülle aus der Fleischproduktion in den Wasserkreislauf, wegen der im Sommer erhöhten Bewirtschaftung umliegender Felder. Trotz seit 2005 sinkendem Trend weiß man, dass *mecA* tragende Multi-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) immer noch sehr relevant in der Massentierhaltung

und vor allem der Schweinezucht sind (Gan *et al.* 2021). Der Tai See ist zudem für eine starke Bewirtschaftung mit Aquakulturen, darunter vor allem die Krabben- (Hairy Crab, White shrimp) und Whitefish-Zucht, bekannt (Tai und Ellis 2008). Ergebnisse von Wang *et al.* (2018) beschreiben die Detektion der höchsten Antibiotika-Konzentrationen, resultierend aus erhöhter Krabbenzucht, ebenfalls im Sommer. Vor allem in Aquakulturen ist prophylaktischer und wachstumsfördernder Einsatz von großen Antibiotika-Mengen nötig, um hohe Produktionsraten zu sichern (Shao *et al.* 2021). In Experimenten mit Zuchtfischen konnte gezeigt werden, dass diese die verfütterten Antibiotika innerhalb von 24 Stunden ausscheiden und die Konzentration im Wasser daraufhin ansteigt (Zhang *et al.* 2021). Hier werden vermutlich auch ARB mit ausgeschiedenen oder Bakterien in der Umwelt entwickeln Resistenzen aufgrund ihrer Exposition mit erhöhten Antibiotika-Konzentration.

Sogar *mcr-1* ist im August in geringer Menge nachweisbar (0,3 log ( $\pm 0,8$ ) GC/mL), obwohl es sich um eine Resistenz gegen ein humanes Reserve-Antibiotikum (Colistin) handelt. Colistin wird in der Massentierhaltung häufig als Futterzusatz eingesetzt, was zur Entwicklung und Verbreitung der *mcr-1* Resistenzen führen kann. In China wurde dieser Einsatz als Futterzusatz jedoch 2016 verboten (Walsh und Wu 2016), weswegen die *mcr-1* Konzentration so gering ist. Dennoch unterstreicht das Ergebnis für *mcr-1*, dass Resistenzen gegen das verbotene Antibiotikum immer noch im Tai See zu finden sind. Auch in anderen chinesischen Oberflächenwässern konnte das *mcr-1* Gen, sowie das *blaNDM-1* Gen, im Zusammenhang mit einem hohen Aufkommen von Massentierhaltung in der Region in ähnlichen Konzentrationen detektiert werden (Yang *et al.* 2017).

Die deutlich höheren Konzentrationen des  $\beta$ -Laktamase-Gens *blaCTX-M-32* im August von 2,03 log ( $\pm 1,4$ ) GC/mL im Vergleich zu den kälteren Monaten November und März, passen zu den Ergebnissen aus einem früheren Monitoring des Tai Sees, wo das Gen im Juni und September detektiert werden konnte, nicht aber im November und Februar (Stange *et al.* 2019b).  $\beta$ -Laktame werden in der Tierhaltung (z.B. Schweinezucht) eingesetzt, die am Tai See vielerorts betrieben wird (Yang *et al.* 2019).

Die leicht erhöhten Konzentrationen von *int11* im Monat August von 4,0 log ( $\pm 0,9$ ) GC/mL lassen vermuten, dass auch die Aktivität des HGT bzw. des Austauschs von Plasmiden zwischen Bakterien (Konjugation) erhöht sein könnte. Das parallele Vorkommen von Resistenzgenen mehrerer AB-Klassen mit erhöhtem Aufkommen von *int11* unterstreicht nochmal den Bedarf der Standardisierung des ARG-Monitorings. Wobei eine durch eine regelmäßige Überwachung vor allem in Ab- und Trinkwässern die das Risiko einer potentiellen Übertragung der Resistenzen auf klinisch relevante Keime reduzieren könnte. Als einziges der untersuchten ARG tritt *blaTEM* im März deutlich erhöht auf mit im Mittel 2,5 log ( $\pm 0,5$ ) GC/mL. Dennoch ist auch die gemessene Peak-Konzentration im Frühjahr vergleichsweise geringer als in anderen anthropogen beeinflussten Oberflächengewässern in der Region rund um Shanghai (Huang *et al.* 2019; Jiang *et al.* 2013).

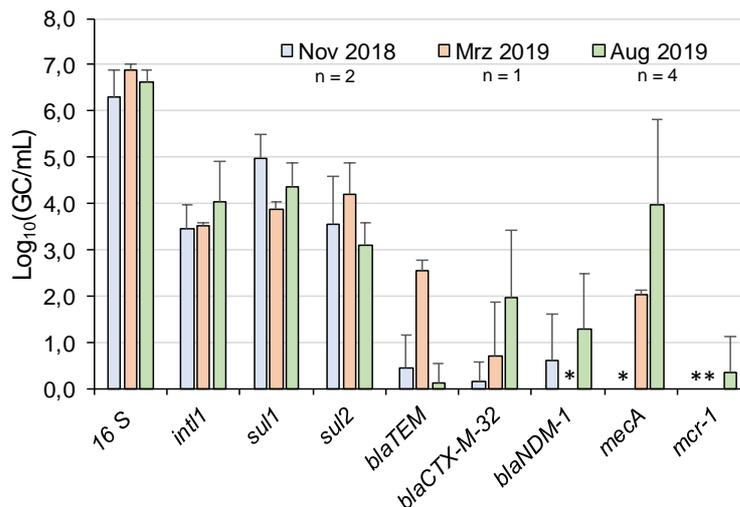


Abbildung 4-1 Antibiotikaresistenzgene in Tai See-Proben zu verschiedenen Jahreszeiten. Alle Proben wurden über drei Horizonte der Wassersäule entnommen. Die drei Werte wurden je gemittelt. Mit \* markierte Proben sind  $< BG$  ( $\sim 1$  GC/mL). Die dargestellten Proben (alle NJ A, B, C) sind in Tabelle 3-2 beschrieben. Rohdaten sind in Anhang 8.2.1 zu finden.

### Vergleich von Wasser- und Sedimentsäule

Zusätzlich zum saisonalen Vergleich der ARG in Wasserproben aus dem Tai See, wurden Sedimentkerne unter entsprechend beprobten Wassersäulen entnommen, und diese in mehrere 3-5 cm Schichten geteilt und nach DNA-Extraktion auf die Resistenzgene untersucht. Die DNA des Sediments wurde direkt extrahiert, während das DNA-Extrakt aus der Wassersäule bei der Membranfiltration zurückgehaltenen Fraktion gewonnen wurde. Um die ARG beider Seekompartimente, Pelagial bzw. Wassersäule und Benthos bzw. Sedimentsäule, besser miteinander vergleichen zu können, wurde für die Wasserproben der Gehalt der Feststoffe pro Liter Wasser durch separate Filtration einer Wasserprobe über einen  $0,45\ \mu\text{m}$  Polycarbonatfilter bestimmt und die ermittelten Genkopien darauf bezogen. In Abbildung 4-2 sind die Genkopien mehrerer Resistenzgene aus verschiedenen Klassen, die *16S rDNA* und *int1* über die gesamte beprobte See/Sediment-Säule von den beiden nahe beieinander gelegenen Standorten der ehemaligen Krabbenzucht (Crabfarm, CF) und der Wasserentnahmestelle (Intake-Area, Wul) des Wujiang Wasserwerks im Süd-Osten des Tai Sees dargestellt. Beide Sedimentkerne und Wasserproben wurden am selben Tag im März 2019 genommen. Die ehemalige Crabfarm wurde im Jahr 2018 stillgelegt und war somit für die Probenahme zugänglich. Der hier entnommene Sedimentkern hatte insgesamt 32,5 cm Länge, was im Vergleich zu dem entnommenen Sedimentkernen in der Intake-Area des Wujiang Wasserwerks (Wul) mit 18 cm deutlich tiefer ist. Aufgrund einer hohen Bewirtschaftung dieser Stelle im Tai See könnte in den letzten Jahren mehr Sediment angefallen sein. Mündlichen Überlieferungen der Wasserwerksbetreiber zufolge wurde an der Stelle Wul jedoch eine Abtragung von Sediment vorgenommen. Der Tai See ist seit dem industriellen Aufschwung in den 1970er bis 90er Jahren (Huang *et al.* 2015; King und Tong 1994) mit Kontaminanten aller Art belastet. Um die Wasseraufbereitung im Wasserwerk effizienter zu gestalten, ist eine Entfernung von 10-20 cm des Sediments an einer entsprechend belasteten Stelle sinnvoll. Auch andere Quellen belegen die Abtragung von Sediment im Tai See als allgemein durchgeführte Maßnahme in Folge der Trinkwasser-Krise im Jahr 2007 (Qin *et al.* 2019). Diese Entfernung von Sediment führt dann zur Reduzierung der Schichtdicke. Das kann auch der Grund für den weniger tiefen Wul-Sedimentkern sein.

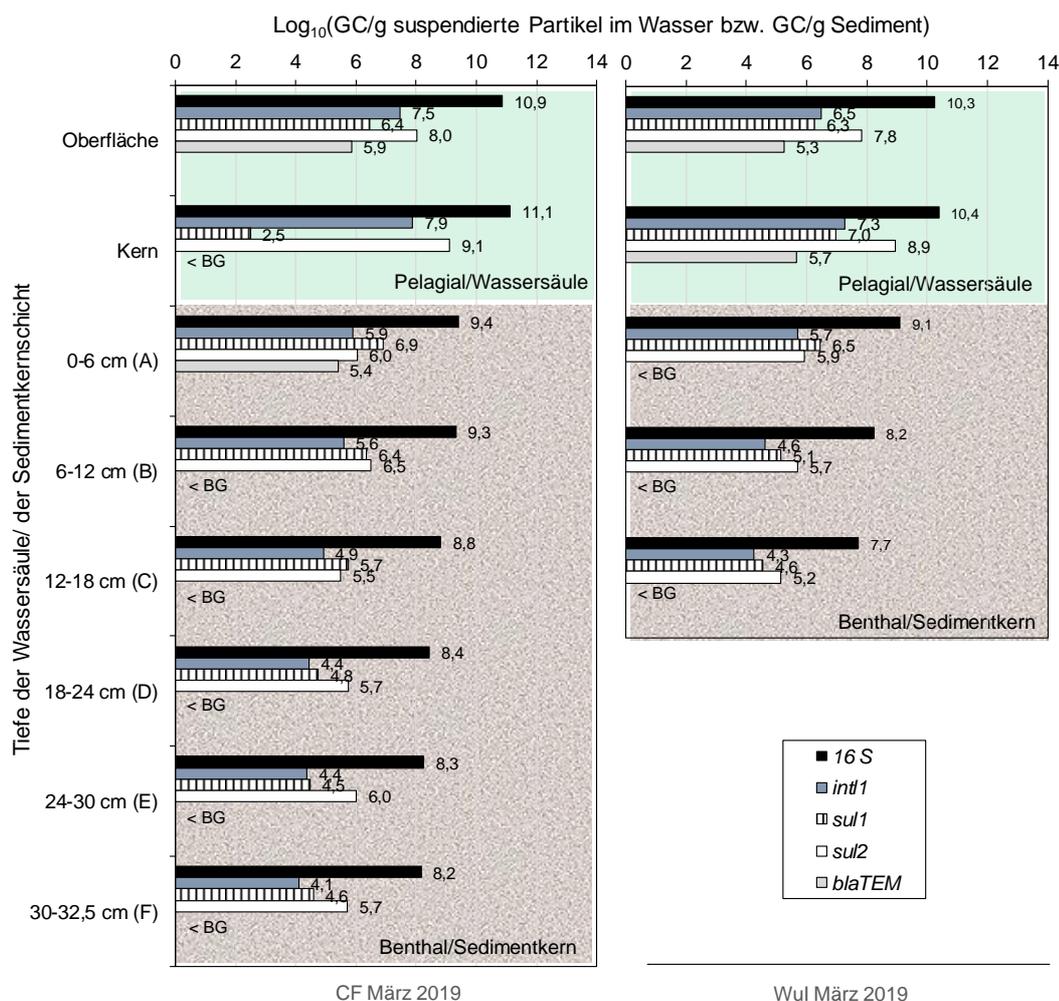


Abbildung 4-2 Genkopien in der Tai See CF und Wul-Wasser/Sediment-Säule pro Gramm des Feststoffs in der Wasserphase/ bzw. pro Gramm Sediment. Links: Sedimentkern der Crabfarm (CF März 2019) und darüber liegendes Oberflächenwasser bzw. Wasser direkt über dem Sedimentkern. Rechts: Sedimentkern im Bereich der Water-Intake-Area des Wujiang Wasserwerks (Wul März 2019) und darüber liegendes Oberflächenwasser bzw. Wasser direkt über dem Sedimentkern (Probenbeschreibung in Tabelle 3-2). Auch *blaCTX-M-32*, *mecA* und *mcr-1* wurden untersucht, blieben aber ohne Befund (< BG).

Die oberste Schicht des Sedimentkerns der ehemaligen Krabbenzucht weist mit 9,4 log GC/g insgesamt die höchsten 16S Konzentrationen auf, was eine höhere Biomassen-Konzentration bedeutet. Diese Werte passen zu in früheren Kampagnen ermittelten Werten in Sedimentkernen in nördlicheren Regionen des Tai Sees (Stange *et al.* 2019b). Die oberste Schicht des Sediments steht im stetigen Austausch mit dem Wasser des Tai Sees, das durch Eintrag von industriellem und landwirtschaftlichen Abwässern (Qin *et al.* 2007) und dem durch weitere anthropogene Einflüsse stets hohen Eintrag von Nährstoffen wie Stickstoff (Duan *et al.* 2009) und neuer ARB das Wachstum von weiteren Mikroorganismen begünstigt. Die höheren Konzentrationen der meisten Gene, die an den Feststoffen in der Wasserphase des Sees assoziiert sind, bestätigen dies. Es ist zu beachten, dass es sich um eine punktuelle Beprobung handelt. Der Zugang zu den beiden Probenahme-Stellen ist sehr begrenzt und wurde nur einmalig unter strikten Auflagen von zuständigen Behörden genehmigt. Da es sich um einen Flachwasser-See von im Mittel nur 2 m Tiefe handelt, kann der Austausch von Schad- und Nährstoffen zwischen Sedimentphase und der Wassersäule im Vergleich zu anderen Seen mit tieferem Wasser deutlich stärker sein. Je nach Wetterbedingungen (Wind, Regen, Sonne) kann extrem viel oder extrem wenig aufgewirbeltes Sediment in einer Wasserprobe vorkommen. Direkt über dem Kern befinden sich immer mehr Schwebstoffe in einer Wasserprobe, als an der Oberfläche des Sees, was durch die Nähe zum Boden, aber auch durch die Aktion der Probe-Entnahme begründet ist. Für die Oberflächenwasser-Proben

wurde ein FS-Gehalt von 44,2 (Wul A) bzw. 14,0 mg/L (CF A) ermittelt, während für die Kernwasserproben ein Gehalt von 95,8 (Wul C) und 74,5 mg/L (CF C) ermittelt wurde. Deshalb ist es für den Vergleich beider Kompartimente umso wichtiger, die Bezugsgröße zu vereinheitlichen. So wird deutlich, dass die Wasserphase des Tai Sees, durch kontinuierliche Einträge, stets stärker mit Bakterien und ARG belastet ist, als das Sediment. Diese Annahme bestätigt sich auch für den Vergleich eines weiteren Sedimentkerns, der im August 2019 zusammen mit den dazugehörigen Wasserproben von Oberfläche und direkt über Seegrund an der Position der NIGLAS Jetty Station im Nord-Osten des Tai Sees beprobt wurde (Daten nicht gezeigt, siehe Abbildung 8-1, Anhang).

Das Muster der Gene *16S*, *intl1*, *sul1* und *sul2* ist zwischen der dritten Sedimentschicht des CF-Kerns (12-18 cm, CF C) und der obersten Wul-Kern-Schicht (0-6 cm, Wul A) sehr ähnlich, wobei hier *sul1* mit 5,7 bzw. 6,5 log GC/g in höherer Konzentration nachgewiesen wurde als *sul2* mit 5,5 bzw. 6,9 log GC/g. Dies könnte ein Beleg dafür sein, dass vor der Abtragung von Sediment an der Stelle Wul die nun oberliegende Schicht eigentlich in 12-18 cm Tiefe lag. Die beiden darunterliegenden Schichten von Wul (Wul B und C) passen gut zu den Mustern der CF Schichten in 18-24 (CF D) und 24-30 cm Tiefe (CF E), wobei hier nun *sul2* die Konzentrationen von *sul1* mit mindestens 0,6 und maximal 1,5 log GC/g überschreitet. Um die mögliche Abtragung der oberen Wul-Sedimentschichten zu verbildlichen ist die Verschiebung des Konzentrationsverlaufs beispielhaft anhand von *sul1* in Abbildung 4-3 dargestellt. Zudem wurden die Konzentrationsänderungen des Gens hier anhand von Isotopen-basierten Datierungen des süd-östlichen Bereichs des Tai Sees mit einer angenommenen Sedimentationsrate von 3 mm/Jahr (Yao *et al.* 2013) im zeitlichen Verlauf der letzten Jahrzehnte bis 2019 dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass es sich lediglich um eine mittlere Annahme handelt und die Sedimentationsraten nicht konstant sind, da sie stets stark von Temperatur- und Wetteränderungen beeinflusst werden (Liu *et al.* 2016). Bei der Darstellung im zeitlichen Verlauf fällt auf, dass der starke Anstieg von *sul1* bei mittlerer Sedimentationsrate von 3 mm/Jahr für den CF-Kern um das Jahr 1970 beginnt. Hier beginnt die wirtschaftliche Region um den Tai See zu prosperieren, was mit einem starken Bevölkerungswachstum und der Zunahme der Bewirtschaftung des Tai Sees in Form von Aquakultur einhergeht (Li *et al.* 2018). Daten belegen, dass es bereits um 1978 Aquakultur gab und diese in den folgenden 30 Jahren enorm zunahm (zitiert in Mo *et al.* 2017). Verschiebt man die *sul1*-Werte der Schichten des Wul-Kerns um je im Mittel 10 cm nach unten, verbildlicht dies die Abtragung der obersten Sedimentschicht. So passen die beiden unteren Wul-Schichten nahezu perfekt zum Verlauf von *sul1* CF. Die obere Schicht hingegen weist erneut höher Konzentrationen für *sul1* auf, da diese Schicht stets mit belastetem Wasser in Wechselwirkung steht.

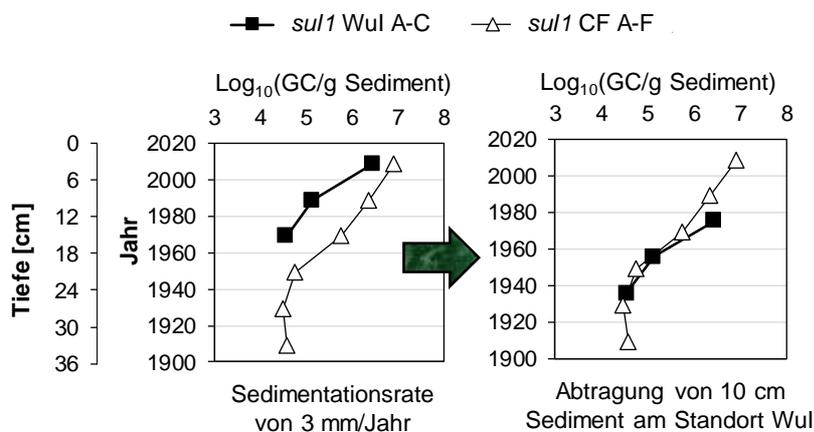


Abbildung 4-3 Zeitliche Darstellung des *sul1*-Konzentrationsverlaufs in den Sedimentkernen von Wul und CF unter Annahme einer Sedimentationsrate von 3 mm/Jahr (links) und zusätzlich 10 cm Sedimentabtragung von Wul (rechts).

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Sedimentationsprozesse im Tai See dominieren, da in den Wasserproben in der Regel eine größere Variation an ARG nachgewiesen werden

konnte als in den darunterliegenden Sedimentschichten. Aufgrund der mittleren Tiefe des Sees von nur 2 m ist Resuspension in Folge von stärkeren Winden jedoch nicht zu vernachlässigen und kann zur Remobilisierung von Resistenzen beitragen. Da diese auch in den tieferen Sedimentschichten noch nachweisbar sind, beweist dies die hohe Persistenz der Antibiotikaresistenzen im Sediment. Da in Laborexperimenten bereits die Instabilität von freien ARG in Sedimenten belegt werden konnte (Brown *et al.* 2020), liegen die nachgewiesenen Resistenzen vermutlich als bakterielle DNA oder gebunden an Partikeln vor, die sie vor einer Degradierung schützen können (Zarei-Baygi und Smith 2021).

#### 4.1.2 Resistenzgen-Monitoring in Oberflächengewässern in Deutschland

Die bakterielle 16S rDNA, das Integrase-Gen *intl1* sowie mehrere hochrelevante ESBL-Gene, Cephalosporin-Resistenzgene und Carbapenem-Resistenzgene wurden in den DNA-Extrakten der 28 Oberflächenwasserproben quantifiziert. Für die Proben deutscher Oberflächengewässer, die von Wasserversorgern in regelmäßigen Abständen zur Verfügung gestellt wurden, wurde sich auf die Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Resistenzen fokussiert, da die selben Proben auch für die Etablierung von Kulturverfahren zum Nachweis  $\beta$ -Laktam-resistenter Umweltbakterien verwendet wurden. Die Ergebnisse für die absoluten Genkopien pro 1 mL Probe sowie die positiven Ergebnisse (in %) pro untersuchter Probenanzahl sind in Abbildung 4-4 dargestellt. Da viele Umweltbakterien deutlich langsamer wachsen und aufgrund der Konkurrenzsituation im Kulturverfahren nicht erfasst werden, liefert die molekularbiologische Untersuchung von Gesamt-DNA-Extrakten wichtige Informationen.

Die Cephalosporin-Resistenzgene (CeR) *blaTEM* und *blaCMY-2* wurden mit der höchsten Häufigkeit in 10 bzw. 26 Proben der untersuchten Proben gefunden (36 und 93 %), während für Carbapenemase-Gene (CaR) wie *blaOXA-48* und *blaKPC-3* nur 2 bis 6 der Proben (7-21 %) positiv waren. Diese Ergebnisse stimmen mit einer anderen Studie überein, in der festgestellt wurde, dass  $\beta$ -Laktam-Resistenzen und insbesondere Cephalosporin-Resistenzen in Flusswasserproben sehr häufig (fast 100 %) sind, während Carbapenem-Resistenzen eine deutlich geringere Häufigkeit aufweisen (Chaturvedi *et al.* 2021). Das Gen *blaCMY-2* weist unter allen getesteten  $\beta$ -Laktamase-Genen die höchsten Genkopien-Konzentrationen von  $1,9 (\pm 0,75)$  log Genkopien/mL auf.

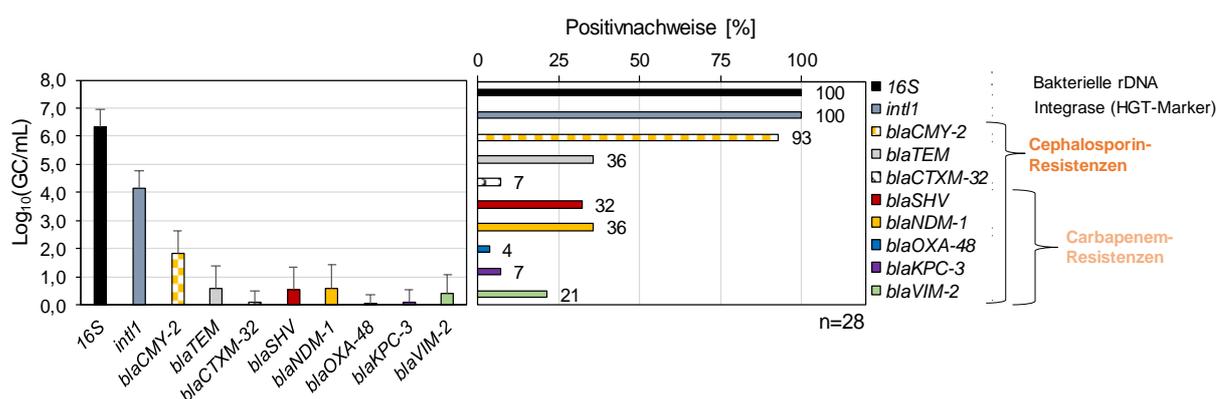


Abbildung 4-4 Genkopien pro mL Probe für untersuchte Oberflächenwasserproben aus Deutschland (links) und Prozentanteil der positiven Ergebnisse (rechts) für n=28 Proben (gelistet in Tabelle 3-1, OW1-28). Die Gene sind nach ihrer Ausprägung von Cephalosporin-Resistenz, Carbapenem-Resistenz gruppiert (Einordnung lt. CARD-Datenbank: <https://card.mcmaster.ca/>).

Das CeR-Gen *blaCMY-2* wurde in den höchsten Konzentrationen und mit der höchsten relativen Häufigkeit im Vergleich zu allen anderen untersuchten ARG nachgewiesen, und lag damit auf dem gleichen Niveau wie Integrons der Klasse 1. Die Gene *blaCTXM-32* und *blaOXA-48* wurden mit geringerer Häufigkeit (7 und 4 %) erfasst. Dieses niedrige Vorkommen steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Schwartz und Schmithausen (2020) und Hembach *et al.* (2019), die diese Gene zusammen mit *blaCMY-2* als intermediär

vorkommende Gene in der Umwelt eingeordnet haben. Ein Grund für diese Verschiebung könnte die begrenzte Anzahl der verschiedenen Probenahme-Stellen sein, die in dieser Studie verwendet wurden. In internationalen Studien konnten bereits eine Vielzahl von ARG in Bakterienisolaten mit klinischer Relevanz aus Oberflächenwassern nachgewiesen werden (Hooban *et al.* 2020; Lamba *et al.* 2020; Lekunberri *et al.* 2017; Stange und Tiehm 2016b; Tacão *et al.* 2012; Wambugu *et al.* 2018; Wu *et al.* 2019; Zarfel *et al.* 2017). Diese Gene konnten auch im Rahmen von diesem Forschungsvorhaben in den untersuchten Oberflächenwasserproben detektiert werden. Auch *blaVIM-2* und *blaNDM-1* wurden in 21 % bzw. 36 % der untersuchten Oberflächenwasserproben mit mittlerer Häufigkeit nachgewiesen. Müller *et al.* (2018) fanden die *blaVIM*-Resistenzgene in Oberflächenwässern, während *blaKPC*, *blaOXA-48* und *blaNDM* nur in Isolaten aus klinischen/kommunalen Abwässern gefunden werden konnten. *blaNDM-1* und *blaTEM* wurden mit Häufigkeiten von jeweils 36 % in allen untersuchten Proben gleichermaßen nachgewiesen. Generell wurden die meisten  $\beta$ -Laktamase Gene, außer *blaCMY-2*, nur knapp über der Bestimmungsgrenze (BG, ca. 1 Genkopie pro mL) mit Werten zwischen 0,11 und 0,59 log Genkopien/mL nachgewiesen. Der Nachweis über der BG war hier nur aufgrund von Aufkonzentrierung durch Membranfiltration möglich. Die Anwendung von Kulturverfahren kann hier bereits eine koloniebildende Einheit auf einem Nährmedium nachweisen. Die Bestimmungsgrenze ist im Kulturverfahren im Vergleich zur molekularbiologischen Analytik empfindlicher. Andererseits können durch kultur-unabhängige PCR Verfahren oft mehr Resistenztypen erfasst werden, da nicht nur die DNA der kultivierbaren Organismen, sondern auch die der nicht kultivierbaren, sowie zum Teil freie DNA, an Partikeln adsorbierte DNA und DNA in Phagen erfasst wird.

#### 4.1.3 Fazit des Resistenzgen-Monitorings

Mit zur Verfügung stehenden qPCR Methoden konnten zahlreiche Oberflächenwässer und Sedimente aus China und Deutschland untersucht werden. Dabei wurde deutlich, dass die Vorkommen bestimmter ARG (vorwiegend aus der Gruppe der Sulfonamid- und  $\beta$ -Laktam-Resistenzen) in beiden Ländern ähnliche Muster aufweisen. Dies unterstreicht die globale Relevanz der Thematik. Da ARG auch in tiefen Sedimentschichten gefunden wurden, lässt dies eine hohe Persistenz oder eine schnelle Ausbreitung über horizontalen Gentransfer vermuten. Eine Weiterentwicklung von kulturbasierten Methoden und qPCR-Verfahren kann helfen die Prozesse, die zur Persistenz oder Mobilität von Resistenzen beitragen, besser zu verstehen.

## 4.2 Etablierung neuer Verfahren zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt

### 4.2.1 Fraktionierung von Umweltproben

#### 4.2.1.1 Vorversuche zur Etablierung der Methode

Antibiotikaresistenzen können mit molekularen PCR-Methoden in der Umwelt bereits ubiquitär in nahezu allen Arten von Proben nachgewiesen werden. In zahlreichen Publikationen wird die Hypothese geäußert, dass die Umwelt eines der wichtigsten Reservoirs für Antibiotikaresistenzen darstellt (Bilal *et al.* 2020; Li *et al.* 2020; Westphal-Settele *et al.* 2018; Wintersdorff *et al.* 2016). Genaue Wege der Verbreitung sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Wie in Kapitel 2.2 ausgeführt, tragen einerseits Resuspensions- und Sedimentationsprozesse zur Mobilität von Resistenzen im Meter-Maßstab bei. Andererseits sind auf der  $\mu\text{m}$ -Ebene Prozesse wie der horizontale Gentransfer (HGT) Protomotoren für die Ausbreitung der Resistenz-vermittelnden Gene. Ein besseres Verständnis der Verteilung von Antibiotikaresistenzen kann durch die Fraktions-basierte Untersuchung von Resistenzgenen erzielt werden. Durch die Anwendung einer Kaskadenfiltration sollten in Vorversuchen Sedimentpartikel und Bakterien unterschiedlicher Größen ( $> 5 \mu\text{m}$ ,  $> 1,2 \mu\text{m}$ ,  $> 0,45 \mu\text{m}$  und  $> 0,2 \mu\text{m}$ ) voneinander getrennt werden, wofür eine Modellprobe mit Bakterien, Phagen, freien DNA-Fragmenten (eDNA) und Silica-Partikeln verwendet wurde (siehe Kapitel 3.7.1.1 und 3.7.1.2). In Abbildung 4-5 sind die Ergebnisse der Messungen von Silicium (gemessen durch V. Nischwitz, Forschungszentrum Jülich, Methode der ICP-MS), sowie der repräsentativen Gene in den Filtraten dargestellt.

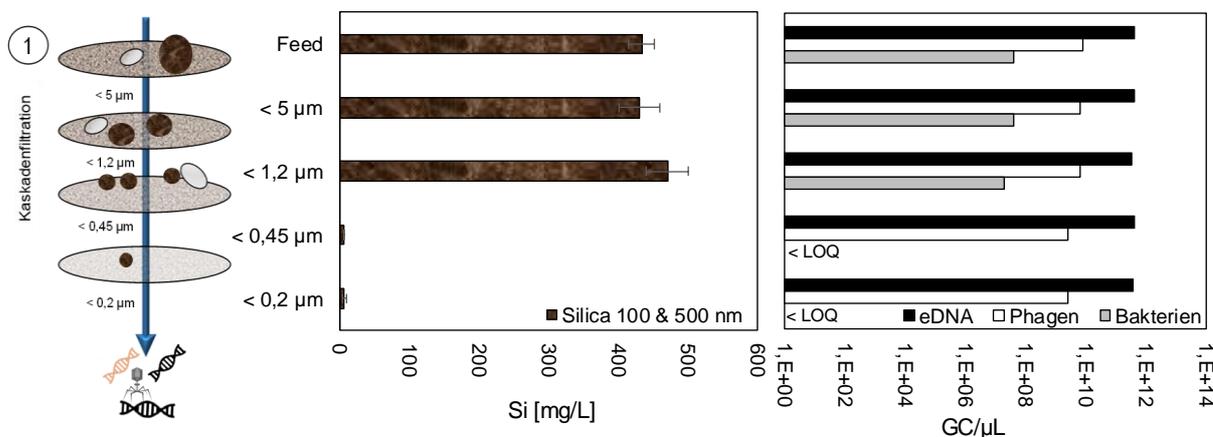


Abbildung 4-5 Vorversuch zur Kaskadenfiltration: Konzentrationen von Silicium (Si, bestimmt mittels ICP-MS (links) und der mittels qPCR bestimmten DNA Fragmente (Summe ARG/eDNA: *sul1*, *int1*, Phagen: *phiX* und Bakterien: *16S rDNA*) in den Filtraten während der Kaskadenfiltration. Angabe der Komponenten in Tabelle 3-8.

Anhand der Messungen von Silicium (Si) kann man deutlich sehen, dass die Membranen  $5 \mu\text{m}$  und  $1,2 \mu\text{m}$  die Silica-Partikel von  $100$  und  $500 \text{ nm}$  Größe im Modellsystem noch nicht zurückhalten. Allerdings kann im Filtrat  $< 0,45$  und  $0,2 \mu\text{m}$  wider Erwarten fast kein Si mehr nachgewiesen werden, obwohl die Poren der Membran mit  $200 \text{ nm}$  größer sein sollten, als die Silica-Partikel mit  $100 \text{ nm}$ . Dies verdeutlicht, dass eine exakte Trennung von Sedimentpartikeln unter Realbedingungen mit der Kaskadenfiltration nicht vollständig reproduzierbar durchzuführen ist, da durch Membran-Fouling auch kleinere Partikel von größer-porigen Filtern zurückgehalten werden. Nichtsdestotrotz kann eine grobe Trennung von verschiedenen großen Sedimentpartikeln bereits dazu beitragen, die Verteilung von an Partikeln assoziierten ARG in Suspension besser einschätzen zu können und somit Rückschlüsse auf deren Verbreitungs-Potential zu ziehen. Die Ergebnisse der qPCR, mit Quantifizierung der eDNA anhand zweier gespikter Genfragmente, der Phagen anhand des spezifischen Phagen-Gens und der Bakterien anhand ihrer *16S rDNA*, zeigen erwartete

Ergebnisse. Die eDNA wird ohne Reduktion in allen vier Filtraten wie im Feed nachgewiesen. Gleiches gilt für die PhiX174-Phagen, welche ebenfalls in den Fraktionen  $< 0,2 \mu\text{m}$  nachweisbar sind und somit das Ende der Kaskade erreichen. Dies zeigt, dass der Rückhalt mit anderen Partikeln (hier Silica-Partikel) auf den Filtern vermutlich für eine finale Quantifizierung von ARG innerhalb der Fraktionen vernachlässigbar ist. Die Bakterien wiederum werden von der  $0,45 \mu\text{m}$  PES-Membran wie erwartet zurückgehalten und in den folgenden Filtraten kann die *16S rDNA* somit nicht mehr nachgewiesen werden ( $< \text{BG}$ ). Auch dieses Ergebnis war hinsichtlich einer Anwendung für die Prozessierung von Rohwasserproben vielversprechend, da die Abtrennung der Bakterienfraktion sichergestellt ist.

Im nächsten Schritt sollten die Komponenten der Fraktion  $< 0,2 \mu\text{m}$  analysiert werden, die Phagen und eDNA-Fragmente beinhalten könnten. Da die Konzentrationen in einer Umweltprobe hierfür häufig zu gering sind, wurde eine Rührzelle mit einer Ultrafiltrationsmembran von  $5 \text{ kDa}$  MWCO, die eine Aufkonzentrierung unter Druck ermöglicht, verwendet und verschiedene Bedingungen lt. Kapitel 3.7.1.2 verglichen. Die Ergebnisse in Abbildung 4-6 zeigen deutlich, dass die Filtration mit der  $0,2 \mu\text{m}$  Membran sowohl die eDNA als auch die Phagen kaum zurückhält.

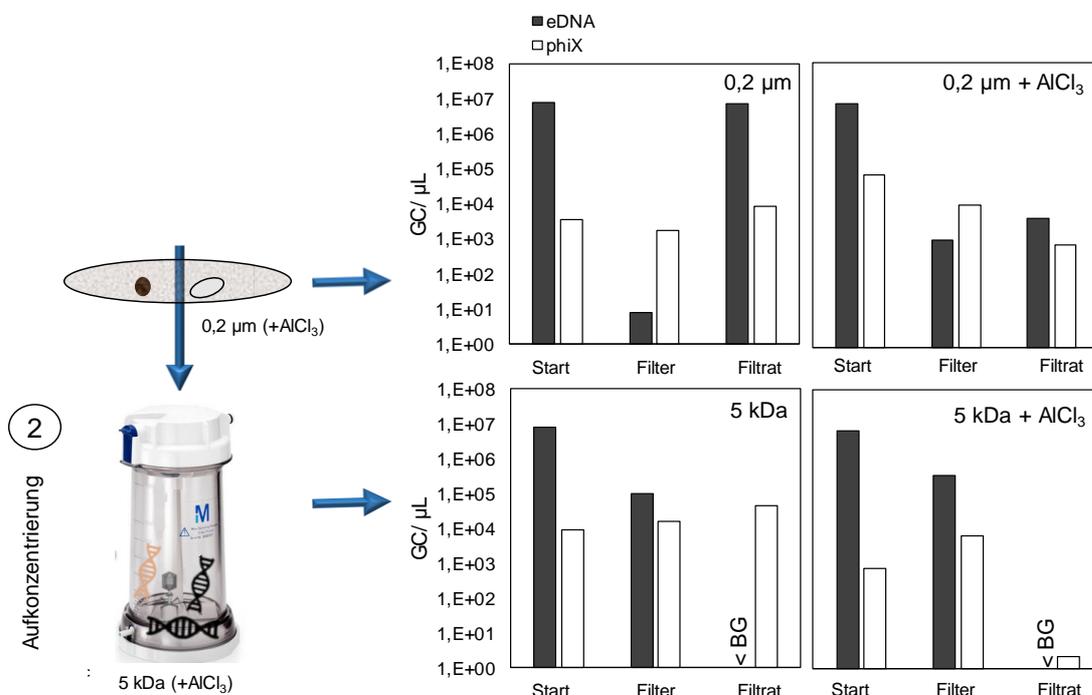


Abbildung 4-6 Aufkonzentrierung der Fraktion  $< 0,2 \mu\text{m}$  (eDNA (Summe der freien ARG-Fragmente *ermB* und *vanA*) und Phagen (*phiX*)) im Vergleich zur Standardfiltration mit der  $0,2 \mu\text{m}$  PES Membran.  $\text{AlCl}_3$ : Benetzung der beiden Test-Membranen mit Aluminium-Chlorid zur Erhöhung des Rückhalts.

Die Analyse der Filter ergab Konzentrationen knapp über der Bestimmungsgrenze, während im Filtrat über 97 % wiedergefunden werden können. Die DNA der Phagen kann in ähnlicher Konzentration ( $\sim 10^3 \text{ GC}/\mu\text{L}$ ) im Feed, auf dem Filter und im Filtrat nachgewiesen werden. Dennoch beträgt der Anteil der viralen DNA auf dem Filter lediglich 20 % der gespikten Menge, während die Konzentration im Filtrat mit  $8,4 \times 10^3 \text{ GC}/\mu\text{L}$  deutlich höher ist. Für den  $0,2 \mu\text{m}$  Filter mit  $\text{AlCl}_3$  ist hier ein deutlicher Effekt zu erkennen. Hier ist die Konzentration der Phagen-DNA im Vergleich zum Feed um 2 Log-Stufen reduziert, was dafür spricht, dass die Equilibrierung des Filters vor der Probenaufgabe tatsächlich einen verbesserten Rückhalt von Phagen ermöglicht. Auch die Konzentration der eDNA ist auf dem Filter mit  $\text{AlCl}_3$  höher, während sie im Filtrat im Vergleich zur Filtration ohne  $\text{AlCl}_3$  sogar 3 Log-Stufen geringer detektiert wird. Ob die negativ geladenen DNA-Moleküle ebenso wie die Phagen direkt an der

$\text{AlCl}_3$ -benetzten Membran haften oder durch eine Interaktion mit den Phagen zurückgehalten werden, kann dabei nicht definitiv geklärt werden. Bei Verwendung der Rührzelle mit der 5 kDa Membran kann das *phiX* Gen wider Erwarten im Filtrat detektiert werden, was gegebenenfalls durch eine leichte Undichtigkeit der Aufkonzentrierungs-Einheit verursacht sein könnte. Dass gleichzeitig keine eDNA im Filtrat nachgewiesen werden konnte, ist eventuell durch die verschiedene Aufbereitung der Proben vor der qPCR zurückzuführen, da bei der Extraktion der Phagen-DNA noch ein Aufkonzentrierungs-Schritt stattfindet, während die freie DNA direkt aus der Probe analysiert wird. Trotzdem wird deutlich, dass die geringe Porengröße von 5 kDa MWCO zu einem deutlichen Rückhalt der Fraktionen < 0,2  $\mu\text{m}$  führt. In Kombination mit dem  $\text{AlCl}_3$  scheinen sowohl Phagen als auch freie DNA besser auf dem Filter zu adsorbieren. Beide auf dem Filter zurückgehaltenen Fraktionen steigen signifikant an und im Filtrat sind nur noch geringe Mengen der *phiX* DNA nachweisbar (< 10 GC/ $\mu\text{L}$ ). Für eine Separierung von freier DNA und Phagen eignet sich die Filtration somit nicht, da die Benetzung mit  $\text{AlCl}_3$  bewiesenermaßen auch einen Rückhalt von eDNA begünstigt. Soll jedoch die Fraktion < 0,2  $\mu\text{m}$  auf Resistenzgene untersucht werden, erhält man die größtmögliche Wiederfindung durch die Aufkonzentrierung mit der 5 kDa Membran, die zuvor mit  $\text{AlCl}_3$  benetzt wurde.

In einem weiteren Vorversuch sollte eine Methode gefunden werden, um die beiden Fraktionen eDNA und Phagen weiter zu separieren. Hier wurden, wie in Kapitel 2.2 erläutert, bereits einige Methoden in der Literatur angewendet. Diese wurden jedoch meist direkt auf aquatische Umweltproben angewendet, ohne ihre Reproduzierbarkeit vorher in einem Modellsystem zu testen. Aus diesem Grund wurde die Anwendung einer adsorptiven und einer enzymatischen Trennung erneut mit ARG-Fragmenten (eDNA) und PhiX174-Phagen (*phiX*) bekannter Konzentrationen in Reinstwasser getestet und die Wiederfindungen mittels qPCR untersucht. Die Ergebnisse beider Tests sind in Abbildung 4-7 gezeigt.

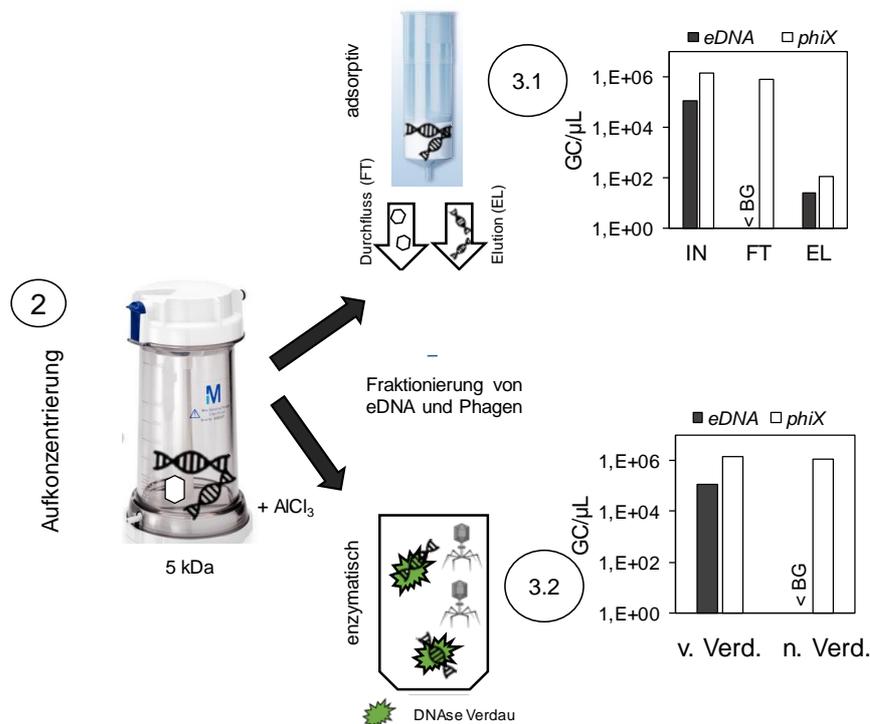


Abbildung 4-7 Fraktionierung von Phagen (*phiX*) und eDNA (Summe der freien ARG-Fragmente *ermB* und *vanA*) durch adsorptives (Silicasäule, 3.1) und enzymatisches (DNase I Verdau, 3.2) Verfahren nach Aufkonzentrierung (2). FT ist der Säulendurchfluss nach Probenaufgabe.

In der Theorie können an der Silica-Membran, die zuvor laut Hersteller-Angaben für die Bindung von DNA equilibriert wurde, Moleküle extrazellulärer DNA binden, während Proteine mit dem Durchfluss (FT) entfernt werden. Somit war davon auszugehen, dass die Phagen aufgrund ihres aus Proteinen bestehenden Capsids ebenso abgetrennt werden. Nach zwei Waschrufen mit Ethanol und einer anschließenden Elution sollte final nur freie DNA im Eluat vorzufinden sein. In Abbildung 4-7 (3.1) sieht man, dass die Phagen, die anhand eines spezifischen Gens quantifiziert wurden, nahezu vollständig ( $10^5$  von  $10^6$  GC/ $\mu$ L) im Durchfluss nach Probenaufgabe (FT) wiedergefunden werden können. Eine sehr geringe Menge von lediglich  $10^2$  GC/ $\mu$ L wird noch im Eluat nachgewiesen. Die freie DNA hingegen kann zwar im FT wie erwartet nicht nachgewiesen und bindet somit offenbar erfolgreich am Silica-Material der Säule, jedoch ist auch die Wiederfindung im Eluat mit nur  $10^1$  von  $10^5$  GC/ $\mu$ L sehr gering. Dies könnte bedeuten, dass die Waschrufen insgesamt einen negativen Effekt auf die Wiederfindung der DNA haben. Daher ist die Methode für die Untersuchung von ARG in der eDNA-Fraktion nicht geeignet. Vor allem in einer aquatischen Umweltprobe sind Waschrufen während der Separierung essentiell, da sich Huminsäuren und störende Proteine, die eine zu einer PCR-Inhibition führen können, im Wasser befinden können. Da die Wiederfindung der Phagen im FT allerdings nahezu vollständig ist, kann die Methode zumindest für die Fraktionierung der Phagen und anschließende ARG-Analyse nach Entfernung der eDNA verwendet werden.

Eine weitere Möglichkeit, die die Analyse von ARG in der Phagenfraktion erlauben sollte, ist der enzymatische Verdau von frei vorliegender DNA mit DNase I. Die Ergebnisse der entsprechenden Vorversuche sind in Abbildung 4-7 (3.2) dargestellt. Die Quantifizierung mittels qPCR nach dem Verdau und Abstoppen des Enzyms mit Proteinase K zeigt, dass diese Methode für den Nachweis von ARG in der Phagen-Fraktion eingesetzt werden kann. Die eDNA kann nach dem Verdau nicht mehr nachgewiesen werden, während *phiX* vor und nach dem Verdau mit einer Konzentration von  $10^6$  GC/ $\mu$ L nachgewiesen wird. Beide im Modell getesteten Methoden lassen somit eine Fraktionierung von Phagen zu, nicht jedoch von eDNA.

Eine alternative Methode, die in der Literatur zur Separierung von freier DNA beschrieben wurde, ist beispielsweise der Einsatz einer NAAP-Säule (Wang *et al.* 2016). Die Herstellung dieser Säulen ist allerdings mit großem Aufwand verbunden und die Größe, sowie das extrem hohe nötige Probenvolumen machen sie für die in dieser Arbeit erzielte Anwendung ungeeignet. Es wurde nach einer Methode gesucht, die einfach transportabel ist und eine Anwendung auch in Laboren mit minimaler Ausstattung ermöglicht, da sie hinsichtlich der Untersuchung von Wasserproben aus dem Tai See etabliert werden sollte. Aus der erfolgreichen Fraktionierung der Phagen ergab sich die Möglichkeit, eine der beiden Methoden anzuwenden und aus den ARG, die in der gesamten Fraktion  $< 0,2 \mu$ m quantifiziert wurden und derer, die in der Phagen-Fraktion quantifiziert wurden, die fehlende eDNA-Fraktion von ARG laut Gleichung (4-1) zu berechnen.

$$ARG_{eDNA} \left[ \frac{GC}{\mu L} \right] = ARG_{<0,2\mu m} - ARG_{Phagen} \quad (4-1)$$

Diese Vorgehensweise wurde auf eine Realprobe angewendet und ist im folgenden Kapitel beschrieben.

#### 4.2.1.2 Fraktionierung von Rohwasserproben

Um zu testen, wie die Anwendbarkeit der im Modell-System getesteten Kaskadenfiltration, Aufkonzentrierung, sowie Phagen-Fraktionierung für eine aquatische Umweltprobe ist, wurde ein zur Verfügung stehendes Oberflächenwasser (Flusswasser, Alz, Mai und August 2021, FRA1 und FRA2, siehe Tabelle 3-1) nach den möglichen Fraktionen getrennt auf ARG untersucht. In Abbildung 4-8 (links) sind die untersuchten Resistenzgene *sul1*, *sul2*, *blaCMY-2*,

*blaTEM*, *blaOXA-48*, *blaVIM-2* und *blaNDM-1* sowie das Integrase-Gen *intl1* nach dem Rückhalt auf den eingesetzten Filtern während der Kaskadenfiltration und der detektierten Konzentration im Filtrat nach der 0,2 µm Membran für beide Probenahmen im Mai und August 2021 (FRA1, FRA2) aufgeschlüsselt. Zusätzlich wurde mit den über die 5 kDa Membran in der Rührzelle aufkonzentrierten Filtraten < 0,2 µm ein DNase I Verdau durchgeführt, um die entsprechenden ARG in der Phagen-Fraktion zu bestimmen und die Konzentrationen in der eDNA-Fraktion daraus zu berechnen (Abbildung 4-8, unten). Es wurden weitere Resistenzgene verschiedener Antibiotikaklassen, darunter *vanA*, *blaSHV*, *mecA* und *mcr-1* untersucht. Diese konnten jedoch in keiner Probe nachgewiesen werden, weshalb die Ergebnisse nicht graphisch dargestellt sind.

Als chromosomales oder Plasmid-lokalisiertes Gen (Mazel 2006) wurde erwartet, dass sich *intl1* hauptsächlich auf den Membranen und weniger im Filtrat < 0,2 µm nachweisen lässt. Tatsächlich geht aus den Ergebnissen hervor, dass *intl1* am deutlichsten, mit Konzentrationen von 4,2 log (5 µm), 3,5 log (FRA1) bzw. 4,2 log (FRA2) (1,2 µm), 3,9 log (0,45 µm) GC/mL, auf den drei Membranen nachweisen lässt, die auch im Vorversuch den Rückhalt von Bakterien und Partikeln zeigten. Aufgrund von Membran-Fouling durch große Partikel und den damit einhergehend verstärkten Rückhalt von Bakterien, kann der hohe Nachweis auf den größer-porigen Membranen (5 und 1,2 µm) nicht definitiv auf Adsorption von Mikroorganismen an Sedimentpartikel zurückgeführt werden. Die Konzentrationen von *sul1* sind im Vergleich zu *intl1* ca. eine Log-Stufe reduziert. Dieses Gen ist jedoch als einziges Resistenzgen deutlich erhöht auf den Membranen 5 bis 0,45 µm nachweisbar. Dieses Ergebnis passt zu einer Studie, die zeigte, dass Integrons häufig mit Sulfonamid-Resistenzen assoziiert sind (Chaturvedi *et al.* 2021): Hier wurde für vier Flussproben gezeigt, dass *sul1* offenbar stärker mit Integrons assoziiert sein könnte (85,18 %) als *sul2* (76,54 %), was auch die Ergebnisse der Kaskadenfiltration mit der Probe aus der Alz bestätigen.

Das β-Laktamase Gen *blaTEM* hingegen wird in den Fraktionen 5 µm bis 0,2 µm im Vergleich zu den anderen ARG mit deutlich geringeren Konzentrationen detektiert. Dies spricht für eine erhöhte Abundanz in den Fraktionen < 0,2 µm, was durch die hohen Konzentrationen von 4,1 log GC/mL (FRA1) und 3,2 log GC/mL (FRA2) im Filtrat < 0,2 µm auch bestätigt wird. Trotzdem werden zusätzlich 2,0 (FRA1) und 1,9 (FRA2) log GC/mL bereits auf der 5 µm Membran nachgewiesen. Ein Grund dafür kann das Vorkommen des ARG als intrazelluläre DNA, oder als eDNA, bzw. Phagen-DNA, gebunden an Sedimentpartikeln, sein. Dass diese Fraktionen stark an Sedimentpartikeln adsorbieren können, kann durch die meist positiv geladene Oberfläche von Partikeln, sowie die negative Ladung von Biomolekülen erklärt werden und wird auch durch die Literatur bestätigt (Mao *et al.* 2014; Sivalingam *et al.* 2020; Torti *et al.* 2015; Zarei-Baygi und Smith 2021). Eine vollständige Aufschlüsselung der Fraktionen ist in dieser Größenordnung (> 0,2 µm) mit der angewandten Methode nicht möglich.

Anhand von Vergleichsmessungen einer Probe, deren DNA nach Standard-Verfahren nach Filtration über eine 0,2 µm PES-Membran extrahiert wurde, konnte sichergestellt werden, dass die Summe der auf allen Filtern der Kaskade detektierten ARG den nachweisbaren Konzentrationen der Standardmethode entspricht (Abbildung 8-2, Anhang).

Im Gegensatz dazu konnte der Verdau der eDNA mit DNase I tiefere Einblicke in die Verteilung der Gene innerhalb der Fraktion < 0,2 µm gewähren. So wird anhand von Abbildung 4-8 (unten) deutlich, dass vor allem *intl1*, *sul1*, *sul2* und *blaTEM* am stärksten in der eDNA-Fraktion vertreten zu sein scheinen. Bakterien sind fähig DNA aktiv abzugeben und DNA wird zusätzlich durch das Absterben und die damit einhergehende Lyse von bakteriellen Zellen freigesetzt (Torti *et al.* 2015). Demnach war zu erwarten, dass die ARG-Konzentration in der eDNA Fraktion für alle vier detektierbaren Gene vergleichsweise hoch ist. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Fraktionen lässt sich für die intrazelluläre/Partikel-assoziierte Fraktion und die Phagen-Fraktion feststellen. Mit 2,6 (FRA1) und 2,2 (FRA2) log GC/mL wird *blaTEM* mit am häufigsten in der Phagen-Fraktion detektiert. Auch *sul1* und *sul2* scheinen dort in ähnlich

hohen Konzentrationen vorzukommen. Interessanterweise geht dieser Fund einher mit einigen Quellen, die ebenfalls *blaTEM* und *sul1* in hohen Abundanzen in Bakteriophagen aus Fäzes-, Klärschlamm- und Umweltproben nachweisen konnten (Brown-Jaque *et al.* 2018; Calero-Cáceres *et al.* 2014; Colomer-Lluch *et al.* 2011; Quirós *et al.* 2014). Quirós *et al.* (2014) haben durch Sequenzierung der detektierten *blaTEM* Gene zudem herausgefunden, dass die Sequenzen homolog zu *blaTEM* Genen verschiedener Bakterien (darunter die Stämme *Klebsiella*, *Escherichia*, *Vibrio*) sind. Dadurch wird hervorgehoben, wie relevant HGT und speziell die Transduktion bei der Verbreitung von ARG sein kann.

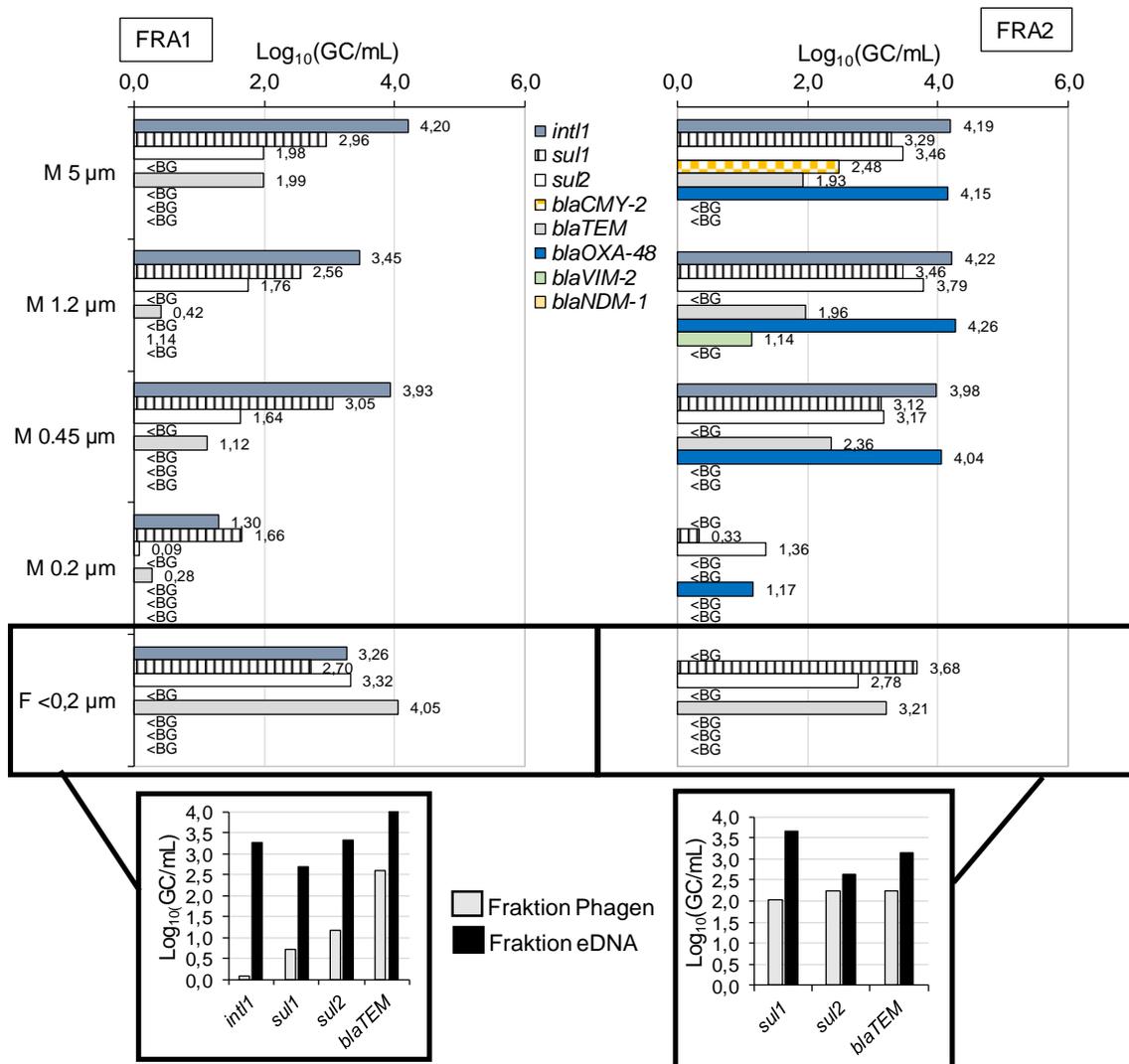


Abbildung 4-8 Kaskadenfiltrationen der beiden Alz-Proben (FRA1, FRA2) und anschließender DNase Verdau zur Bestimmung der ARG in der eDNA- und Phagen-Fraktion (Mitte).

Die im Modellsystem und zweifach an einer aquatischen Umweltprobe getestete Fraktionierungsmethode von intrazellulären/Partikel-assoziierten Fraktionen > 0,2 µm bis zur weiteren Aufschlüsselung der Fraktionen eDNA und Phagen konnte für den separierten Nachweis von ARG verwendet werden. Weitere Proben, die im zeitlichen Rahmen der Arbeit nach Methoden etablieren leider nicht mehr zur Verfügung standen, müssen mit dieser Methode getrennt und auf ARG analysiert werden, um auch die Reproduzierbarkeit zu bestätigen. Die Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche ARG offenbar unterschiedlich stark in den Fraktionen auftreten. Dies kann dazu führen, dass sich bestimmte Resistenzen gegebenenfalls schneller verbreiten als andere. Dazu kommt, dass einige Bakterien bei externem Stress zur eDNA-Freisetzung oder auch zur Aufnahme von eDNA neigen. Zu

solchen Stressoren zählen geringe Konzentrationen an Antibiotika oder anderen chemischen Substanzen, die durch verschiedene Quellen ständig in die Umwelt entlassen werden. Durch das nachgewiesene hohe Vorkommen der Resistenzgene auch in der eDNA Fraktion kann auch der Prozess der natürlichen Transformation ein starker Promotor für die Transmission von ARG in der Umwelt darstellen.

#### 4.2.1.3 Fazit der Methodenetablierung

Die Kaskadenfiltration ermöglicht einen Überblick über die Verteilung von ARG in den Fraktionen  $> 5 \mu\text{m}$ ,  $1,2 \text{ bis } 5 \mu\text{m}$ ,  $0,45 \text{ bis } 1,2 \mu\text{m}$  und  $0,2 \text{ bis } 0,45 \mu\text{m}$ . Da Bakterien bereits auf dem  $0,45 \mu\text{m}$  Filter zurückgehalten werden, ist davon auszugehen, dass es sich bei Befunden auf der  $0,2 \mu\text{m}$  Membran um an kleinen Partikeln assoziierte eARG handeln könnte. Die anschließende Aufkonzentrierung des Filtrats nach der Kaskadenfiltration scheint essentiell zu sein, da hier erneut höhere Konzentrationen einzelner ARG detektiert werden konnten. Diese Fraktion, die bei der Standardmethode verworfen wird, enthält höchstwahrscheinlich eDNA und Phagen. Durch eine enzymatische Entfernung der eDNA konnte außerdem der Anteil der ARG in der reinen Phagenfraktion bestimmt werden. Die Ergebnisse der fraktionierten Untersuchung von ARG lassen vermuten, dass sowohl die freie eDNA, als auch Phagen wichtige ARG-Träger sind und diese für zukünftige Untersuchungen zur Verbreitung von Resistenzen in der aquatischen Umwelt stärker fokussiert werden sollten.

## 4.2.2 Kulturbasierte Verfahren zum Nachweis $\beta$ -Laktam-resistenter Umweltbakterien

### 4.2.2.1 Vorversuche zur Etablierung der Methode

Um zunächst zu evaluieren, ob sich die Methode nach Reasoner und Geldreich (1985) für die Isolation von Umwelt-relevanten Bakterien in Kombination mit zum Medium zugegebenen Cephalosporinen und Carbapenemen ( $\beta$ -Laktam-Antibiotika) eignet, oder ob eine Erniedrigung der Nährstoffkonzentration oder Temperatur zusätzlich förderlich ist, wurden drei Oberflächenwässer unter den in Tabelle 3-11 aufgelisteten Bedingungen nach Membranfiltration inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-9 dargestellt.

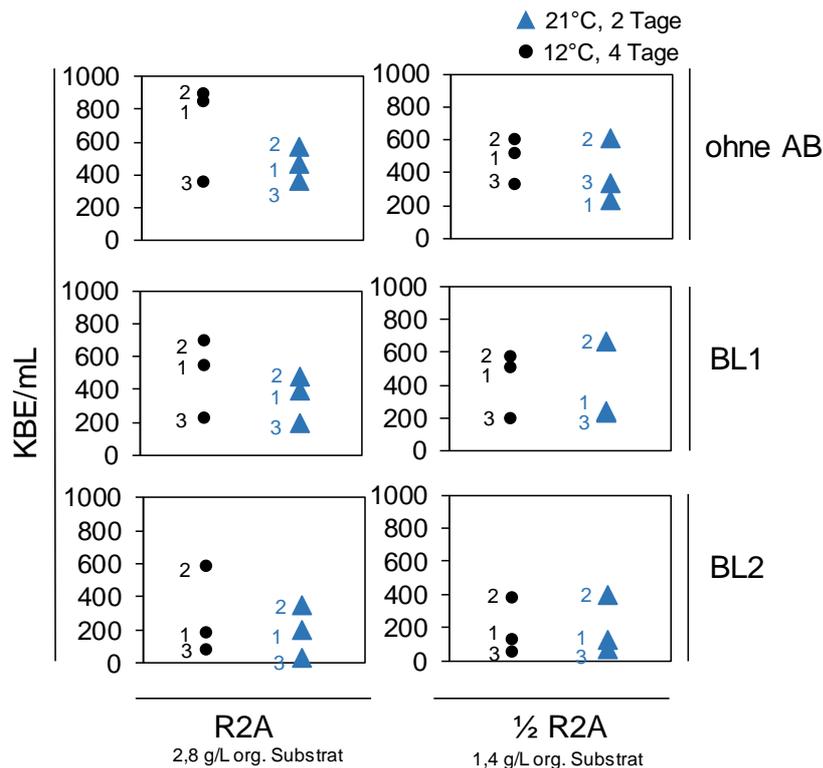


Abbildung 4-9 Vorversuche zur Etablierung der R2A-basierten Kulturverfahren für den Nachweis von  $\beta$ -Laktam-resistenten Umweltbakterien. Die Punkte zeigen die Koloniezahlen von drei Oberflächenwässern (OW5 (1), 6 (2) und 19 (3), Tabelle 3-1).

Anhand der Vorversuche fällt auf, dass die Koloniezahlen der drei Oberflächenwässer sich zwischen den eingesetzten Nährstoffkonzentrationen R2A und halbkonzentrierten R2A (unabhängig vom Zusatz der Antibiotika) nicht signifikant unterscheiden. Die weitere Reduktion der organischen Substrate scheint demnach keinen Vorteil zu bieten. Auf dem halbkonzentrierten R2A Agar mit und ohne Antibiotika, sind zwischen den beiden Inkubationstemperaturen 12 und 21°C keine großen Schwankungen in der Koloniezahl erkennbar. Auf dem Standard-R2A-Medium jedoch, konnte eine große Streuung der KBE/mL zwischen den Oberflächenwässern bei 12°C beobachtet werden. Vor allem für R2A ohne AB liegt der Mittelwert der bei 12°C inkubierten Wasserproben deutlich über dem der bei 21°C inkubierten Proben. Auf dieser Grundlage wurde entschieden, dass sich die von Reasoner und Geldreich (1985) etablierten Bedingungen am besten eignen und auch unter Zusatz von entsprechenden Antibiotika reproduzierbare Ergebnisse liefern. Im Umkehrverfahren wurde zudem getestet, ob die auf R2A isolierten Stämme sich auf nährstoffreicheres Medium (DEV-Medium) übertragen lassen. Dabei wurde festgestellt, dass die meisten der Isolate (Isolate unterschiedlicher Phänotypen wurden stichprobenartig ausgewählt) nicht fähig waren auf dem Medium mit 20 g/L organischem Substrat erneut anzuwachsen. Ein exemplarisches Bild ist in Anhang 8.4.1.2 gezeigt. Unabhängig von Inkubationstemperatur und Nährstoffkonzentration

ließ sich für alle Oberflächenwässer ein ähnlicher Trend beobachten: Die Koloniezahlen waren auf den Medien mit AB stets geringer, im Vergleich zum R2A-Medium ohne AB, wobei BL2 verglichen mit BL1 zu einer weiteren Reduktion der Kolonien führte. Mittelt man die Koloniezahlen aller hier getesteten Proben erhält man 508 KBE/mL ( $\pm 206$ ) für R2A, 451 KBE/mL ( $\pm 189$ ) für BL1 und 215 KBE/mL ( $\pm 173$ ) für BL2 (dargestellt in Abbildung 4-10).

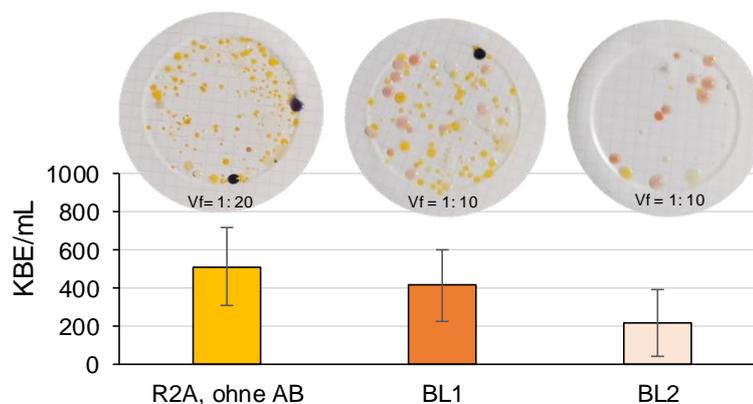


Abbildung 4-10 Mittelwerte der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL für drei Oberflächenwässer OW5, 6 und 19 (Dez. 2019, Tabelle 3-1) unter n=12 in den Vorversuchen getesteten Bedingungen mit exemplarischen Bildern der Kolonien auf den entsprechenden Medien. Vf = Verdünnung der Probe. R2A= Medium ohne Antibiotika (AB) für oligotrophe Bakterien, BL1= R2A Medium mit Cephalosporinen, BL2= R2A Medium mit Carbapenem.

Aufgrund der Tatsache, dass Carbapeneme (enthalten in BL2) als Reserveantibiotika für die Anwendung in der Human- und Veterinärmedizin zurückgehalten werden (GERMAP 2015), erscheint der Trend, der sich anhand der drei Oberflächenwässer ergibt, plausibel. Die geringere Anwendung dieser Antibiotikagruppe führt zu geringeren Einträgen in die aquatische Umwelt, wodurch erwartet werden kann, dass Carbapenem-resistente Umweltorganismen den Cephalosporin-resistenten in der Zahl unterlegen sein könnten. Auf den Platten konnten Kolonien mit verschiedenen Morphologien beobachtet werden. Um die Erfassung der unterschiedlichen Kolonien für eine weitere Identifizierung der Bakterienspezies zu vereinfachen, wurden sie nach den in Abbildung 4-11 zusammengefassten Phänotypen/farblichen Unterschieden kategorisiert. Dabei wurden die Größe und geringe farbliche Abweichungen nicht berücksichtigt. Selten wurden weitere Phänotypen beobachtet (z.B. grünliche). In die aufgeführten Kategorien konnten jedoch stets die meisten Kolonien eingliedert werden.

Blau (B)		Weiß (W)	
Gelb (G)		Weiß mit krauser Struktur (WK)	
Orange (O)		Creme (C)	
Rot (R)		Transparent (T)	

Abbildung 4-11 Kategorisierung der Umweltisolate nach ihrer Morphologie.

Entsprechend der Kolonien pro Phänotyp auf einer Agar-Platte, wurden sich voneinander unterscheidende Vertreter der Kategorien untersucht indem die Gattungsebene mittels MALDI-TOF-MS identifiziert wurde.

Auf Basis der durchgeführten Vorversuche, konnte für alle Proben und Inkubationsbedingungen beobachtet werden, dass die Reduktion der KBE/mL nicht proportional zur Verdünnungsstufe ist. Deshalb wurde ein weiterer Versuch mit nur einer exemplarischen Rohwasserprobe gemacht, indem verschiedene Verdünnungsstufen einer Probe (Oberflächenwässer Rhein Januar 2020) hergestellt und untersucht wurden ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ). Die Gesamtzellzahl der Probe wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und betrug für die unverdünnte Probe rund  $10^6$  Zellen/mL. Die erhaltenen KBE wurden auf einen Milliliter bezogen dargestellt, um die Abweichungen zwischen den dezimalen Verdünnungsstufen zu verdeutlichen. Abbildung 4-12 zeigt, dass die Zahl der KBE/mL deutlich unter der Gesamtzellzahl liegt. Unter dem Aspekt, dass alle Kulturverfahren selektive Verfahren sind und bekannt ist, dass ca. 99 % der Bakterien bisher nicht isoliert werden konnten (Vartoukian *et al.* 2010), ist diese Differenz nicht verwunderlich. Vergleicht man jedoch die KBE/mL der untersuchten Verdünnungsstufen fällt auf, dass diese trotz Einbeziehung des Verdünnungsfaktors nicht übereinstimmen. Bei der Filtration von 1 mL konnten für die Verdünnungsstufe  $10^{-2}$  noch Kolonien auf dem R2A Medium detektiert werden und auf den Medien BL1 und BL2 wuchsen für die Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  entsprechende Kolonien, obwohl die Daten mit den niedrigeren Verdünnungsstufen dies nicht erwarten ließen. Abhängig von der Herkunft einer Probe und der darin erhaltenen Bakterienzahl kann die Filtration eines höheren Volumens demnach nötig sein, um überhaupt Umweltisolate zu erhalten. Bereits bei 10-facher Verdünnung oder Filtration von nur 0,1 mL der Probe können für die beiden genannten Verdünnungsstufen keine KBE mehr detektiert werden. Auf der anderen Seite scheint die Inkubation eines größeren Probevolumens (1 mL) zu einer reduzierten KBE/mL zu führen. Dies kann beispielsweise an Konkurrenzprozessen liegen, wobei schneller wachsende Organismen das Wachstum langsamer wachsender Organismen inhibieren können (Kümmerer 2009).

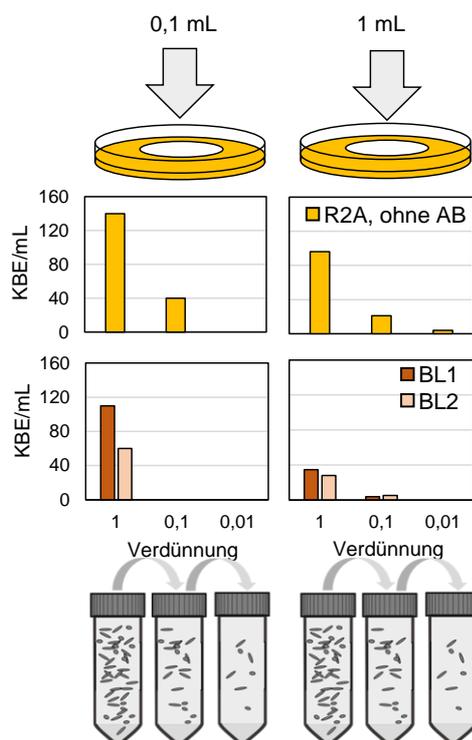


Abbildung 4-12 Untersuchungen zum Einfluss des Proben-Verdünnungsfaktors auf die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE). R2A= Medium ohne Antibiotika (AB) für oligotrophe Bakterien, BL1= R2A Medium mit Cephalosporinen, BL2= R2A Medium mit Carbapenem.

Vor allem im Umweltbereich handelt es sich hierbei um eine bekannte Problematik für die im Normverfahren DIN EN ISO 8199 die Filtration mehrerer Verdünnungsstufen vorgeschlagen wird. Die KBE/mL wird anschließend nach Gleichung (4-2) berechnet, wobei  $KBE_{V1-3}$  die gezählten Kolonien der Verdünnungsstufen sind und  $V$  das Filtrationsvolumen multipliziert mit den entsprechend eingesetzten Verdünnungsfaktoren (VF).

$$KBE \left[ \frac{1}{mL} \right] = \frac{KBE_{V1} + KBE_{V2} + KBE_{V3}}{V [mL] \cdot (VF1 + VF2 + VF3)} \quad (4-2)$$

Zur besseren Einordnung der Ergebnisse aus dem Kultur-Nachweis von oligotrophen  $\beta$ -Laktam-resistenten Bakterien auf den nährstoffarmen Medien wurden die Wasserproben parallel auf dem chromogenen ESBL Medium inkubiert, die Koloniezahlen erfasst und die Kolonien mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. Hierbei wurde die Temperatur des Standardverfahrens (41 °C) mit der Inkubation bei nur 21 °C verglichen. Die nach je 22 ( $\pm 2$ ) h erhaltenen Koloniezahlen sind pro Milliliter in Abbildung 4-13 gezeigt. Hierbei ist die logarithmische Skalierung der y-Achse zu beachten, da auf dem ChromESBL Medium bei 21 °C ca. Faktor 1000 höhere KBE/mL isoliert werden konnten. Um die entsprechenden Koloniezahlen bei 41 °C zu erhalten, mussten 100 mL der Oberflächenwässer filtriert werden, jedoch nur 0,1 mL für die Inkubation bei 21 °C.

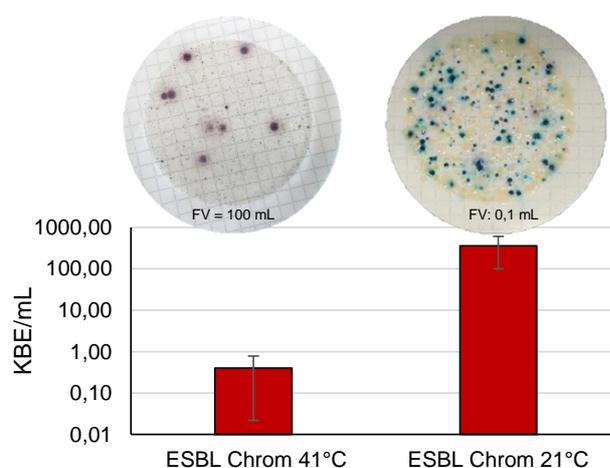


Abbildung 4-13 Mittelwerte der koloniebildende Einheiten pro mL für drei Oberflächenwässer OW5, 6 und 19 auf ESBL Chrom Agar (Dez. 2019, Tabelle 3-1, n=3) mit exemplarischen Bildern der Kolonien auf den entsprechenden Medien. FV = Filtrationsvolumen der Probe.

Gemittelt über die drei OW-Proben wurden nur 0,6 ( $\pm 0,4$ ) KBE/mL im Standardverfahren auf ChromESBL isoliert. Dabei konnten einige Arten isoliert werden, die auch von der WHO (2017) aufgrund der ESBL-Bildung als kritische Pathogene eingestuft werden. Darunter befanden sich *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie die coliformen Bakterien *Escherichia coli* und *Enterobacter cloacae* (zusammengefasst in Tabelle 4-1). Als Begleitflora wurden bei 41 °C zudem Gattungen wie *Citrobacter*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* und diverse weitere Arten von *Pseudomonas* isoliert werden. Auch von diesen Gattungen existieren pathogene Arten, die jedoch nicht in der WHO-Prioritätenliste erwähnt sind und meist ursprünglich aus Böden, Pflanzen, Oberflächen- oder Grundwasser stammen (Berg *et al.* 1999; Hayes *et al.* 2017; Pschyrembel *et al.* 2002). Die Reduktion der Inkubationstemperatur auf 21 °C (und Verlängerung der Inkubationsdauer entsprechend auf 2 Tage) führte zu einer deutlich größeren Anzahl an Isolaten von 357 ( $\pm 256$ ) KBE/mL, unter welchen sich weniger Arten mit hygienischer Relevanz befanden. *E. coli*, und *P. aeruginosa* konnten hier noch nachgewiesen werden. Alle anderen Stämme, darunter *Acinetobacter*, *Aeromonas* und erneut diverse Arten *Pseudomonas* wurden durch MALDI-TOF-MS Gattungen und Arten mit Umweltrelevanz zugeordnet (Dworkin *et al.* 2006; Towner 2006). Laut der Identifizierung der Isolate aus den Vorversuchen können auch auf den R2A Medien ohne Antibiotika hygienisch relevante Arten, darunter *Enterobacter kobei*, *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* gefunden werden. Diese kamen jedoch in deutlicher Unterzahl vor. Umwelt-relevante Bakterien der Gattung *Janthinobacterium* konnten hingegen in großer Zahl auf allen R2A-basierten Medien gefunden werden. Generell wurde auf dem R2A Medium ohne Antibiotika die größte Vielfalt an Bakterien-Gattungen gefunden, während diese

auf den Medien BL1 und BL2 reduziert war. Auf den ChromESBL Medien konnten 4 % der untersuchten Isolate nicht identifiziert werden. Für die auf R2A ohne Antibiotika isolierten Kulturen stieg dieser Anteil bereits auf 19 % an. Auch 17 % der mit MALDI-TOF-MS untersuchten Isolate von BL1 konnten nicht identifiziert werden. Für BL2 stieg der Anteil sogar auf 35 % an. Da die Datenbank des MALDI-TOF-MS für den klinischen Bereich angelegt wurde und darauf aufbauend immer mehr Protein-Spektren eingespeist wurden, ist es nicht überraschend, dass die Identifizierung einiger Umwelt-relevanter Gattungen nicht möglich war. Einige wenige zusätzliche Gattungen auf BL1 und BL2, darunter *Duganella*, *Pedobacter* und *Pseudoduganella*, konnten durch eine 16S Sequenzierung (S) ergänzend identifiziert werden. Die Art identifizierter Isolate wurde nur erfasst, wenn der Score Value zwischen 2,0 und 3,0 lag. Andernfalls, also bei einem Score Value von 1,7 bis 1,99 oder verschiedenen Arten unter den 10 ersten Treffern, wurde die Identität der Isolate nur auf Gattungsebene festgehalten.

Tabelle 4-1 Über MALDI-TOF-MS auf den verschiedenen Medien identifizierte Isolate (auf Gattungsebene).

Medium	Gattungen	Potentiell klinisch relevant*
ChromESBL 21 und 41°C	<i>Acinetobacter</i>	ja ( <i>A. baumannii</i> )
	<i>Aeromonas</i>	nein
	<i>Citrobacter</i>	nein
	<i>Escherichia</i>	ja ( <i>E. coli</i> )
	<i>Enterobacter</i>	ja ( <i>E. cloacae</i> )
	<i>Pseudomonas</i>	ja ( <i>P. aeruginosa</i> )/ nein
	<i>Ralstonia</i>	nein
	<i>Serratia</i>	nein
	<i>Stenotrophomonas</i>	nein
R2A ohne Antibiotika 12 und 21°C	<i>Acinetobacter</i>	nein
	<i>Aeromonas</i>	nein
	<i>Athrobacter</i>	nein
	<i>Bacillus</i>	nein
	<i>Citrobacter</i>	nein
	<i>Comamonas</i>	nein
	<i>Enterobacter</i>	ja ( <i>E. kobei</i> )
	<i>Erwinia</i>	nein
	<i>Escherichia</i>	ja ( <i>E. coli</i> )
	<i>Ewingella</i>	nein
	<i>Exiguobacterium</i>	nein
	<i>Flavobacterium</i>	nein
	<i>Janthinobacterium</i>	nein
	<i>Klebsiella</i>	ja ( <i>K. pneumoniae</i> )
<i>Pseudomonas</i>	nein	
<i>Shewanella</i>	nein	
BL1 12 und 21°C	<i>Acinetobacter</i>	nein
	<i>Comamonas</i>	nein
	<i>Duganella</i> (S)	nein
	<i>Flavobacterium</i>	nein
	<i>Janthinobacterium</i>	nein
	<i>Pedobacter</i> (S)	nein
	<i>Pseudomonas</i>	nein
BL2 12 und 21°C	<i>Duganella</i> (S)	nein
	<i>Janthinobacterium</i>	nein
	<i>Massilia</i> (S)	nein
	<i>Pseudoduganella</i> (S)	nein

\*resistente Pathogene und Fäkalindikatoren (lt.WHO 2017)

(S) Identifizierung durch 16S rDNA Sequenzierung

Bei den in Tabelle 4-1 gezeigten Gattungen handelt es sich nur um einen kleinen Auszug der isolierten Bakterien, da nicht alle Isolate untersucht wurden. Dennoch wurde die

stichprobenartige Identifizierung von phänotypisch differenzierbaren Kultur-Einheiten als eine gute Methode angesehen, um das Konsortium  $\beta$ -Laktam bildender Umweltbakterien zusammenfassend abzubilden und zumindest Veränderungen in zeitlichen Verläufen oder Unterschiede zwischen Rohwässern detektieren zu können.

Ein zusammenfassendes Schema der angepassten Kulturverfahren für den Nachweis von Cephalosporin- und Carbapenem-resistenten oligotrophen Bakterien ist in Abbildung 4-14 dargestellt.

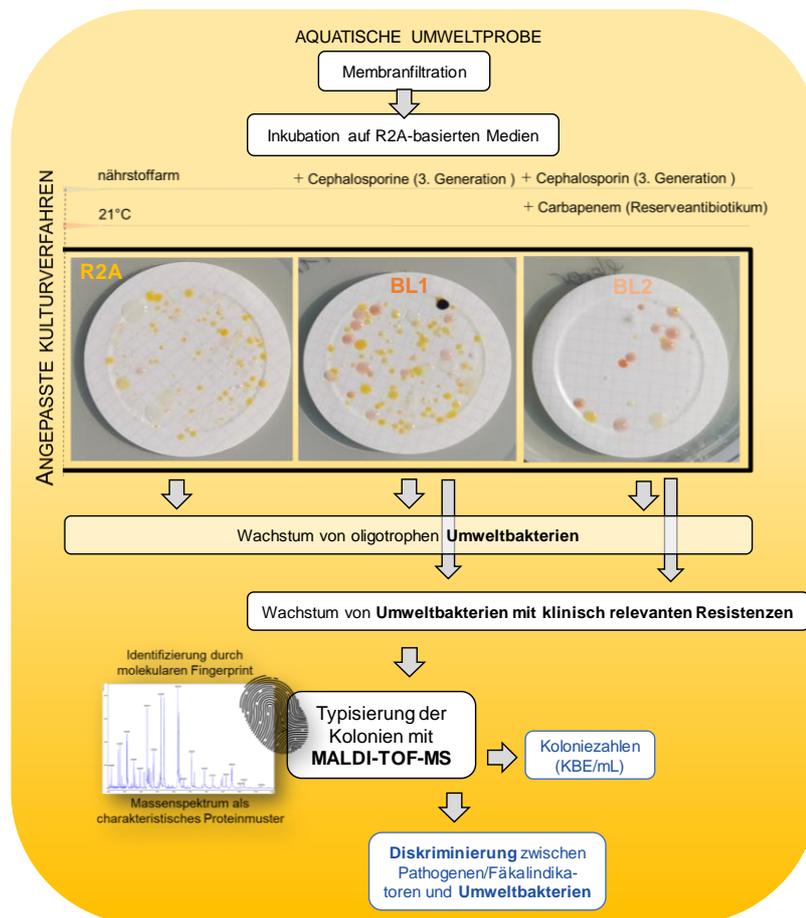


Abbildung 4-14 Entwickelte Methode für den Nachweis von oligotrophen  $\beta$ -Laktam-resistenten Bakterien.

#### 4.2.2.2 Anwendung auf aquatischen Umweltproben

Aus vier verschiedenen Oberflächengewässern (Flüssen) wurden an mehreren Probenahmeterminen insgesamt 28 Proben gewonnen, um die entwickelten R2A-basierten Kultivierungsmethoden für die Untersuchung von  $\beta$ -Laktamase-produzierenden oligotrophen Bakterien, im Weiteren auch Umweltbakterien oder -stämme genannt, zu testen. In den verschiedenen Flüssen, aber auch in den gleichen Flüssen zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten, variierte die Anzahl der koloniebildenden Einheiten stark. Daher wurden für alle eingesetzten Medien hohe Standardabweichungen ermittelt. Saisonale Schwankungen im Auftreten von  $\beta$ -Laktam- und Cephalosporin-resistenten Bakterien wurden auch von Siedlecka *et al.* (2020) dokumentiert, möglicherweise verursacht durch starke Regenfälle oder lange Trockenperioden. Die Daten für 28 untersuchte Oberflächenwasserproben sind als Boxplots in Abbildung 4-15 dargestellt. Mit einem Medianwert von  $6,1 \times 10^4$  KBE/100 mL (Minimum  $4,0 \times 10^3$  KBE/100 mL, Maximum  $7,6 \times 10^5$  KBE/100 mL) wurden die höchsten Koloniezahlen auf dem antibiotikafreien R2A-Medium erzielt. Vergleichbare KBE wurden in anderen Studien erzielt, die die Kultivierung oligotropher Bakterien aus Oberflächenwässern untersuchten. So konnten Oh *et al.* (2009) zwischen  $10^4$  und  $10^6$  KBE/100 mL auf R2A Medium nachweisen.

Viele andere Studien haben erfolgreich oligotrophe Bakterien durch Anwendung dieses nährstoffarmen Mediums zum Teil mit leichten Modifikationen isoliert (Chakraborty *et al.* 2013; Garcia-Armisen *et al.* 2013; Geesink *et al.* 2018; Reasoner und Geldreich 1985; Zhang *et al.* 2018a). Garcia-Armisen *et al.* (2013) veröffentlichten Daten, die zeigen, dass oligotrophe (hier definiert als langsam wachsende Bakterien) Organismen die Mehrheit unter den aquatischen Bakterien in Flüssen darstellen. Mit  $1,7 \times 10^4$  KBE/100 mL auf BL1 bzw.  $4,0 \times 10^3$  KBE/100 mL auf BL2 liegen die Medianwerte für die Koloniezahlen von Medien mit Antibiotika deutlich niedriger. Am deutlichsten war der Rückgang der Koloniezahlen bei BL2, welches Meropenem enthält. Die immer noch hohen Zahlen isolierbarer Bakterien auf BL1 und BL2 sind nicht überraschend, da die Resistenzen einen Wettbewerbsvorteil in einem sehr variablen Konsortium von Umweltbakterien bringen (Finley *et al.* 2013). Die Varianz der Koloniezahlen unter den untersuchten Wasserproben war hoch. Trotzdem war ein signifikant wiederkehrender Trend unter allen Proben erkennbar: Im Durchschnitt wurden für die 28 untersuchten Wasserproben 48,3 % ( $\pm 26,1$  %) von BL1/R2A berechnet, während das durchschnittliche Verhältnis von BL2/R2A mit 22,5 % ( $\pm 23,0$  %) geringer ausfiel, wie in Abbildung 4-15 (C) dargestellt ist. Anhand dieser Verhältnisse sind jedoch keine quantitativen Aussagen über den Anteil resistenter Isolate an allen oligotrophen Isolaten möglich. Einige Bakterienstämme wachsen möglicherweise nicht auf dem AB-freien R2A-Agar, da das Wachstum durch schneller wachsende Bakterien gehemmt werden könnte, was das Verhältnis verfälschen kann. Dennoch konnten ähnliche Verhältnisse visuell beobachtet werden, indem die Stempelmethode angewandt wurde, um Kolonien von R2A ohne Antibiotika auf BL1 und BL2 und erneut auf eine neue AB-freie R2A-Platte zur Kontrolle zu übertragen (Abbildung 8-5, Anhang 8.4.2). Bei diesen Untersuchungen wurden ähnliche Verhältnisse an Cephalosporin-resistenten sowie Cephalosporin- und Carbapenem-resistenten Bakterien ermittelt.

Da Carbapenem-Antibiotika als Reserveantibiotika eingestuft werden, ist die Anwendung im Vergleich zu Cephalosporinen der 3. und 4. Generation in deutschen Krankenhäusern eingeschränkt (Kern *et al.* 2015; Kern *et al.* 2019). Im Gegensatz dazu hat der Einsatz von Oralcephalosporinen deutlich zugenommen (GERMAP 2015). In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass die Resistenz gegen Carbapeneme bei infektiösen *E. coli*, die im Krankenhaus isoliert wurden, eine untergeordnete Rolle spielt ( $< 1$  %). Daher haben Carbapeneme (wie Meropenem) nach wie vor eine große Bedeutung bei der Behandlung von Erregern, die gegen gängigere Antibiotika resistent sind, ebenso wie *E. coli* mit einem ESBL-Phänotyp oder Fluorochinolin-Resistenz, die in den letzten Jahren (1995 - 2010, GERMAP 2015) deutlich zugenommen haben. Generell sind die Zellzahlen aus den Kulturansätzen stark abhängig von Jahreszeiten, Wetter und anthropogenen Einflüssen im Vorfeld der Probenahme-Stellen. Dennoch unterstreichen die vorgestellten Ergebnisse für vier unabhängige Oberflächengewässer, dass die  $\beta$ -Laktam-Resistenz unter oligotrophen Bakterien bereits weit verbreitet ist, was von vielen Autoren seit Jahren und bis heute vermutet wurde (Amarasiri *et al.* 2020; Davies und Davies 2010; He *et al.* 2020; Hooban *et al.* 2020; Nielsen *et al.* 2007; Smalla *et al.* 2018; Vikesland *et al.* 2017; Zhao *et al.* 2018).

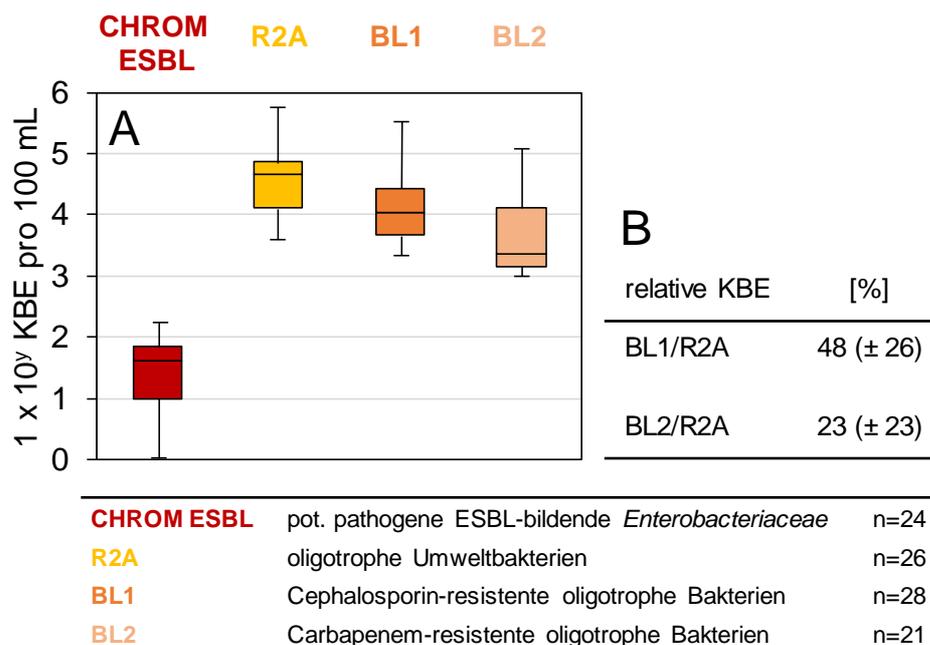


Abbildung 4-15 (A) Koloniebildende Einheiten (KBE) pro 100 mL Oberflächenwasser auf ChromESBL Medium, auf R2A-Medium, BL1 und BL2 (R2A-basiert und mit Antibiotika dotiert). Daten von n=21 bis 28 Wasserproben. (B) Auf den  $\beta$ -Laktam-haltigen Medien BL1 und BL2 gewachsene Kolonien im Verhältnis zu den auf dem antibiotikafreien R2A-Medium isolierten Kolonien (durchschnittlicher Prozentsatz [%] aus den Oberflächenwasserproben, wobei das Verhältnis für jede Probe separat berechnet wurde).

Ähnliche Ansätze mit R2A-Medium, aber anderen Antibiotika, wurden bereits zur Isolierung von ARB aus Umweltproben angewandt (Garcia-Armisen *et al.* 2013; Piotrowska *et al.* 2017). Piotrowska *et al.* (2017) isolierten  $1,5 \times 10^4$  KBE/mL auf R2A-Agar ohne Zusätze aus einer aquatischen Umweltprobe. Hier wurden exemplarische Isolate ausgewählt und ihre Fähigkeit, auf Antibiotika-haltigem R2A-Agar (Streptomycin, Tetracyclin, Erythromycin) zu wachsen, untersucht. Es wurde jedoch keine direkte Inkubation einer Wasserprobe auf antibiotikahaltigen Medien durchgeführt. Bakteriengattungen wie *Stenotrophomonas* und *Pseudomonas* wurden am häufigsten nachgewiesen. Garcia-Armisen *et al.* (2013) kultivierten Flussproben der Seine auf drei Medien mit unterschiedlichem Nährstoffgehalt, die mit Antibiotika (Tetracyclin, Amoxicillin, Sulfometoxazol) versetzt waren. Auch hier konnte die enorme Varianz der KBE/L beim Vergleich der zählbaren Isolate von zwei verschiedenen Seine-Probenahmestellen flussauf- und flussabwärts von Paris festgestellt werden: Mit einer Spanne von 4 Logstufen wurden  $10^3 - 10^7$  KBE/L bei der Bebrütung der Flusswasserproben auf mit Antibiotika angereichertem R2A-Agar erzielt, was mit den Ergebnissen der mit Cephalosporin/Carbapenem versetzten Medien übereinstimmt. Weitere bereits publizierte Arbeiten von ARB auf nährstoffarmen Medien mit Antibiotika isolierten Bakterien sind in

Tabelle 3-10 zusammengefasst. Die Tatsache, dass oligotrophe Bakterien, die gegen Reserveantibiotika resistent sind, ähnliche KBE-Zahlen aufweisen wie solche, die gegen gängige Antibiotika resistent sind, unterstreicht die Verbreitung dieser ARB in der aquatischen Umwelt.

Parallel zur Prüfung von R2A-basierten Kultivierungsmethoden für die Isolierung von  $\beta$ -Laktam-resistenten oligotrophen Bakterien wurden auch ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae*, die "kritischen resistenten Erreger" gemäß der WHO (2017) in den Wasserproben repräsentieren (Schreiber *et al.* 2021), auf ChromESBL isoliert. Die Bebrütung auf ChromESBL-Medium ergab ein Wachstum von 0 – 170 KBE/100 mL, wie in Abbildung 4-15 (A) dargestellt. Der Mittelwert von 41 KBE/ 100 mL deckt sich mit Erkenntnissen anderer Studien, die bereits das Vorkommen von ARB- und insbesondere ESBL-produzierenden Erregern in der aquatischen Umwelt weltweit nachweisen konnten (Adelowo *et al.* 2018; Bergeron *et al.* 2015; Caltagirone *et al.* 2017; Hooban *et al.* 2020; Korzeniewska *et al.* 2013; Schreiber *et al.* 2021; Schwartz und Schmithausen 2020).

Trotzdem sind die Werte, im Kontrast zu den adaptierten R2A-basierten und  $\beta$ -Laktam-versetzten Nährböden vergleichsweise niedrig (ca. Faktor 1000 niedriger). Die detektierten ESBL-bildenden Erreger werden wahrscheinlich aus Kliniken in die Umwelt verbreitet, was bereits zuvor von Müller *et al.* (2018) beschrieben wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass über 99 % aller aus klinischen und ländlichen Abwässern gewonnenen Isolate resistent gegen Cephalosporine waren. Der Verdünnungseffekt führt in der aquatischen Umwelt zu einem geringeren Anteil resistenter Isolate an den Gesamtisolaten, aber dennoch sind die nachgewiesenen KBE/100 mL-Werte alarmierend. Auch der Nachweis resistenter Biofilme in klinischen Abwassernetzen (Sib 2019) deutet auf die Verbreitung von ARG und ARB in anthropogenen Hotspots in die Umwelt hin. Ähnliche Vermutungen werden von Lamba *et al.* (2020) geäußert, die hohe ARB- und ARG-Konzentrationen in Oberflächenwässern auf die Einleitung von Abwasser zurückführen.

Durch die Untersuchung von Isolaten auf spezielle ARG mittels PCR, war eine Gruppierung der Resistenzgene (im Detail gezeigt in Abbildung 4-4), die für die Cephalosporin-Resistenz verantwortlich sind, und derjenigen, die zusätzlich für Carbapenemasen kodieren, möglich. Dadurch lässt sich eine klare Wechselbeziehung zwischen dem Auftreten der Resistenzgruppen und den gewachsenen oligotrophen Bakterien auf den antibiotikahaltigen R2A-Medien BL1 und BL2 erkennen. Abbildung 4-16 zeigt, dass die Cephalosporin- und Carbapenem-Resistenzgene in einem ähnlichen Verhältnis wie die KBE von BL2 pro R2A vertreten sind. Die Resistenzgene, die nur für Cephalosporin-Resistenz kodieren, treten teilweise in deutlich erhöhten Anteilen auf, was zu einer größeren Streuung führt, aber der Anteil der KBE von BL1 pro R2A ist immer noch vergleichbar mit dem Bereich der positiven Cephalosporin-Resistenzgene in allen untersuchten Proben.

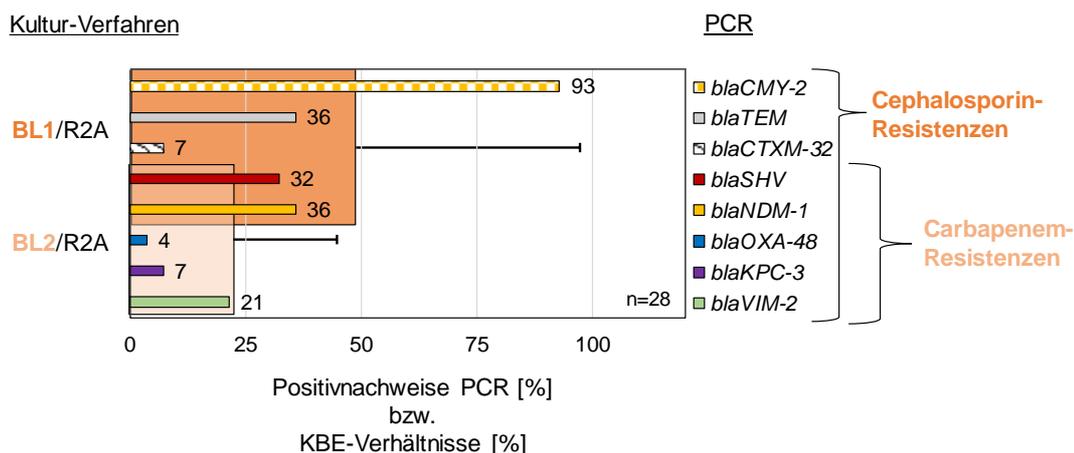


Abbildung 4-16 Vergleich zwischen Kultur- und PCR-basierten Methoden zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt. Dargestellt sind die Anteile der auf BL1 bzw. BL2 isolierten KBE/100 mL gegenüber den auf R2A isolierten KBE aller untersuchten Oberflächenwasserproben sowie die prozentualen positiven Nachweise der ARG (Cephalosporin-Resistenzgene und Carbapenem-Resistenzgene) unter 28 Oberflächenwasserproben.

Insgesamt zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die aquatische Umwelt ein Reservoir für ARG und ARG darstellt. Eine standardisierte Anwendung der kulturbasierten Ansätze für die Überwachung aller Arten von Umweltproben wäre für eine zukünftige Risikobewertung lohnenswert, um die aktuelle Situation zu erfassen. Neben der vom Menschen verursachten Kontamination unserer Umwelt mit organischen Schadstoffen oder schwellenwertüberschreitenden Nährstoffkonzentrationen sind Antibiotikaresistenzen in der Umwelt eine große Herausforderung. Die Zirkulation von ARB, die durch klinische, landwirtschaftliche oder ländliche Abwässer verbreitet werden, die Übertragung von ARG auf Umweltbakterien, ihre weitere Verbreitung und irgendwann die Rückübertragung von ARG auf andere pathogene Stämme ist unendlich und muss kritisch beobachtet werden. Natürlich müssen politische Maßnahmen ergriffen werden, die zu einem geringeren Einsatz von Antibiotika und damit zu einer geringeren Entwicklung von ARB führen. Bis solche Maßnahmen in die Realität umgesetzt werden, wäre eine intensivere Überwachung, die zu einer stärkeren Sensibilisierung der Öffentlichkeit führt, ein wichtiger Schritt, um die Herausforderung der Antibiotikaresistenzen zu bewältigen.

#### 4.2.2.3 Identifikation der antibiotikaresistenten Umwelt-Isolate

Die Anwendung von MALDI-TOF-MS ermöglichte eine schnelle Identifizierung vieler Isolate, die auf den R2A-basierten Medien mit und ohne  $\beta$ -Laktam-Zusatz wuchsen. In Abbildung 4-17 sind die analysierten Isolate dargestellt, gruppiert in "oligotroph (grün)", "pathogen/Fäkalindikatoren (rot)" und "nicht bestimmbar (n.b., grau)". Im Vergleich zu anderen Publikationen konnten auf dem R2A-Agar auch heterotrophe Bakterien mit klinischer Relevanz und daher als potentiell pathogen/Fäkalindikatoren kategorisiert (nach WHO-Klassifikation). Auf dem antibiotikafreien R2A-Agar wurden nur wenige Vertreter von potentiell pathogenen/Fäkalindikator Stämmen identifiziert (0,3 bis 2,6 % von 314 Gesamtisolaten). 64 % wurden auf Gattungsebene als nicht klinisch relevant eingeordnet (O). Von diesen oligotrophen Bakterien gehörten insgesamt 24 % zur Gattung *Pseudomonas* und 26 % zu den Gattungen *Aeromonas*, *Flavobacterium* und *Janthinobacterium*. Alle anderen Stämme wurden mit einer Häufigkeit von < 5 % identifiziert. Die MALDI-TOF-MS-Identifizierung von 364 Isolaten, die auf BL1 gewachsen waren, und 356 Isolaten, die auf BL2 gewachsen waren, ergab keinen potentiell "pathogenen" Stamm, was zeigt, dass mit den R2A-basierten Medien ein anderes Spektrum von Bakterien erfasst wird, als mit den chromogenen Vollmedien. Auch auf BL1 wurden *Pseudomonas*, *Flavobacterium* und *Janthinobacterium* mit 35 %, 17 % bzw. 10 % am häufigsten identifiziert. Interessanterweise ähneln die isolierten Konsortien denen, die aus polnischen Fischteichsedimenten mit Streptomycin-, Tetracyclin- oder Erythromycin-versetzten R2A-Medien isoliert wurden (Piotrowska *et al.* 2017), nämlich *Bacillus*,

*Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* und *Stenotrophomonas*, sowie einzelne Fälle von *Paenibacillus* und *Sphingobacterium*. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Bakterien Träger von ARG sein können und in der Umwelt häufig vorkommen. Dies stützt die Hypothese, dass diese Bakterienstämme wichtige Reservoirs für verschiedene Arten von Antibiotikaresistenzen sind. Auch die Expression von Metallo- $\beta$ -Laktamasen wurde bereits für Bodenisolat aus Italien der Gattungen *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Janthinobacterium* und *Stenotrophomonas* berichtet (Rossolini *et al.* 2001). Ein anderer *Stenotrophomonas*-Stamm erwies sich als hochgradig resistent gegen Meropenem (Li *et al.* 2019a), wobei die Resistenz nachweislich auf der chromosomalen DNA lokalisiert war, da keine Plasmide nachgewiesen werden konnten. Auch Narciso-da-Rocha und Manaia (2016) konnten bestätigen, dass die genannten Stämme (neben anderen) in der Umwelt weit verbreitet sind und gleichzeitig gegen mehrere Antibiotikaklassen, einschließlich  $\beta$ -Laktame, multiresistent sind. Es wurde auch berichtet, dass Resistenzgene in pathogenen Stämmen wie *K. pneumoniae*, *E. coli* oder *Enterobacter sp.* durch oligotrophe und nicht-pathogene Stämme wie *Sphingobacterium* oder *Shewanella* übertragen wurden (zusammengefasst für OXA-48 und ein Tetracyclin-Gen in einer Literaturstudie von Andersson und Hughes 2017).

Die MALDI-TOF-MS-Methode ist für die Identifizierung von Bakterienisolaten auf dem Vormarsch (Singhal *et al.* 2015). Verglichen mit der Effizienz der Identifizierung mittels DNA-Sequenzierungsmethoden, ist die Zeit von Wachstum der Isolate bis zur Identifikation enorm verkürzt. Allerdings fehlen in der für den klinischen Bereich etablierten Proteinspektren-Datenbank noch viele Einträge, um auch im Umweltbereich sichere MALDI-TOF Identifizierungen durchführen zu können. Aus diesem Grund steigt die Anzahl der nicht identifizierbaren Stämme (n.d.) bei den von den R2A-basierten Medien isolierten Kolonien mit 34 % für das BL1- bzw. 51 % für das BL2-Medium deutlich an.

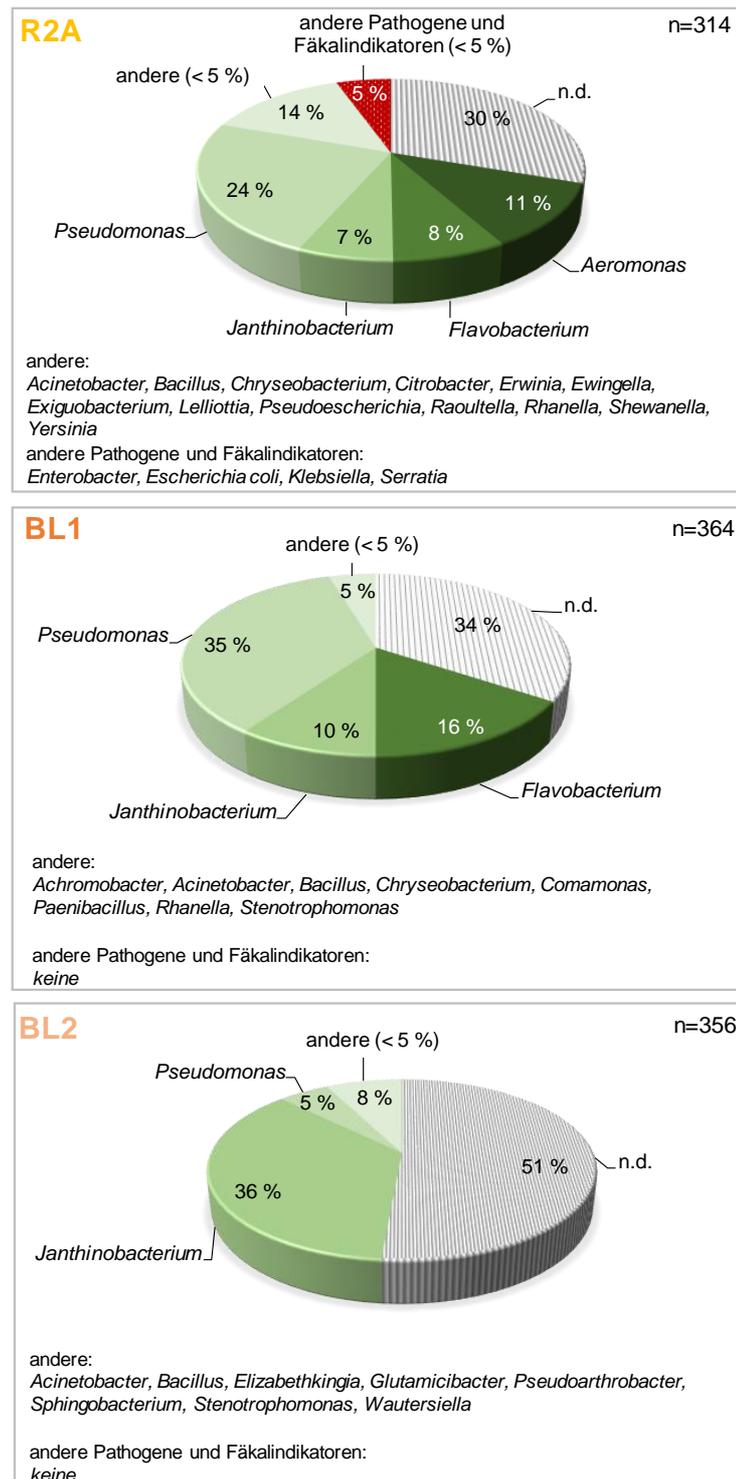


Abbildung 4-17 Mit MALDI-TOF-MS identifizierte Bakterienisolate prozentual aus n=314, 364 und 356 untersuchten Isolaten und die daraus resultierende Einstufung in "potentiell Pathogene/ Fäkalindikatoren" (Rot-Töne, nach Weltgesundheitsorganisation (2017) und RKI 2021), "oligotroph" (Grün-Töne) und "nicht bestimmbar" (n.d., grau, ohne Ergebnis aus MALDI-TOF-MS) auf R2A-Medien mit und ohne Antibiotikazusatz. .

In anderen Studien wird das ChromESBL-Medium zur Analyse von pathogenen und fäkalen Indikatorstämmen verwendet, und damit resistente Bakterien wie *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Shigella spp.* und *Serratia spp.* (Gekenidis et al. 2018; Réglie-Poupet et al. 2008; Schreiber et al. 2021) erfasst. Wie aus Abbildung 4-18 hervorgeht, wuchsen neben pathogenen Bakterien auch nicht-pathogene (NP) und nicht bestimmbare Stämme auf dem Medium. Die

Beziehungen zwischen den drei Gruppen unter den insgesamt 269 Isolaten, die für die MALDI-TOF-MS-Identifizierung von ChromESBL-Medien verwendet wurden, unterscheiden sich deutlich von denen, die auf den R2A-basierten Medien gefunden wurden. 45 % der Gesamtisolate gehörten nicht zu der klinisch relevanten Gruppe, wobei 13 % durch MALDI-TOF-MS nicht bestimmbar waren. Bei den identifizierten nicht-pathogenen Stämmen handelt es sich um ähnliche Gattungen wie *Acinetobacter* oder *Pseudomonas*, aber um verschiedene Arten, die von der WHO nicht als pathogen oder klinisch relevant eingestuft werden.

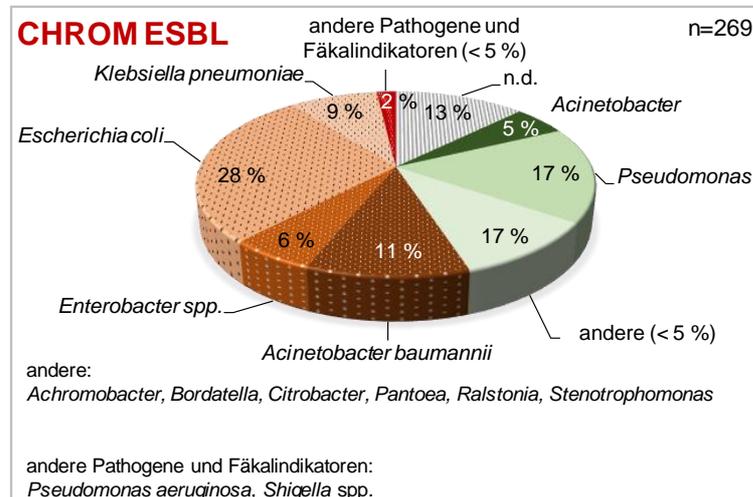


Abbildung 4-18 Mit MALDI-TOF-MS identifizierte Bakterienisolate prozentual aus n=269 untersuchten Isolaten und die daraus resultierende Einstufung in "potentiell Pathogene/ Fäkalindikatoren" (Rot-Töne, gemäß Weltgesundheitsorganisation (2017)), "nicht pathogen" (Grün-Töne) und "nicht bestimmbar" (n.d., ohne Ergebnis aus MALDI-TOF-MS) auf ChromESBL-Medium.

Die in Abbildung 4-17 und Abbildung 4-18 gezeigte Kategorisierung schließt nicht aus, dass auch die "oligotrophen" oder "nicht-pathogenen" Stämme pathogene Eigenschaften haben oder entwickeln oder im klinischen Umfeld relevant werden können. Schreiber *et al.* (2021) zeigten, dass die ChromESBL-Kultivierungsmethode wichtig ist, um potenziell pathogene ARB nicht nur aus klinischen, sondern auch aus Umweltproben zu analysieren. Obwohl die in klinischen *E. coli*-Isolaten nachgewiesene Cephalosporin-/ESBL-Resistenz nicht zugenommen hat (von 2010 bis 2013, GERMAP 2015), wurden in den hier untersuchten Oberflächengewässern mit 28 % aller ChromESBL-Isolate überwiegend ESBL-*E. coli* nachgewiesen. Auch *A. baumannii* ist eine Bakterienart, die häufig isoliert werden konnte und von der bekannt ist, dass sie im Bereich der Intensivmedizin eine erhöhte Carbapenem-Resistenz entwickelt hat.

Vertreter der Gattung *Bordetella*, die hier als nicht-pathogen, aber dennoch heterotroph und offensichtlich ESBL-produzierend eingestuft werden, wurden ebenfalls auf ChromESBL aus den untersuchten deutschen Oberflächengewässern isoliert (Abbildung 4-18). Andere *Bordetella*-Stämme wurden von Schweinen, Hunden und Katzen isoliert, die sehr hohe MHK-Werte für mehrere  $\beta$ -Laktame aufwiesen (GERMAP 2015). Die Ergebnisse dieser Studie, zusammen mit der Literatur, die zunehmende  $\beta$ -Laktam-Resistenzen und Anwendungen in Kliniken und der Veterinärmedizin beschreibt, unterstreichen die Notwendigkeit, sowohl pathogene Stämme/Fäkalindikatoren als auch oligotrophe Stämme und ihre Resistenzmuster in der aquatischen Umwelt zu erfassen. Insgesamt belegen die Daten, dass die R2A-basierten Methoden zusätzliche Datenbasis liefern, die zukünftig eine verbesserte Risikobewertung hinsichtlich Antibiotikaresistenzen in der Umwelt ermöglichen können.

#### 4.2.2.4 Nachweis von enzymatisch vermittelten $\beta$ -Laktam-Resistenzen durch den Micronaut S-Test

Das Wachstum von Bakterien auf den Antibiotika-haltigem Medien (BL1 und BL2) legt den Schluss nahe, dass diese Bakterien spezifische Resistenzgene exprimieren, die ihnen die Fähigkeit verleihen, in Gegenwart der antibiotischen Substanzen zu wachsen. Diese Resistenz kann aber durch verschiedene Mechanismen verursacht werden. Einige Antibiotika wirken aufgrund der Zellstruktur der Bakterien nicht. Beispielsweise könnte die Zellwand in der Lage sein, einige Bakterien vor antibiotischen Wirkstoffen zu schützen, da die Lipidproduktion zur Stabilisierung der Zellwand in Gegenwart von  $\beta$ -Laktamen hochreguliert werden kann (Do *et al.* 2020).

Es wurde daher geprüft, ob die auf den Cephalosporin- und Carbapenem-enthaltenden Nährmedien gewachsenen Kolonien tatsächlich  $\beta$ -Laktamasen bilden und die Resistenzen somit spezifisch und enzymbasiert sind und nicht zellstrukturbasiert. Hierzu wurde ein spezieller Test zum Nachweis von  $\beta$ -Laktamasen in klinischen Isolaten (Micronaut-S-Assay, Merlin Diagnostika GmbH) angepasst und genutzt. Ausgewählte Bakterien, die von den Antibiotika-haltigen R2A-Medien isoliert wurden, wurden auf die Expression von genetisch kodierten  $\beta$ -Laktamase-Gruppen – darunter ESBL, Amp-C, KPC, MBL, D-Carbapenemasen (einschließlich OXA-48-ähnlicher Enzyme) – getestet.

Es hat sich bereits gezeigt, dass die Validierung der Antibiotika-Empfindlichkeit von Umweltisolaten effizienter und zuverlässiger ist, wenn zusätzliche kulturbasierte bzw. MPN-Ansätze (Most Probable Number) angewendet werden, anstatt die Isolate auf ihre jeweiligen Resistenzgene zu testen. So führten Piotrowska *et al.* (2017) zusätzliche ARG-PCRs mit einer hohen Anzahl verschiedener ARG-Varianten (23 Tetrazyklin-Resistenzgene, 15 Erythromycin-Resistenzgene, 7 Streptomycin-Resistenzgene) mit der DNA des untersuchten Isolats als Template durch. Sie konnten nur eine geringe Anzahl von Resistenzgenen nachweisen, obwohl die Resistenzen durch kulturbasierte Verfahren nachgewiesen wurden. Der Vorteil der Micronaut-S-Methode ist die parallele Testung von Antibiotika und spezifischen Laktamase-Inhibitoren. So kann bei Wachstum in Anwesenheit eines Antibiotikums, aber Wachstumshemmung in Anwesenheit von Antibiotikum und Inhibitor, die genetisch kodierte Resistenz sichergestellt werden. In neueren Studien wurde die Methode erfolgreich auf Isolate wie *Escherichia*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* oder *Klebsiella* angewandt, die aus Fischteichen, Milchviehbetrieben oder Hähnchenmastbetrieben isoliert wurden (Benlikurt und Özpınar 2016; Odenthal *et al.* 2016; Reich *et al.* 2013). Es konnten keine Veröffentlichungen gefunden werden, die die Anwendung dieser Methode auf aquatische Umweltisolate demonstriert. Da alle Wachstumskontrollen (ohne Antibiotika-Zusätze) für alle getesteten Isolate positiv waren, konnte die Anwendbarkeit der Methode im Bereich aquatischer, nährstoffarmer Umgebungen, insbesondere für oligotrophe Bakterien, bestätigt werden.

Unter den getesteten Isolaten (insgesamt 46 Isolate ausgewählt anhand unterschiedlicher Kolonietypen) waren die Gattungen *Duganella*, *Elizabethkingia*, *Herbaspirillum*, *Janthinobacterium*, *Massilia*, *Pedobacter*, *Pseudomonas* und *Wautersiella* vertreten. Von einer Platte wurden zudem alle 13 gewachsenen Isolate im Micronaut-S Test untersucht. Diese Isolate exprimierten nachweislich alle  $\beta$ -Laktamasen. Abbildung 4-19 zeigt die Mengen der positiven  $\beta$ -Laktamase-Typen, die bei den 46 Isolaten nachgewiesen wurden. Dabei zeigten viele Isolate die Expression mehrerer  $\beta$ -Laktamase-Typen und keiner der getesteten Bakterienstämme war vollständig negativ für die  $\beta$ -Laktamase-Expression. Unter allen nachgewiesenen Kombinationen wurden ESBL und OXA-48-ähnliche D-Carbapenemasen bei 25 Isolaten am häufigsten zusammen nachgewiesen. Zum Vergleich wurden auch Isolate von Gattungen, die nur auf AB-freiem R2A-Medium nachgewiesen wurden (*Erwinia*, *Lelliottia*, *Pantoea*, *Shewanella* und *Yersinia*), mit dem Micronaut-S-Test getestet (n=6). Zwei von ihnen waren vollständig negativ für alle getesteten  $\beta$ -Laktamasen. Dass die anderen vier Isolate aus dieser Stichprobe dennoch Resistenzen aufwiesen, bestätigt den Befund, dass bereits ein Großteil der auf R2A isolierbaren oligotrophen Bakterien resistent gegen  $\beta$ -Laktame ist.

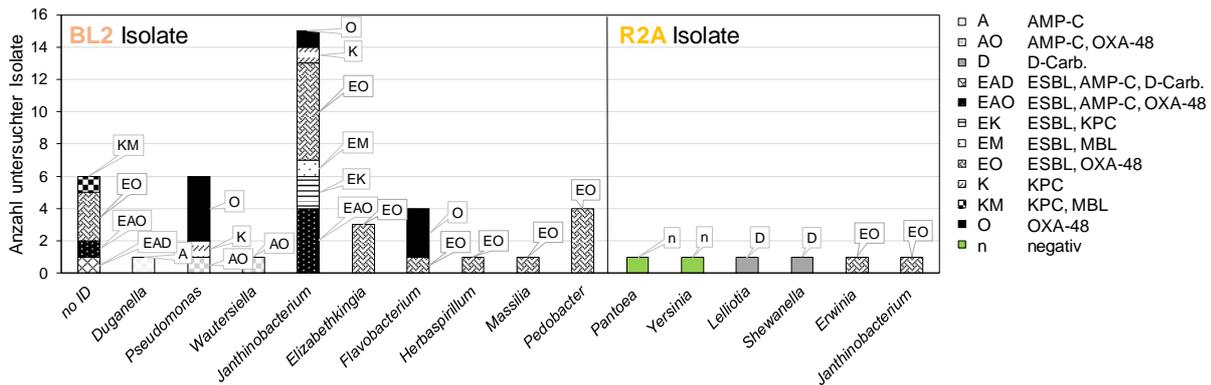


Abbildung 4-19 Positive  $\beta$ -Laktamase-Expression im Micronaut-S-Test, ( $n=46$  ausgewählten Isolaten von BL2- und R2A-Platten der Oberflächenwasserproben OW1-28, Tabelle 3-1).

Ob die Resistenzen, die durch den Micronaut-S Test nachgewiesen werden, natürlich oder erworben sind, lässt sich durch diese Methode nicht unterscheiden. In der Literatur konnten für die meisten auf den BL1 und BL2-Medien isolierten Gattungen Nachweise für entsprechende  $\beta$ -Laktam Resistenzen gefunden werden. Im Genom von *Elizabethkingia anopheles* wurde eine Vielfalt intrinsischer Resistenzen gegen verschiedene Antibiotikaklassen beschrieben (Kämpfer *et al.* 2011). Darunter wurden durch Genom-Analysen auch einige  $\beta$ -Laktamasen wie Metallo- $\beta$ -Laktamasen (MBLs) und Penicillin-Bindeproteine (PBPs) detektiert (Kukutla *et al.* 2014). Diese PBPs werden mit der Induktion von AmpC- $\beta$ -Laktamasen assoziiert (Sanders *et al.* 1997). Phylogenetische Analysen ausgewählter  $\beta$ -Laktamasen deuten darauf hin, dass bestimmte  $\beta$ -Laktamase-Gene nicht nur vertikal vererbt, sondern auch durch lateralen Gentransfer erworben wurden (Kukutla *et al.* 2014).  $\beta$ -Laktamasen der Klassen C (beinhaltet ESBL, AmpC) und D (beinhaltet z.B. OXA-48) wurden in einer Studie von Silveira *et al.* (2018) ebenso wie in den hier gezeigten Untersuchungen in Umweltilolaten wie *Duganella sp.*, *Janthinobacterium lividum* und *Massilia sp.* identifiziert. Funktionelle MBLs (Klasse B) wurden bereits in *Janthinobacterium lividum* und *Massilia oculi* beschrieben (Docquier *et al.* 2004; Gudeta *et al.* 2016). Diese Gene sind phylogenetisch verwandt mit erworbenen  $\beta$ -Laktamasen, die von klinischen Krankheitserregern produziert werden. Diese könnten laut Gudeta *et al.* (2016) von Mitgliedern der *Oxalobacteraceae* erworben worden sein. Oliveira *et al.* (2021) konnten durch Analysen von Genomen von insgesamt 76 *Herbaspirillum*-Isolaten (aus klinischem Bereich und der Umwelt) zeigen, dass auch in dieser Gattung  $\beta$ -Laktamasen vom Typ A, B, C und D verbreitet sind, wobei die Gene für die Enzyme der Klassen C und D nur in solchen Isolaten zu finden waren, die keine Codierung für  $\beta$ -Laktamasen der Klassen A und B auswiesen. Isolate der Gattung *Pedobacter*, die hier positiv auf ESBL und OXA-48 getestet wurden, wurden bereits in einer anderen Studie, in der Genomanalysen von *Pedobacter* Isolaten aus einer Trinkwasseraufbereitung durchgeführt wurden, als multiresistent beschrieben, wobei ebenso Resistenzen gegen Carbapeneme und Cephalosporine gezeigt werden konnten. Aufgrund des Selektionsdrucks in der Trinkwasseraufbereitung wurde hier vermutet, dass es sich um erworbene Multiresistenzen handeln könnte (Ullmann *et al.* 2020). Bereits 2011 wurde eine hohe Rate an  $\beta$ -Laktam-Resistenzen unter Umwelt-relevanten *Pseudomonas sp.* Isolaten identifiziert (> 82 % von 125 Isolaten), darunter gegen Cephalosporine der 3. Generation (Chikwendu 2011). Da in dieser Studie 50 % der untersuchten Isolate 2 bis 3 Plasmide enthielten und der Erhalt von Resistenzen meist einen Fitnessvorteil gegenüber sensibler Organismen mit sich bringt, gehen die Autoren davon aus, dass *Pseudomonas sp.* eine wichtige Rolle in der Verbreitung von Plasmiden und damit auch Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt spielt. Auch eine Resistenz gegen  $\beta$ -Laktam/ $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren wurde in dieser Studie festgestellt (Chikwendu 2011), was zum Teil ebenso in den hier durchgeführten Micronaut-S Tests beobachtet werden konnte. Diese Resistenzen gegen AB/Inhibitor-Kombinationen wurden bereits in *E. coli* und *Klebsiella oxytoca* Isolaten festgestellt und dort auf eine übermäßige Produktion von Klasse-A-Laktamasen (wie TEM-1

oder SHV-1, Chaïbi *et al.* 1999; Oliver *et al.* 1999; Sirot *et al.* 1998), und/oder auf eine veränderte Durchlässigkeit der äußeren Membran zurückgeführt (Reguera *et al.* 1991).

#### 4.2.2.5 Fazit der Methodenetablierung

Zusammenfassend kann das etablierte Protokoll auf Basis von R2A-Medium empfohlen werden, um Oberflächenwässer umfangreich auf Antibiotikaresistenzen zu untersuchen. Die angepassten Kulturverfahren ermöglichen die Isolation einer deutlich erhöhten Zahl von resistenten oligotrophen Bakterien und es konnte für bis zu 28 Flusswasser-Proben gezeigt werden, dass sowohl Cephalosporin-, als auch Carbapenem-Resistenzen bereits unter Umweltbakterien verbreitet sind. Die Isolation der Umweltbakterien auf den R2A-basierten Medien eignet sich außerdem gut für nachfolgende Untersuchungen der Bakteriengattungen mittels MALDI-TOF-MS. Dabei ist zu betonen, dass zusätzlich zu den etablierten Kulturverfahren ein paralleles qPCR-basiertes ARG-Monitoring der betrachteten Wasserproben von Vorteil ist, um weitere Resistenzen zu erfassen, die gegebenenfalls in nicht-kultivierbaren Bakterien, Bakteriophagen oder freier DNA vorliegen.

Der Micronaut-S Assay eignet sich (mit Modifikationen) für die Bestätigung von enzymatisch vermittelten  $\beta$ -Laktam-Resistenzen in Umweltisolaten. Isolate können auch für spätere Analysen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden.

### 4.2.3 Long-Amplikon qPCR

Das Ziel der Long-Amplikon (LA) qPCR ist es, anstelle kurzer Genfragmente, vollständige Gene nachzuweisen. Die kurzen Fragmente werden in der konventionellen PCR nachgewiesen, um eine stabile Polymerase-Funktion zu gewährleisten. Treten außerhalb des zu amplifizierenden Fragments Schädigungen am DNA-Strang auf, die das Gen inaktivieren, wird das PCR-Ergebnis unter Umständen trotzdem positiv ausfallen. Nur wenn Primer eingesetzt werden, die das gesamte Gen flankieren, kommt es bei Schäden zum Amplifikations-Stop. Besonders relevant ist die Vermeidung von Überbefunden von ARG bei der Ab- oder Trinkwasserbehandlung mit reaktiven Verfahren. Durch falsch-positive Ergebnisse kann die Eliminationsleistung der Verfahren unterschätzt werden.

#### 4.2.3.1 Primer-Design

Zunächst wurden entsprechende Primer designt, die die ARG jeweils am Anfang und Ende flankieren. Die designten Primerpaare sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst und die zur Erfüllung der Kriterien ausgetauschten Basen rot markiert. Die LA-Primer der Gene *blaTEM* und *tetA* wurden hierbei zur Kontrolle der Methodik auf dieselbe Art designt, obwohl sie bereits auf ähnliche Weise von Chang *et al.* (2017) etabliert wurden. So kann die Labor-unabhängige Reproduzierbarkeit der Methodenetablierung sichergestellt werden. Auch die *sul1* Primer wurden vergleichbar mit den hier designten bereits von Faldynova *et al.* (2003) hergestellt und angewendet, jedoch nicht für den Vergleich von kurzen und langen Amplifikaten in der qPCR. Außerdem wurde, um die korrekte Gensequenz sicherzustellen, die zum Zeitpunkt des Primerdesigns aktuellste verfügbare Gensequenz aus der CARD-Datenbank (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, <https://card.mcmaster.ca/>) bezogen und die Primer-Längen zum Teil angepasst.

Tabelle 4-2 Von Gensequenzen und –längen mit den laut Anhang 8.5.1 abgeleiteten Primerpaaren zur Etablierung von Long-Amplikon qPCR Methoden.

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Genlängen [bp]
<i>intl1</i>	ATGAATACCGCCACTGCG	CTACCTCTCACTAGTGAGGAGC	1014
<i>blaTEM</i>	ATGAGTATTCAACATATTCG	TTACCAATGCTTAATCAG	861
<i>sul1</i>	ATGGTGACGGTGTTCAGCAT	CTAGGCATGATCTAACCCCTCG	840
<i>tetA</i>	ATGAATAGTTCGACAAAGATCGC	TAAGCACTTGCTCCTGTTGAC	1206
<i>blaNDM-1</i>	TTGCCAGTATTATGCACGC	TCAGCGCAGCTTGTCGGC	813
<i>blaCTX-M-32</i>	ATGGTTAAAGAATCACTGC	TTACAAACCGTTGGTGAC	876
<i>blaOXA-48</i>	ATGCGTGTATTAGCCTTATCGGC	GGAATAATTGTTTCCTGTTGAGCAC	798
<i>blaVIM-2</i>	ATGTTCAAACCTTTGAGTAAGTT	CTACTCAACGACTGAGCGACTTG	801
<i>blaCMY-2</i>	ATGATGAAAATCGTTATGCTGCG	TTATTGCAGCTTCTCAAGAATG	1146
<i>mecA</i>	ATGAACAAGATAAGAATTGTTCC	TCTATATCGTATTTGTTATTACCG	2007

Nach erfolgreichem in-silico-Test wurden die Primer bei Thermo Fisher bestellt und auf Umweltproben oder Isolate für einen ersten in-vitro Test angewendet.

#### 4.2.3.2 Methodenetablierung für ausgewählte ARG

Mit den zehn Primerpaaren wurden Test-PCRs mit aquatischen Proben durchgeführt. Hierbei handelte es sich um DNA-Extrakte aus Oberflächengewässern und Kläranlagenzu- und -abläufen. In den verwendeten Umweltproben wurden die entsprechenden Gene mit den konventionell angewandten PCR Methoden (mit kurzen Amplifikaten) zum Teil bereits detektiert. In Abbildung 4-20 sind die Banden gezeigt, die bei den Test-PCRs generiert werden konnten. Dabei wurden die in-silico kalkulierten Annealing-Temperaturen verwendet. Für *mecA* und *blaVIM-2* konnten mit den eingesetzten Umweltproben keine langen Amplifikate generiert werden. Die genaue Ursache dafür ist unbekannt. Es ist möglich, dass die Gensequenzen, aufgrund von natürlich auftretenden Mutationen in der Gensequenz, leicht von den Sequenzen aus der Datenbank abweichen und ein Annealing somit nicht möglich war.

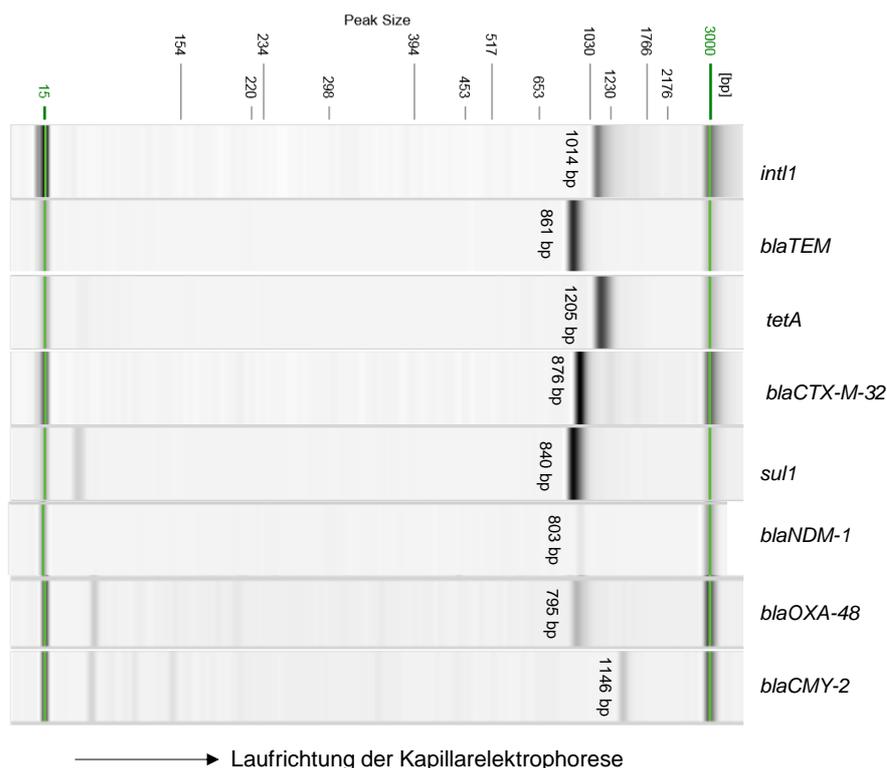


Abbildung 4-20 Kapillarelektrophorese der Test-PCRs mit den neu entwickelten Primerpaaren zur Long-Amplikon qPCR Methodenentwicklung.

Mit fünf Primerpaaren (ein Integron-Gen und vier ARG) konnte anschließend eine vollständige Etablierung der jeweiligen qPCR Methode durchgeführt werden. Für weitere Resistenzgene (*blaCTX-M-32*, *blaCMY-2* und *blaOXA-48*) stehen durch die erfolgreiche Etablierung der Primer und Herstellung der Standardfragmente bereits Ansätze für die Entwicklung weiterer LA qPCRs zur Verfügung.

Für *int11*, *blaTEM*, *sul1*, *blaNDM-1* und *tetA* wurden mittels Gradienten-PCR optimale Annealing-Temperaturen ermittelt. Diese sind in Tabelle 4-3 aufgelistet.

Tabelle 4-3 Experimentell ermittelte qPCR-Bedingungen: Annealing-Temperatur ( $T_A$ ) und Elongationszeit ( $t_E$ ) für die Long-Amplikon qPCR.

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	$T_A$ [°C]	$t_E$ [s]
<i>int11</i>	ATGAATACCGCCACTGCG	CTACCTCTCACTAGTGAGGAGC	67	35
<i>blaTEM</i>	ATGAGTATTCAACATATTCG	TTACCAATGCTTAATCAG	58	40
<i>blaNDM-1</i>	TTGCCAGTATTATGCACGC	TCAGCGCAGCTTGTCGGC	63	30
<i>sul1</i>	ATGGTGACGGTGTTTCAGCAT	CTAGGCATGATCTAACCCCTCG	63	30
<i>tetA</i>	ATGAATAGTTCGACAAAGATCGC	TAAGCACTTGTCTCCTGTTGAC	65	50

Bei anschließend durchgeführten qPCR-Läufen mit den ermittelten Temperaturprogrammen konnten reproduzierbare Standard- sowie Schmelzkurven für die Standards ermittelt werden, welche in Abbildung 4-21 dargestellt sind. Die experimentell ermittelte Schmelztemperatur aller LA-Fragmente weicht jeweils nur leicht von der durch Gleichung (3-2) berechneten Temperatur ab. Da der DNA-Schmelzpunkt von der Ionen-Konzentration in der Lösung beeinflusst werden kann (Vologodskii und Frank-Kamenetskii 2018), sind diese geringen Abweichungen zu erwarten und bestätigen, zusätzlich zur Analyse der Genfragmentlänge mittels Elektrophorese, dass das korrekte Fragment amplifiziert wurde.

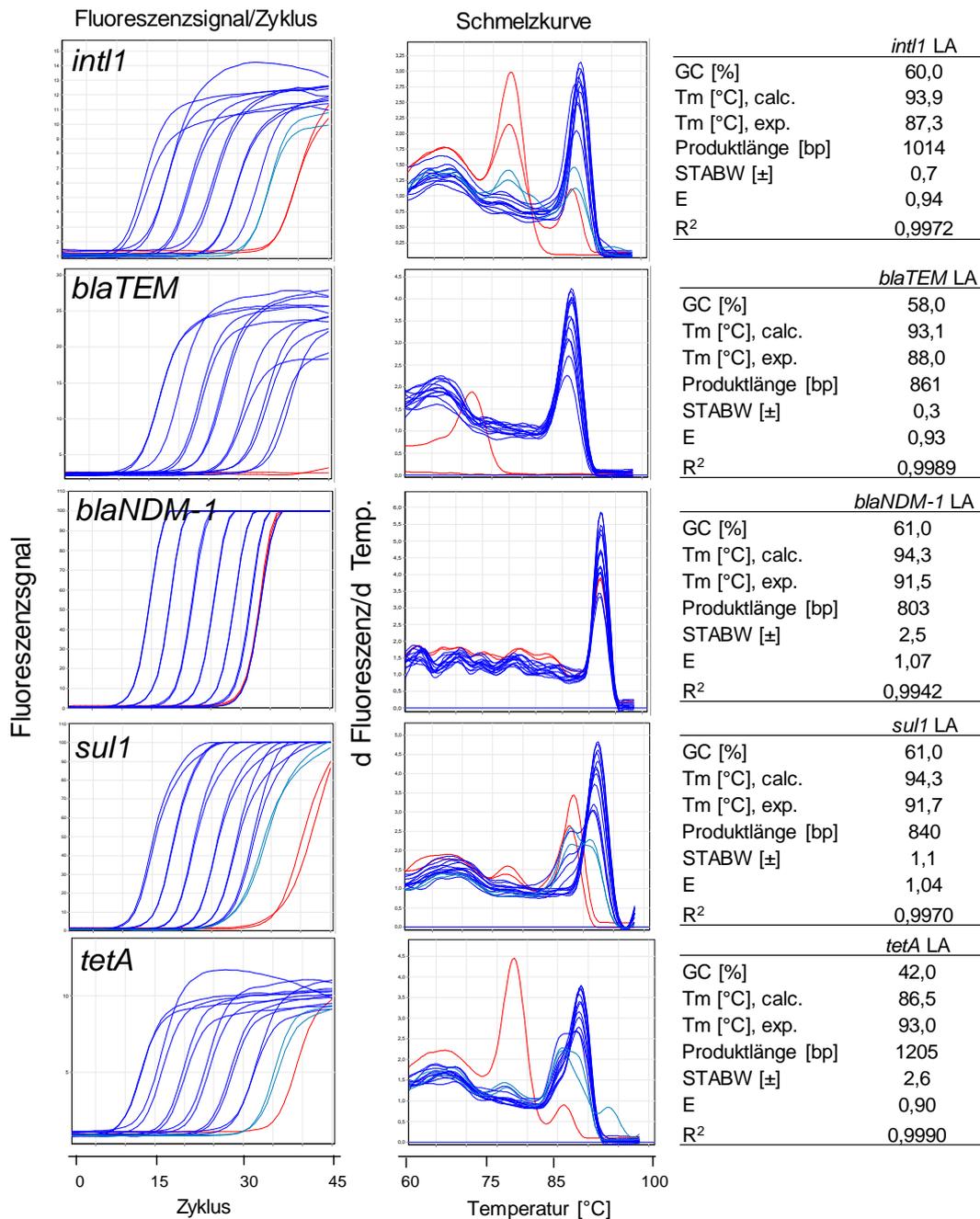


Abbildung 4-21 Standard- und Schmelzkurven der Standardfragmente (blau) mit experimentell ermittelten qPCR Bedingungen. Die NTC ist jeweils in rot dargestellt. LA= Long-Amplikon, E = Effizienz, R<sup>2</sup> = Bestimmtheitsmaß, T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur (berechnet, „calc.“ und experimentell bestimmt: Mittelwert aus allen Standardpeaks mit Standardabweichung, STABW).

Es stellte sich heraus, dass die Anwendung der Methoden auf Umwelt- und Wasserwerksproben für *sul1* und *blaTEM* möglich war, für *tetA* und *int11* jedoch Probleme während der Amplifikation auftraten. Eine Hemmung der Amplifikation konnte auf Störstoffe (Inhibitoren) in den Umweltproben zurückgeführt werden. Dies wurde belegt indem die Standards zu unterschiedlichen Umweltproben-DNA-Extrakten dosiert wurden. In Abbildung 4-22 sind sowohl die in diesem Versuch generierten Genkopien, als auch die entsprechend erhaltenen Banden aus der Kapillarelektrophorese gezeigt.

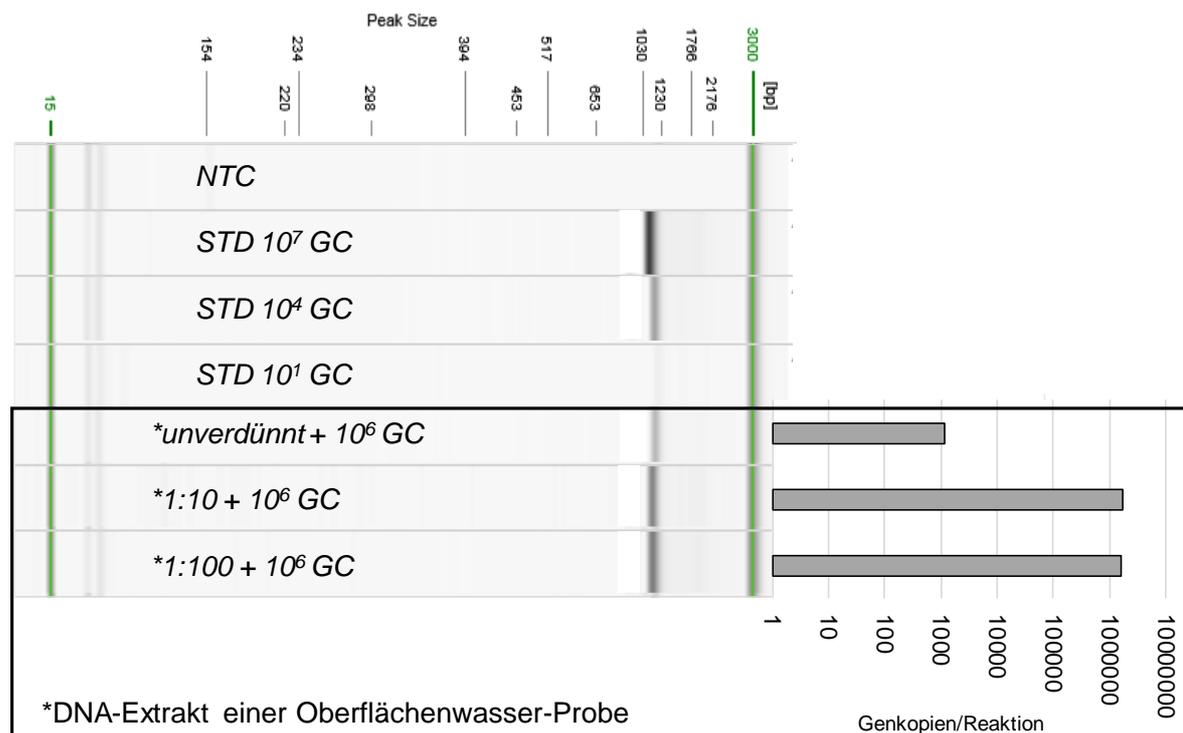


Abbildung 4-22 Kapillarelektrophorese und zugehörige Genkopien der qPCR mit den designten *intl1* LA Primerpaaren. Hierbei wurde der Standard  $10^7$  im Verhältnis 1:10 zum DNA-Extrakt einer Oberflächenwasser-Probe zudosiert (entspricht  $10^6$  Genkopien).

Ist das quantitative Verhältnis zwischen DNA-Zielfragmenten und Störstoffen, die die DNA-Polymerase hemmen, zu gering (also deutlich weniger Ziel-DNA als Inhibitor), kann es schnell zu dem in Abbildung 4-22 demonstrierten Effekt kommen. Es ist davon auszugehen, dass es sich um kompetitive Hemmung des Enzyms durch Huminsäuren handelt, die zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit nach Michaelis-Menten führt. Tebbe und Vahjen (1993) konnten den Inhibitionseffekt von während der DNA-Extraktion co-extrahierten Huminsäuren aus Umweltproben zeigen. Durch die 10-, bzw. 100-fache Verdünnung der Oberflächenwasser-Probe kann die zudosierte Konzentration der Standard *intl1*-Fragmente von  $10^6$  GC/Reaktion wieder nachgewiesen werden. Somit ist bewiesen, dass die Änderung des Verhältnisses zwischen Inhibitor- und Substratkonzentration die Amplifikation der Ziel-DNA wieder ermöglicht. Dies bestätigt, dass es sich um eine kompetitive Hemmung der Polymerase handelt. Eine Verdünnung der Probe ist für die konventionelle qPCR in der Regel ausreichend. Der Faktor der erhöhten Amplifikationszeit der Polymerase während der LA qPCR scheint jedoch dazu beizutragen, dass eine Verdünnung nicht zu der gewünschten Reduzierung von Inhibitionseffekten führt.

Für weitere Versuche wurden LA qPCR-Assays für *sul1* und *blaTEM* genutzt. Die Anwendung dieser beiden LA qPCRs führte auch in Umweltproben zu sicheren Ergebnissen. Da *sul1* und *blaTEM* ebenso Vertreter von häufig in der Umwelt nachweisbaren ARG sind, eigneten sich diese beiden Gene zusätzlich optimal für weitere Versuche.

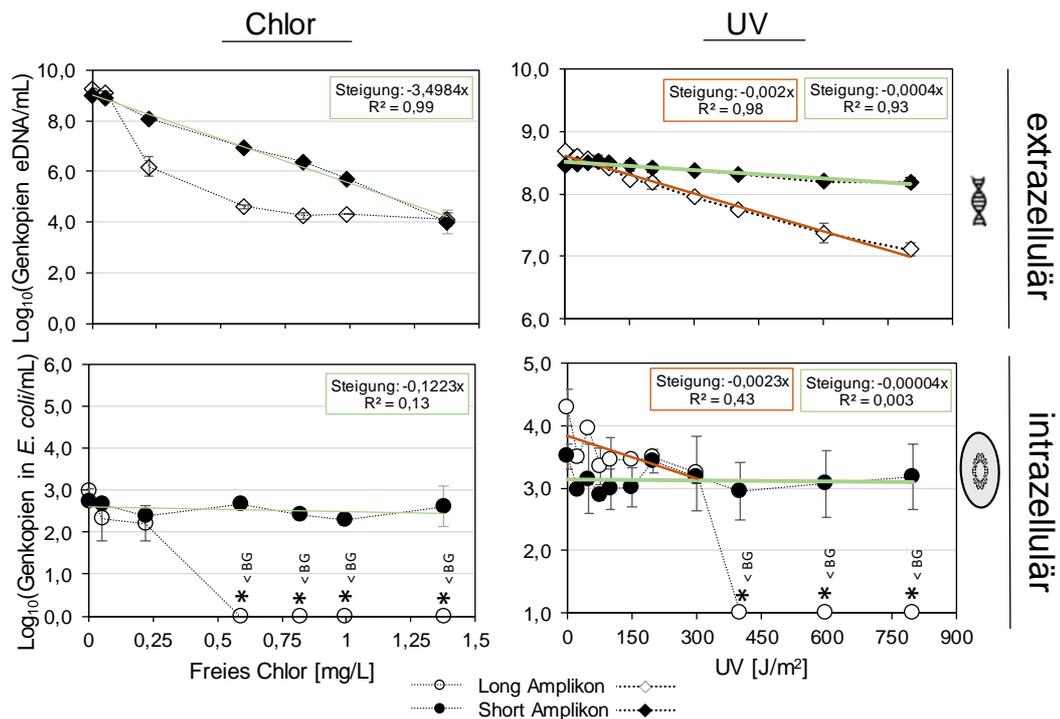
#### 4.2.3.3 Anwendung der Long-Amplikon qPCR für die Beurteilung der UV- und Chlorbehandlung sowie Ozonung

##### Laboruntersuchung zur UV- und Chlorbehandlung

Ziel der LA qPCR Methodik ist es, eine Überschätzung der ARG-Quantifizierung in einer aquatischen Probe zu minimieren und bestenfalls gänzlich zu vermeiden. Vor allem nach einem Abwasser- und/ oder Trinkwasser-Desinfektionsverfahren, wie der UV-Behandlung, der Chlorbehandlung oder der Ozonung, kann es zur Schädigung der DNA kommen, die aufgrund der kurzen, in der herkömmlich angewendeten PCR amplifizierten Fragmente dennoch als positive Probe bzw. intakte DNA gewertet würde. Nur wenn ein vollständiges Gen in der qPCR quantifiziert wird, kann man sichergehen, dass es sich auch um unbeschädigte und funktionale DNA handelt. Auch bei der immer häufiger im Bereich der Wasseraufbereitung angewendeten Methode der Ultra- oder Nanofiltration, kann die Länge des Amplifikats ausschlaggebend für eine belastbare Quantifizierung sein. Kurze, bruchstückhafte DNA-Fragmente könnten kleinporige Membranen vermehrt passieren und somit nach der Filtration noch nachgewiesen werden.

Um zu zeigen, ob die Reduktion der defekten Gene sowohl intra- als auch extrazellulär mit der LA qPCR besser abgebildet werden kann, wurden zunächst Versuche mit Modellproben durchgeführt. Hierbei wurden *blaTEM* tragende *E. coli* (861 bp, auf Plasmid lokalisiert) zusammen mit freien (extrazellulären) *sul1* Genfragmenten (gesamte Länge des ARG, 840 bp) in steriles Trinkwasser gegeben und jeweils mit unterschiedlichen UV-Dosen bzw. Chlorkonzentrationen behandelt. Diese beiden ARG wurden ausgewählt, da sowohl die SA Fragmente, also auch die LA Fragmente ähnlich lange Sequenzen aufweisen, wobei *blaTEM* SA 112 und *sul1* SA 163 bp, und *blaTEM* LA 861 und *sul1* LA 840 bp lang ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-23 dargestellt.

Der Vergleich der LA- und der SA-qPCR hinsichtlich der Reduktion von intra- und extrazellulären Antibiotikaresistenzgene zeigt, dass sich die Ergebnisse für die Chlor-Behandlung und UV-Bestrahlung deutlich unterscheiden. Die extrazelluläre DNA, die als doppelsträngiges, lineares 840 bp langes freies Fragment in der Arbeitslösung vorlag, konnte mit der höchsten eingesetzten Konzentration an freiem Chlor (1,38 mg/L) um rund 5 Log-Stufen, von 9,3 (LA) und 9,0 (SA) auf 4,2 (LA) und 4,1 (SA) log GC/mL reduziert werden. Jedoch unterscheidet sich der Verlauf der Abnahme der Genkopien mit steigender Chlor-Konzentration zwischen der SA und der LA qPCR Methode. Mit jeder Erhöhung um 1 mg/L sinkt die Genkopienzahl mit der SA Methode um je etwa 3,5 Log-Stufen (graphisch mittels linearer Trendlinie ermittelt,  $y = -3,5x + 9,03$ ,  $R^2 = 0,9919$ , Microsoft Excel). Mit der LA Methode hingegen lässt sich bereits ab einer Konzentration von 0,2 mg/L freiem Chlor eine deutlichere Abnahme um 2,8 Log-Stufen messen und ab einer Chlorkonzentration von 0,6 mg/L stagniert die Kurve bei Werten zwischen 4,6 und 4,2 log GC/mL. Dass für die eDNA keine vollständige Elimination erreicht wird bzw. dass der Nachweis von rund 4 Log-Stufen sowohl des langen, als auch des kurzen Amplifikats auch nach Inkubation mit der höchsten Chlorkonzentration noch möglich ist, kann mit der geringen Größe der freien Genfragmente zusammenhängen. Zhang *et al.* (2019a) konnten zeigen, dass bereits Plasmide und darauf lokalisierte ARG deutlich weniger von Chlor beschädigt werden als genomische DNA, wobei sogar höhere Chlorkonzentrationen getestet wurden. Die Wahrscheinlichkeit, dass Hypochlorit-Moleküle auf die kleinen eDNA Fragmente treffen ist deutlich geringer, als die Reaktion mit auch in der Arbeitslösung vorliegenden *E. coli*-Bakterien. Trotzdem kommen Zhang *et al.* (2019a) zu dem Ergebnis, dass die Chlorung zur Degradierung von extrazellulärer DNA und die Erfassung mittels konventioneller qPCR Methoden eher zu einer Überschätzung der Genkopien führt. Die gezeigten Untersuchungen stützen diese Aussage.



*E. coli* im Kulturverfahren

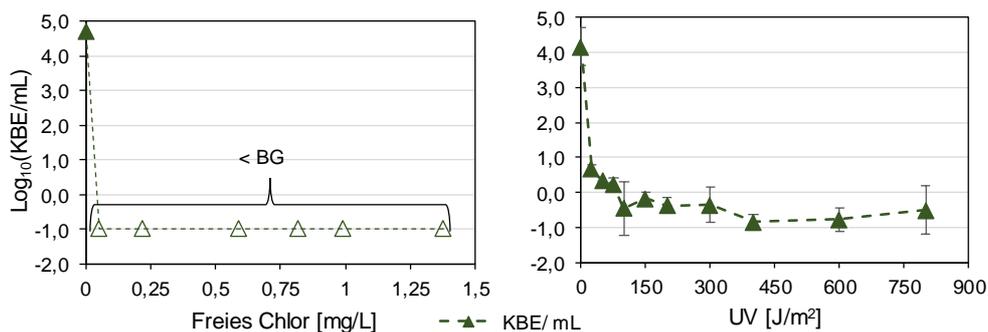


Abbildung 4-23 Konzentrationen der Long und Short Amplikon Genfragmente in *E. coli* und extrazellulär nach Chlor- und UV-Behandlung als Mittelwerte zwei paralleler Ansätze mit Standardabweichung. Die BG liegt bei 10 Genkopien pro mL. Unten: Logarithmische Koloniezahl (KBE/mL) von *E. coli* im Kulturverfahren. Die BG liegt bei 0,1 KBE pro mL. Dargestellt sind die gemessenen initialen Konzentrationen von freiem Chlor bzw. die angewendete UV-Bestrahlungsstärke.

Die Analyse der intrazellulären DNA zeigte, dass mit der LA-qPCR-Methode ab einer Konzentration von 0,6 mg/L freiem Chlor kein Nachweis von *bla*TEM mehr möglich war, während anhand der SA-qPCR keine deutliche Abnahme des ARG ermittelt werden konnte – auch nicht bei hohen Chlorkonzentrationen. Die reaktiven Hypochlorit-Ionen wirken zunächst schädigend auf die bakterielle Zellwand, können nach dem Eindringen in die Zelle dann aber auch die Nukleinsäuren und Proteine angreifen (Gheraout 2017). Dabei können Strangbrüche entstehen, die die unterschiedlichen Ergebnisse für SA und LA qPCR Methoden erklären.

Mit der SA qPCR ließ sich nur eine sehr geringe Abnahme der GC iDNA/mL von 0,1 Log-Stufen mit Zunahme der Chlorkonzentration bis 1,38 mg/L (laut linearer Trendlinie mit Steigung von -0,1223, Microsoft Excel) feststellen. Dies zeigt, dass das Vorkommen von vor allem in Bakterien vorliegenden ARG im gechlorten Trinkwasser, welches je nach Gesundheitsrisiken zwischen 0,2 und 1 mg/L freies Chlor enthalten kann (Branz *et al.* 2017), durch eine Analyse mit konventioneller qPCR potentiell überschätzt werden kann. Auch bei einem niedrigeren Grenzwert von 0,3 mg/L finaler Chlorkonzentration im Trinkwasser und

maximal bei Chlorung zulässiger Dosierung von 1,2 mg/L Chlor in Deutschland (DVGW W 290), sind anhand der gezeigten Experimente vor allem bei freien ARG-Fragmenten bereits Überschätzungen zu erwarten. Ghernaout (2017) beschreibt eine Inaktivierung von *E. coli* ab bereits 0,1 mg/L freiem Chlor mit einer Inkubationszeit von nur 0,4 s. Diese Ergebnisse stützen die im Kulturverfahren ermittelten Werte, die bereits ab der geringsten untersuchten Chlorkonzentration von 0,05 mg/L (allerdings einer Kontaktzeit von 30 min) eine vollständige Inaktivierung der Mikroorganismen belegen.

Es ist bekannt, dass sich eine Bestrahlung mit UV-Licht nicht direkt schädigend auf bakterielle Zellwände oder Proteine auswirkt, sondern durch die Induktion von kovalenten Bindung, z.B. zwischen Nukleotiden oder DNA-Strangbrüchen, Zellfunktionen beeinträchtigt. Diese Schädigung der Erbinformation führt zu einer Hemmung der Zellfunktionen und damit zu einem Absterben der Zellen (Rastogi *et al.* 2010). Im Kulturverfahren sieht man aus vermutlich diesem Grund auch keine vollständige Elimination der Bakterien. In der Praxis werden zur Desinfektion von Trinkwasser in Deutschland in der Regel UV-Dosen von mindestens 400 J/m<sup>2</sup> angewendet (TrinkwV 2001). Dennoch hat bereits die niedrigste eingesetzte Bestrahlungsdosis von 50 J/m<sup>2</sup> einen deutlich reduzierenden Effekt auf das Wachstum von Bakterien, die bereits hier um 3,7 Log-Stufen reduziert werden. Ab einer Dosis von 300 J/m<sup>2</sup> und mehr können zwischen 5,0 und 5,6 Log-Stufen Reduktion der KBE/mL erreicht werden. Dass die vollständige Inaktivierung der Bakterien, wie sie bei den Chlorbehandlungen beobachtet wurde, ausbleibt, kann mit Reparaturmechanismen zusammenhängen, die häufig in Folge von UV-Schädigung der DNA aktiviert werden. Je nach Grad der Schäden können kovalente Bindungen wieder getrennt und die DNA wieder erfolgreich abgelesen und transkribiert werden. Gelingt die Reparatur einigen Bakterien, so ist die Bildung von Kolonien auf dem CC-Agar weiterhin, wenn auch in deutlich reduzierter Zahl, möglich (Rastogi *et al.* 2010; Witkin 1976). Anhand der Analyse der intrazellulär vorliegenden ARG lässt sich eher vermuten, dass die DNA stark und womöglich irreversibel durch hochdosierte UV-Strahlung (ab 350 J/m<sup>2</sup>) geschädigt wird, da hier kein Nachweis mit der LA qPCR Methode oberhalb der Bestimmungsgrenze mehr möglich ist. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die DNA-Extraktion und PCR-Analyse direkt nach der UV-Bestrahlung vorgenommen wurden, wodurch die Zeitspanne für mögliche DNA-Reparaturen sehr gering war, während die Mechanismen bei *E. coli* im Kulturverfahren innerhalb der 24-stündigen Inkubation auf nährstoffreichem Medium für die DNA-Reparatur greifen können. Anhand der Analyse der sowohl intra-, als auch extrazellulär vorliegenden ARG mit der konventionellen qPCR (Nachweis von 112 bzw. 163 bp langen Fragmenten) ist keine signifikante Reduktion der Genkopien mit steigender UV-Dosis zu erkennen. Mit aus der linearen Regression ermittelten Steigung von nur -0,0004 Log-Stufen (eDNA, SA) und -0,00004 Log-Stufen (iDNA, LA) können die Ergebnisse von Stange *et al.* (2019a), Ho *et al.* (2016), McKinney und Pruden (2012) und Rudi *et al.* (2010) gestützt werden, die bereits zeigten, dass die Analyse kurzer Amplifikate nach UV-Behandlung die Reduktionsleistung für ARG unterschätzt. Deutlich wird der Effekt der besseren Abbildung mit der LA Methode bei der extrazellulären DNA. Hier ist die Log-Reduktion des langen Fragments mit 840 bp, verglichen mit dem kurzen, um Faktor 5 erhöht (Steigung der linearen Trendlinie von -0,002). Diese Ergebnisse passen zu von Ho *et al.* (2016) publizierten Ergebnissen zur Reduktion von viraler DNA mit unterschiedlichen Amplifikatlängen durch UV-Bestrahlung. Hier wurde eine Erhöhung der Log-Reduktion von SA (hier 250 bp) zu LA (hier 955 bp) um Faktor 4 ermittelt. Da durch UV-Bestrahlung eher die DNA selbst beschädigt wird, nicht aber andere Zellbestandteile, würde man erwarten, dass die Effekte der Erfassung von langen und kurzen Fragmenten für intra- und extrazelluläre DNA ähnlich sind. Anhand der Ergebnisse bestätigt sich dies jedoch nicht. Die Abnahme der intrazellulären Genkopien verläuft mit steigender UV-Intensität zunächst (bis 300 J/m<sup>2</sup>) ähnlich der extrazellulären, wobei für die SA qPCR kaum eine Abnahme festzustellen ist (Steigung von -0,00004 Log-Stufen), während die Steigung für die LA Methode bei -0,002 Log-Stufen liegt (R<sup>2</sup> hierbei mit 0,43 jedoch geringer als bei eDNA LA mit 0,98). Bei einer UV-Intensität von mehr als 300 J/m<sup>2</sup> können mit der LA qPCR keine Fragmente mehr nachgewiesen werden. Über den Grund hierfür kann nur spekuliert werden. In einer Studie von Bonura und Smith wurde schon 1975 anhand von *E. coli* festgestellt, dass Doppelstrangbrüche enzymatisch infolge der UV-induzierten DNA-Reparatur verursacht

werden können. Auch in diesem Experiment könnte die DNA-Exzisions-Reparatur von Thyminindimeren lediglich in den lebenden Zellen zu Strangbrüchen und damit ausbleibender Nachweisbarkeit mit der LA Methode geführt haben. Die Induktion von Strangbrüchen durch Reparaturenzyme konnte ebenso bereits proportional mit dem Zelltod korreliert werden (Bonura und Smith 1975b), was auch zu den hier erzielten Ergebnissen im Kulturverfahren passt. Da bei der extrazellulären DNA Reparaturmechanismen keine Rolle spielen, sinkt hier die Log-Genkopien-Konzentration von 0 bis 800 J/m<sup>2</sup> gleichmäßig. Dies zeigt, dass die Reduktion von ARG durch die LA-Methode besser als mit der konventionellen SA qPCR abbildbar ist.

In Tabelle 4-4 ist das Ergebnis für die Behandlungen von extra- und intrazellulären ARG mit UV und Chlor zusammengefasst. Hier ist jeweils das Angezeigte Log-Stufen Reduktionen (C/C<sub>0</sub>), bezogen auf die in der Praxis gängige Dosis der Desinfektionsmittel gegenübergestellt. In allen vier Fällen findet eine Überschätzung der Zahl übertragbarer Gene durch eine Anwendung der SA qPCR statt. Bei der in der Praxis gängige UV-Dosis von 400 J/m<sup>2</sup> (DVGW W 290), wird durch die konventionelle SA qPCR eine Log-Stufen Reduktion von 0,6 (intrazellulär), bzw. 0,2 (extrazellulär) angezeigt, während diese sich durch Anwendung der LA qPCR auf 3,3 Logstufen (intrazellulär), bzw. 0,9 Logstufen (extrazellulär) erhöht. Ähnliche Trends werden für die zulässige Chlor-Zugabemenge in Trinkwasser von 1,2 mg/L freiem Chlor (DVGW W 290) erzielt: Hier kann für die intrazellulären Gene, relativ zur unbehandelten Probe, eine Log-Stufen Reduktion von 0,3 mit der SA und 2,0 mit der LA qPCR erreicht werden. Die Log-Reduktion von 4,2 für die Untersuchung der extrazellulären Gene mit der konventionellen SA qPCR zeigt, dass Chlor für frei vorliegende DNA offenbar eine höhere Wirksamkeit aufweist, als für DNA, die in Bakterien vorliegt. Dennoch wird auch hier durch die LA qPCR eine höhere Log-Stufen Reduktion von 5,1 angezeigt. Bei der Detektion von Resistenzgenen während der reaktiven Trinkwasseraufbereitung ist es demnach ratsam, die LA qPCR Methode für ausgewählte Gene anzuwenden, da die Wirkung von UV-Bestrahlung oder Chlorung andernfalls geringer eingeschätzt werden kann, als sie tatsächlich ist.

Tabelle 4-4 Angezeigte Log-Stufen Reduktionen (C/C<sub>0</sub>) durch die in der Praxis gängigen Dosen der Desinfektionsmittel UV und Chlor durch die konventionelle/ „kurze“ Amplifikatlänge (SA) und die Analyse des vollständigen/ „langen“ Gens (LA).

Angezeigte Log-Stufen Reduktion bei Behandlung mit 400 J/m<sup>2</sup> UV durch SA und LA qPCR:

	intrazellulär	extrazellulär
SA	-0,6	-0,2
LA	-3,3	-0,9

Angezeigte Log-Stufen Reduktion bei Behandlung mit 1,2 mg/L Cl<sub>2</sub> durch SA und LA qPCR:

	intrazellulär	extrazellulär
SA	-0,3	-4,2
LA	-2,0	-5,1

### Untersuchung von Proben aus Wasseraufbereitungen mit Ozon-Behandlung

Um den Effekt der LA-qPCR bei einem realen Wasseraufbereitungsprozess zu erfassen, wurden exemplarisch Wasserwerksproben aus China und Deutschland mit den LA Primern untersucht. Hier wurde *sul1* zum Vergleich der konventionellen SA qPCR mit der LA qPCR verwendet, da es in allen Proben von hoher Relevanz war. In Abbildung 4-24 sind die Mittelwerte für *sul1* aus beiden in 2019 durchgeführten Probenahmen in den Wasserwerken SC und SIP dargestellt. Zwar handelt es sich hierbei um zwei chinesische Wasserwerke, die unterschiedliche Rohwasser-Ressourcen nutzen (Tai See und Yangcheng See), da jedoch *sul1* in beiden Wässern in hohen Konzentrationen auftritt und beide Wasserwerke dieselben Schritte zur Aufbereitung anwenden, wurden die Werte der vier Probenahmen für den Vergleich der SA qPCR und LA qPCR gemittelt. Der Verlauf der Konzentrationen nach den Behandlungsschritten ist für beide qPCR Methoden (SA und LA) ähnlich. Die Mittelwerte für

*sul1* LA liegen für nahezu alle Schritte 0,1 bis 0,5 Log-Stufen unter den Werten für die Standard SA qPCR. Die größte Differenz von 0,5 Log-Stufen tritt im Mittel nach der Sedimentation auf, wobei hier die Standardabweichung für *sul1* LA qPCR mit  $\pm 1,0$  vergleichsweise hoch ist. In drei von vier Proben liegen die LA-Werte nach der Sedimentation (Sed) deutlich unter den SA qPCR-Werten (Vergleich Anhang 8.6.1). Eine Erklärung für die erhöhte Differenz könnte der Anteil an *sul1* Genen sein, der in intakter Form in Bakterien vorliegt, nach der Koagulation sedimentiert (Hu *et al.* 2019) und damit mit der LA Methode nicht mehr erfassbar ist. Im Überstand könnte dann ein geringerer Anteil an *sul1* Genen zurückbleiben, von denen möglicherweise einige bruchstückhaft vorliegen.

Vor allem durch die Post-Ozonung werden die *sul1* Gene insgesamt deutlich reduziert (Verglichen mit den Konzentrationen im Zulauf). Es wurde erwartet, dass nach der Ozonung ein signifikanter Unterschied zwischen SA und LA detektiert wird, da Ozon als reaktives Oxidationsmittel bruchstückhafte DNA verursachen kann und *sul1* LA somit weniger intakte Gene erfassen kann. Überraschenderweise ist die Konzentration von *sul1* LA in zwei von vier Proben Post-O3 höher als die von *sul1* SA, während in den anderen beiden Proben *sul1* nur mit der SA Methode detektiert werden konnte und die Werte der LA qPCR unter der BG lagen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse spiegeln sich in der hohen Standardabweichung von  $\pm 1,6$  Log-Stufen wieder. Die Wirkung von Ozon auf die Reduktion der ARG hängt vermutlich stark von der Wassermatrix und der eingesetzten Dosis ab (Stange *et al.* 2019a), was die Variationen der Ergebnisse erklären könnte. Da die Ozon-Dosen leider unbekannt sind, kann darüber nur spekuliert werden. Durch die beiden Nachweise <BG mit der LA Methode wird jedoch deutlich, dass die LA qPCR in einigen Fällen wichtige Zusatzinformationen liefern kann. Der Nachweis mit der konventionellen qPCR liefert deutlich höhere Resultate, wobei es sich aber um defekte ARG handeln kann. Diese sind für eine Risikobewertung für das Trinkwasser zu vernachlässigen. Der wohl deutlichste Effekt tritt nach der Chlorung in den Reinwasser-Proben auf. In zwei von vier Proben kann mit *sul1* SA noch eine Konzentration von 2,8 (SIP März 2019) und 2,1 (SIP Aug 2019) log GC/mL detektiert werden, während *sul1* LA in allen vier Proben Ergebnisse < BG liefert. Somit wird das Aufkommen von *sul1* für aufbereitetes Trinkwasser in 50 % der hier untersuchten Fälle deutlich überschätzt. Dass die Abnahme von Resistenzgenen im Vergleich zu den Koloniezahlen während der Chlorung langsamer vonstattengeht, wurde bereits beschrieben (Stange und Tiehm 2016a). Die LA qPCR Methode könnte eine Möglichkeit sein, diese Unterschiede auf rein molekularer Ebene zu erfassen, indem nur intakte Gene (vermutlich größtenteils in Bakterien vorliegend) dargestellt werden.

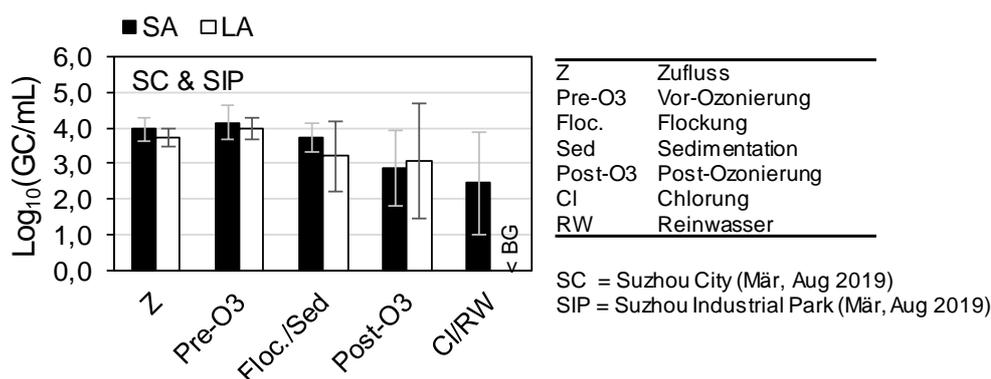


Abbildung 4-24 Vergleich von *sul1* Short Amplicon (SA, 163 bp) und Long Amplicon (LA, 840 bp) für die am Tai See beprobten Wasserwerke Suzhou City und Suzhou Industrial Park je im März und August 2019 (siehe Tabelle 3-2).

Um ein weiteres Gen hinsichtlich der Unterschiede zwischen SA qPCR und LA qPCR während der Trinkwasseraufbereitung zu untersuchen, wurde *blaTEM* ausgewählt, da dieses  $\beta$ -Laktamase-Gen eine hohe Relevanz in den Proben des Wasserwerks Langenau (ZV LWV,

Aufbereitung von Donau-Wasser) aufwies. Da  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu einer der bedeutendsten AB-Gruppen gehören und die Verbreitung der vermittelnden Resistenzgene ein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellt, ist das Monitoring der Effizienz von Aufbereitungsverfahren auch in Deutschland von enormer Wichtigkeit. Die ersten Behandlungsschritte des Wasserwerks Langenau wurden im Jahr 2020 mehrmals beprobt, sodass insgesamt sechs Proben mit SA und LA qPCR untersucht werden konnten. Die Mittelwerte mit Standardabweichung sind in Abbildung 4-25 gezeigt. Bereits im Zulauf, aber auch nach Flockungs-Sedimentation stets geringere Werte mit der LA qPCR detektiert werden, als mit der SA qPCR. Dabei konnte für SA (von 2,1 auf 2,2 log GC/mL) und LA (von 1,6 auf 1,8 log GC/mL) gleichermaßen beobachtet werden, dass die Flockung mit anschließender Sedimentation nicht zur Reduktion des ARG führt. Die Ozonung führt in diesem Wasserwerk zu einer deutlichen Reduzierung von *blaTEM* um 1,4 Log-Stufen auf 0,8 log GC/mL (SA). Anhand der konventionellen SA qPCR-Methode kann jedoch angenommen werden, dass keine vollständige Elimination von *blaTEM* erreicht werden kann. Dies würde ein Risiko der weiteren Ausbreitung des ARG mit der Trinkwasserverteilung bedeuten und eine Übertragung des Gens auf potentiell humanpathogene Keime könnte nicht ausgeschlossen werden (Sanganyado und Gwenzi 2019). Auch hier bringt die LA qPCR Methode zusätzliche Informationen: Intakte *blaTEM* Gene (LA) können nach der Ozonung hier nicht mehr nachgewiesen werden. Dodd (2012) beschreibt Studien in denen gezeigt werden konnte, dass Ozon eher die Zellbestandteile resistenter Bakterien schädigt, darin enthaltene ARG jedoch meist intakt bleiben, obwohl Ozon eigentlich eine hohe Reaktivität gegenüber dsDNA besitzt. Die in der Wasserbehandlung eingesetzten Konzentrationen von 0,1-1 mg/L Ozon würden hierbei jedoch ausreichen, um ARG direkt zu deaktivieren. Da auch im Wasserwerk Langenau zwischen 1,3 mg/L (im Winter) und bis zu 2,5 mg/L (im Sommer) Ozon eingesetzt werden und dies zur vollständigen Elimination von *blaTEM* unter Anwendung der LA qPCR Methode führt, geht bereits ab dieser Behandlungsstufe kein Risiko der Ausbreitung von *blaTEM* mehr aus. In nur zwei von sechs Post-O3 Proben wurden bereits für die kurzen Amplifikate Nachweise < BG ermittelt, was damit im Fall dieser Wasserwerksproben zu einer Überschätzungsquote für die *blaTEM* Detektion von rund 67 % führt.

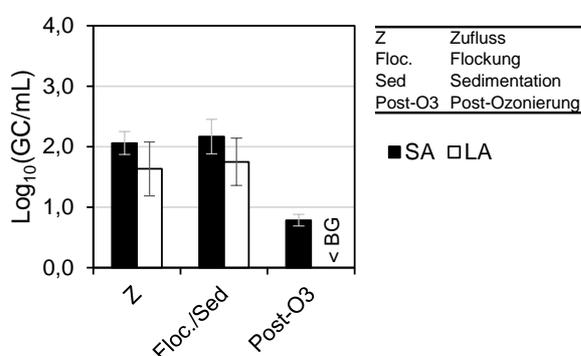


Abbildung 4-25 Vergleich von *blaTEM* Short Amplikon (SA, 112 bp) und Long Amplikon (LA, 861 bp) für die vom Zweckverband Langenau zur Verfügung gestellten Wasserwerksproben von 6 Probenahme-Zeitpunkten (Proben laut Tabelle 3-1, ZVLWV OW, VorR und O3 von Feb, Apr, Jun, Aug, Okt 2020 und Aug 2021).

Es konnten keine vergleichbaren Studien zur Untersuchung der Reduktion von ARG in Wasseraufbereitungsanlagen gefunden werden. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse liefern demnach eine wichtige Grundlage für zukünftige Analysen von Trinkwasseraufbereitungen. Die Daten verdeutlichen, dass die LA qPCR wichtige zusätzliche Erkenntnisse zur Entfernung von ARG im Rahmen der Trinkwasseraufbereitung und Überschätzungen von ARG-Konzentrationen vermieden werden können. Da lediglich durch intakte ARG ein Risiko der Übertragung auf Bakterien besteht und es damit zur Resistenz-Ausbreitung und einer indirekten Gefährdung der menschlichen Gesundheit kommen kann, ist die Anwendung der LA qPCR zielführend, um eine optimierte Risikobewertung von ARG in der Trinkwasseraufbereitung zu gewährleisten.

#### 4.2.3.4 Fazit der Methodenetablierung

Grundsätzlich wird weiterhin die Anwendung der konventionellen qPCR-Methoden mit vergleichsweise kurzen Amplifikaten (100-300 bp) für die Untersuchung aquatischer Proben empfohlen. Diese sind unempfindlicher gegenüber Inhibitoren in den Proben, als die langen Fragmente von 800 bp und mehr. Die Analyse ganzer ARG mittels qPCR (LA qPCR) sollte zusätzlich durchgeführt werden, wenn ein reaktives Verfahren zur Desinfektion angewendet wurde (UV, Ozon, Chlor) und somit eine Überschätzung der Genkopienzahl wahrscheinlich ist. Da die ARG *sul1* und *blaTEM* zuverlässige Ergebnisse, sowohl mit der konventionellen qPCR, als auch der hier etablierten LA qPCR Methode lieferten und zudem weit verbreitete ARG von hoher hygienischer Relevanz sind, eignen sich diese beiden Gene für die Abschätzung der Eliminationsleistung. Sowohl in Laborexperimenten mit UV und Chlor, als auch anhand von Realproben aus der Trinkwasseraufbereitung mit Ozonung konnte gezeigt werden, dass die Analyse mittels LA qPCR die Eliminationsleistung reaktiver Verfahren besser abbildet als die konventionelle qPCR.

## 4.3 Elimination von Resistenzgenen

### 4.3.1 Elimination von Antibiotikaresistenzgenen durch konventionelle Behandlungsverfahren

Verschiedene Proben aus Trinkwasserwerken in Deutschland und China wurden mittels qPCR auf ARG analysiert. Die gezeigten Untersuchungen wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit mit Werten aus der Literatur mit den konventionellen qPCR-Methoden durchgeführt und stellen somit ein Monitoring von verschiedenen Trinkwasseraufbereitungen dar.

#### 4.3.1.1 Trinkwasseraufbereitung am Tai See

Um die gesamte Reinigungseffizienz dreier Wasserwerke (Wujiang, Suzhou City und Suzhou Industrial Park) untereinander und saisonal (Herbst, Frühjahr, Sommer) vergleichen zu können, wurde die Konzentration im Reinwasser der Konzentration im Zulauf gegenübergestellt. Im November (Herbst) konnte nur das Wujiang Wasserwerk beprobt werden, weswegen es hier keine Vergleichsmöglichkeiten gibt. Anhand der in Abbildung 4-26 dargestellten Daten kann man sehen, dass alle im Zulauf detektierten Resistenzgene (*su1*, *su2* und *blaTEM*) hier insgesamt erfolgreich eliminiert wurden. Lediglich *16S* und *intl1* sind im Reinwasser noch nachweisbar, wurden aber um 4,1 (*16S*) bzw. 1,0 (*intl1*) Log-Stufen reduziert. Das Methicillin-Resistenzgen *mecA*, welches beispielsweise ein Indikator für den Eintrag von Krankenhausabwässern mit klinisch relevanten Keimen (MRSA) sein kann, tritt lediglich im März im Wu Wasserwerk auf. Da dieses Gen im Rohwasser der anderen beiden Wasserwerke im März nicht relevant zu sein scheint, handelt es sich hierbei vermutlich um einen punktuellen Eintrag durch kommunale oder klinische Abwässer. In der Schweinehaltung, die am Tai See besonders stark angesiedelt ist, wurden vermehrt assoziierte MRSA Stämme über das *mecA* Gen nachgewiesen (Boost *et al.* 2012). Auch solche Abwässer können für den vereinzelt positiven Nachweis von *mecA* verantwortlich sein. Generell liegen die Konzentrationen der *16S* Gene zwischen 6,1 und 7,1 log GC/mL. Man kann keinen signifikanten Unterschied in den Konzentrationen von bakterieller DNA zwischen Frühjahr und Sommer erkennen, wobei die Datenbasis gering ist. Die niedrigste *16S*-Konzentration von 6,1 log GC/mL war im Herbst nachweisbar, was durch die niedrigeren Temperaturen begründet werden kann, die ungünstig für das Wachstum von Bakterien sind. Auch die Resistenzgene *su1* und *su2* sowie das Integrase-Gen *intl1* weisen in allen Jahreszeiten ähnlich hohe Genkopien-Konzentrationen zwischen 3,3 und 4,3 log GC/mL auf. Hier ist demnach kein Einfluss von beispielsweise höherer Antibiotika-Produktion in der kälteren Jahreszeit zu erkennen, was mit Beobachtungen von Huang *et al.* (2019) einhergeht. Das *mcr-1* Gen wurde nur im August 2019 im SIP Wasserwerk nachgewiesen, was dafürspricht, dass es lediglich saisonal im Yangcheng See zu höheren Einträgen kommt. Die Reduktion des Gens im Wasserwerk ist jedoch vollständig, im Gegensatz zu den meisten anderen Resistenzgenen, sowie *16S* und *intl1*. Sowohl im Frühjahr, als auch im Sommer findet eine Reduktion von nur 1,5 und 2,6 Log-Stufen des *16S*-Gens statt, was im Vergleich zu den anderen Wasserwerken, mit ähnlich hoher bakterieller Belastung im Zulauf, deutlich geringer ist. Auch *intl1*, *su1* und *su2* werden bei initialen Konzentrationen von 3,6 bis 3,9 log GC/mL im März nur um 0,9 bis 1,1 Log-Stufen reduziert. Offenbar ist die Reinigungsleistung des Wasserwerks vergleichsweise schlechter als die von Wu und SC. Mögliche Gründe dafür können nicht optimale Verweilzeiten in den jeweiligen Behandlungsstufen sein, oder zu geringe Konzentrationen von Chlor oder Ozon (Li und Gu 2019). Die unvollständige Abtötung von Bakterien kann bewirken, dass diese Unempfindlichkeiten entwickeln oder Chlor-resistente Bakterienarten wie beispielsweise Pseudomonaden relativ angereichert werden (Jia *et al.* 2015). Die  $\beta$ -Laktamase-Gene *blaTEM* und *blaCTX-M-32* werden im März, wo sie im Rohwasser in geringeren Konzentrationen nachweisbar sind, vollständig eliminiert, was einer Reduktionsleistung von mehr als 1,8 bzw. 0,8 Log-Stufen entspricht. Im August werden von 2,1 und 2,4 log GC/mL lediglich 0,6 und 0,7 Log-Stufen eliminiert. Auch hier kann die höhere Außen- sowie Wassertemperatur fördernd auf das Wachstum von Bakterien und die somit verschlechterte Gesamtelimination wirken.

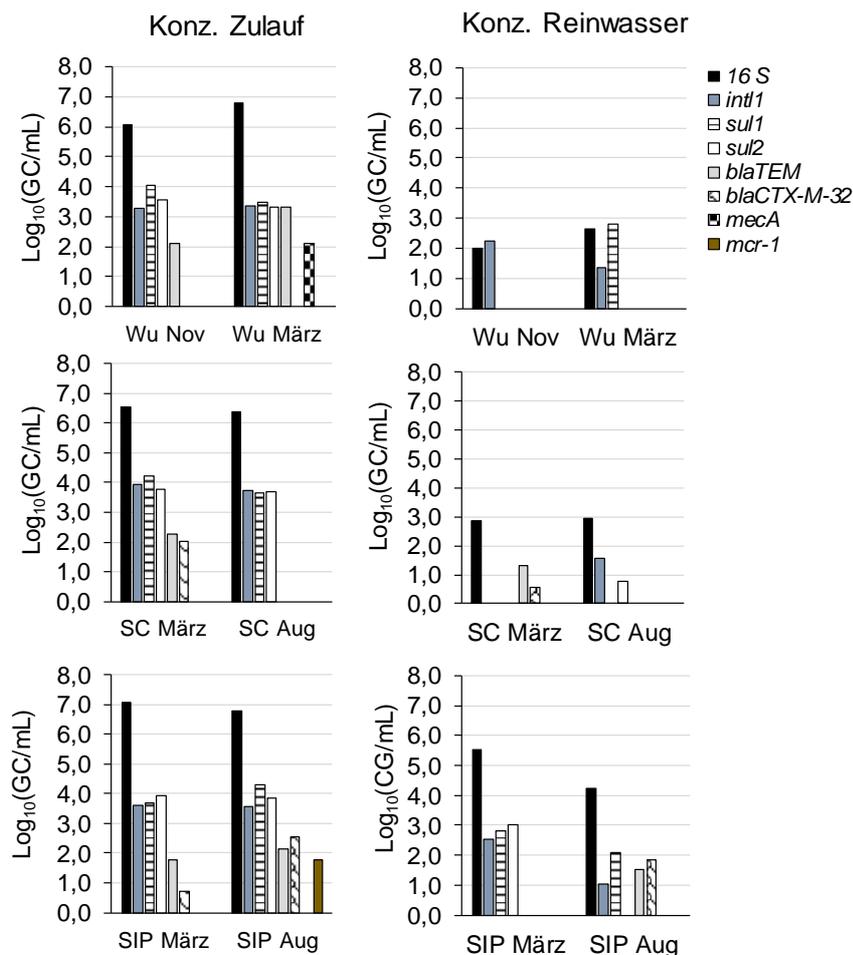


Abbildung 4-26 ARG-Konzentrationen im Zulauf und Ablauf (Reinwasser) der Behandlungsstraße aller Wasserwerke im November, März und August (siehe Tabelle 3-2). Fehlende Säulen entsprechen Genkonzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze von ca. 1 GC pro mL.

In Abbildung 4-27 sind ARG-Abundanzen (Anteil ARG zur bakteriellen *16S rDNA*) nach den einzelnen konventionellen Aufbereitungsschritten der drei Wasserwerke am Tai und am Yangcheng See dargestellt. Durch die Darstellung der Abundanzen kann man erkennen, nach welchen Schritten sich antibiotikaresistente Bakterien im Verhältnis zur Gesamtbakterienkonzentration anreichern (steigende Abundanz, kleinere Balken) oder diese reduziert werden (sinkende Abundanz, größere Balken). Die Genkopien/mL der einzelnen Gene sind in Anhang 8.6.1 tabellarisch gelistet. Aufgrund einer besseren Vergleichbarkeit der Abundanzen sind nur die Werte der März-Beprobung gezeigt. Die Wasserwerke Wu und SC bereiten Wasser aus dem Tai See auf, während SIP Wasser aus dem Yangcheng See nord-östlich des Tai Sees als Rohwasser-Ressource nutzt. Die Aufbereitungsschritte der drei Wasserwerke ähneln sich stark, wobei ein signifikanter Unterschied die fehlende Vor-Ozonung (Pre-O<sub>3</sub>) im Wu-Wasserwerk ist. Diese ist dort zwar vorhanden, war zum Zeitpunkt der Probenahme jedoch nicht aktiv. Bei allen drei Wasserwerken wird eine Flockung (Koagulation, K) und eine Sedimentation (Sed) durchgeführt. Anschließend findet die Passage durch einen Sandfilter (SF) statt. Nach der Filtration wird Ozon (Post-O<sub>3</sub>) zugegeben und das Wasser dann über Aktivkohle (zum Teil biologisch aktiviert, GAC oder BAC) gefiltert. Im letzten Schritt vor der Entlassung ins Wasserverteilungsnetz (RW) wird dem Wasser Chlor (Cl) zugesetzt. Genaue Details zu Oxidations-/ Desinfektionsmittel-Konzentrationen wurden von den Wasserwerken leider nicht übermittelt.

Die Analyse von ARG während einer Trinkwasseraufbereitung wird selten durchgeführt und es existieren keine Standardverfahren oder Grenzwerte für diese Parameter. Einige Quellen belegen das Vorkommen von ARG in der Trinkwasseraufbereitung in China (Guo *et al.* 2014,

2014; Hu *et al.* 2018, 2018; Hu *et al.* 2019; Stange *et al.* 2019b; Wang *et al.* 2019). Konventionelle Behandlungsverfahren, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, wurden hinsichtlich der Elimination anderer anorganischer und organischer Kontaminanten etabliert und eignen sich meist nicht für eine vollständige Elimination von ARG und ARB. Gelangen Rückstände von Resistenzen in das Trinkwasser besteht die Gefahr der Ausbreitung von Resistenzen unter verschiedenen Bakterienspezies (Sanganyado und Gwenzi 2019). Die Übertragung von ARG auf humanpathogene Bakterien ist dabei nicht ausgeschlossen. Es ist deshalb wichtig, aktuell betriebene Trinkwasseraufbereitungen auf Rückstände von ARG zu untersuchen und bei nicht hinreichender Eliminationseffizienz neue Verfahren zu entwickeln, die eine vollständige Elimination bewirken können.

Anhand der Abundanzen im Zufluss der drei Wasserwerke sieht man deutlich, wie unterschiedlich die relative Verteilung der ARG über den Behandlungsprozess ist. Das Methicillin-Resistenzgen *mecA* ist mit relativ geringer Abundanz von nur -4,7 log im Zufluss des Wujiang Wasserwerks detektierbar, während es im SC Wasserwerk mit ebenso geringer Abundanz erst nach der Vor-Ozonung detektiert werden kann. Dies könnte dafürsprechen, dass die Einträge nicht kontinuierlich stattfinden oder die Genkopien nahe der Bestimmungsgrenze nicht immer nachweisbar sind.

Dass *mecA* erst im zweiten Schritt des SC Wasserwerks auftritt, kann auch mit dem höheren Volumen begründet sein, dass von der bereits etwas reineren Probe zum Zwecke der DNA-Extraktion filtriert wurde. Im SIP Wasserwerk, wo Wasser aus dem Yangcheng See aufbereitet wird, scheint dieses Gen nicht von Relevanz zu sein. Das höhere Filtrationsvolumen könnte auch für das Aufkommen von im Zufluss nicht nachweisbaren *blaCTX-M-32* Gens nach Vor-Ozonung im SIP Wasserwerk verantwortlich sein. Die Vor-Ozonung war zum Zeitpunkt der Probenahme im Wu Wasserwerk nicht aktiv und die Flockung und Sedimentation führt zur Zunahme der Abundanzen *intl1*, *sul1*, *sul2*, *blaTEM* und *mecA* um insgesamt bis zu 1,0 Log-Stufe. Im Vergleich dazu bleiben die Abundanzen nach der Vor-Ozonung in SC und SIP für *intl1*, *sul1*, *sul2* und *blaCTX-M-32* relativ gleich, während die Abundanzen von *blaTEM* um mindestens 0,9 Log-Stufen sinken. Aufgrund der hohen Konzentration an Partikeln und anderen organischen Substanzen im Wasser ist die Effizienz der Ozonung für die Entfernung von ARG vermutlich gering, da die Ozon-Moleküle verstärkt andere Komponenten im Wasser angreifen. Diese Ergebnisse der Erhöhung von ARG durch Ozonung sind in Übereinstimmung mit Resultaten von Su *et al.* (2018) und Guo *et al.* (2014).

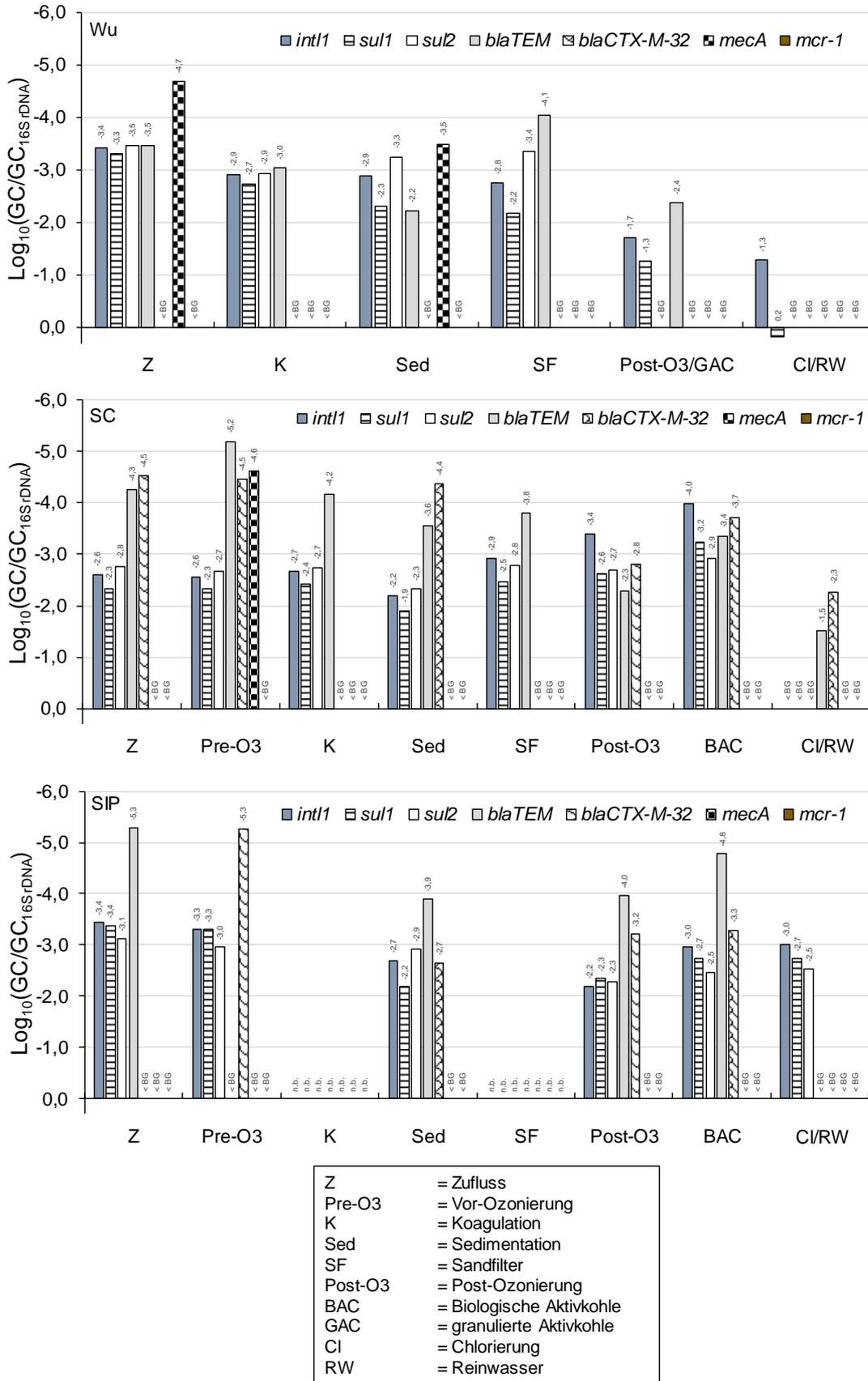


Abbildung 4-27 Relative Abundanzen der Antibiotikaresistenzgene pro Genkopien der 16S rDNA über die konventionelle Behandlungskette dreier Wasserwerke am Tai und Yangcheng See (Kampagne März 2019, siehe Tabelle 3-2). Die Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 1 Genkopie pro mL Probe.

Die bei SC und SIP auf die Ozonung folgende Flockung und Sedimentation zeigt anschließend den gleichen Effekt wie bei Wu, eine Steigerung der Abundanzen aller detektierbaren Gene. Der Ablauf des Sandfilters wurde bei SIP im März 2019 nicht beprobt werden.

Bei Wu und SC, die Tai See Wasser aufbereiten, sind unterschiedliche Trends zu beobachten: Bei SC kann *blaCTX-M-32* nach dem SF nicht mehr nachgewiesen werden während auch die Abundanz der anderen Gene um 0,2 (*blaTEM*) bis 0,7 (*intl1*, *sul1*, *sul2*) Log-Stufen sinkt. Im Gegensatz dazu steigen die Abundanzen für *intl1* und *sul1* im Wu Wasserwerk nach SF geringfügig um 0,1 Log-Stufen an, was bedeuten könnte, dass sich Bakterien, die diese Gene tragen, auf dem Sandfilter anreichern. Da die Assoziation von *intl1* mit *sul1* schon in einigen Studien belegt wurde, kann dies den simultanen Anstieg erklären (Chaturvedi *et al.* 2021; Mazel 2006). Die *sul2*-Abundanz sinkt hingegen kaum von -3,3 auf -3,4 log, während die Abundanz von *blaTEM* sehr deutlich von -2,2 auf -4,1 log sinkt. Dass die Reduktion der Abundanz aller Gene bei SC stärker ausgeprägt ist, könnte mit der Vor-Ozonung zusammenhängen. Reste des Ozons könnten nach Flockung und Sedimentation während der Passage des Sandfilters noch weiter reagieren, und somit ARB eliminieren. Die Sandfiltration ist ein wichtiger Schritt für die Elimination von ARG und kann zu einem Anstieg einzelner Gene führen. Dies konnte in anderen Studien ebenfalls beobachtet werden (Hu *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2016).

Die bei allen drei Wasserwerken auf die Sandfiltration folgende Ozonung, in Kombination mit granulierter bzw. biologisch aktivierter Aktivkohle, führt bei SIP und SC zu einer Reduktion der Abundanz für die Gene *intl1*, *sul1*, *blaTEM* und *blaCTX-M-32*. Sowohl ARB, als auch ARG können an der Aktivkohle adsorbieren und zusätzlich durch Ozon oxidiert werden. Im Wu Wasserwerk hingegen wird die *16S rDNA* zwar durch Post-O<sub>3</sub>/GAC reduziert, die Abundanzen von *intl1*, *sul1* und *blaTEM* steigen jedoch um 0,9 bis 1,7 Log-Stufen an. Dies lässt vermuten, dass sich resistente Bakterien auf der Aktivkohle anreichern. Es ist nicht auszuschließen, dass die Resistenz gegen bestimmte Gruppen von Antibiotika mit einer Unempfindlichkeit gegenüber Ozon einhergeht. Alexander *et al.* (2016) und Su *et al.* (2018) fanden eine ähnliche Erhöhung von Resistenzgenen bei der Anwendung von Ozon in der Abwasser-Behandlung, die mit bestimmten überlebenden Bakterienarten einherging. Trotz der erhöhten Abundanz dieser Gene im Wu Wasserwerk, scheint die gesamte Reinigungseffizienz dieser Behandlungsstraße im Vergleich zu den anderen zwei Wasserwerken im Hinblick auf die Elimination von ARG höher zu sein. Im Reinwasser ist lediglich *intl1* nachweisbar und eine geringe Konzentration von nur 6,4 log GC/mL *sul1*, jedoch mit einer steigenden Abundanz. Das könnte ein Hinweis auf frei vorliegende ARG sein. Auch frei vorliegende DNA (oder eDNA) kann durch Transformations-Prozesse ein hohes Risiko der Ausbreitung von Resistenzen mit sich bringen und ist deshalb nicht zu vernachlässigen (Nielsen *et al.* 2007; Sivalingam *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2018b). Dies verdeutlicht umso mehr, wie wichtig nicht nur die Kontrolle mikrobiologischer Parameter im Trinkwasser, sondern auch die Analyse von Resistenzen auf molekularer Ebene ist. Im Kontrast zu Wu, findet man im Reinwasser von SC Rückstände von *blaTEM* und *blaCTX-M-32* in sogar erhöhter Abundanz im Vergleich zur vorherigen Stufe, was ebenso für eine relative Anreicherung von resistenten Bakterien sprechen könnte. Lin *et al.* (2016) konnten in Experimenten mit unterschiedlichen Chlorkonzentrationen zeigen, dass einige ARG-Abundanzen durch die Behandlung mit gering konzentriertem Chlor (0,5-1 mg/L) ansteigen können. Die eingesetzten Chlor-Konzentrationen in den Wasserwerken sind leider nicht bekannt, weshalb nur vermutet werden kann, dass dieser Effekt eine Rolle bei der Erhöhung der Abundanzen spielt.

Trotz der räumlichen Nähe der Wasserwerke und der damit in den selben Beprobungs-Zeiträumen ähnlichen Wetterverhältnissen sind die Konzentrationen der bestimmten Gene sehr unterschiedlich. Auch die Reduktionen der einzelnen Gene und auch relativen Abundanzen unterscheiden sich im Zulauf der Wasserwerke sowohl saisonal, als auch unter den verschiedenen Wasserwerken, trotz ähnlicher Behandlungsstrategie. Dies zeigt umso deutlicher, wie komplex die Aufbereitung von Trinkwasser ist, wenn das Rohwasser unter starken anthropogenen Einflüssen steht. Ein kontinuierliches Monitoring mikro- und

molekularbiologischer Parameter wäre in solchen Fällen essentiell, um Quellen, die zu einer Anreicherung von Mikroorganismen oder ARG führen, schnell zu identifizieren und den Prozess zu optimieren.

#### 4.3.1.2 Trinkwasseraufbereitung in Deutschland

Für die Trinkwasseraufbereitung in Deutschland werden Grundwässer häufiger als Oberflächenwässer verwendet. Diese sind durch die Bodenpassage nach Versickerung von Regenwasser weniger mit chemischen und mikrobiellen Kontaminationen belastet als Oberflächenwasser und bieten damit meist hygienisch und chemisch bessere Voraussetzungen für die Trinkwassergewinnung. Dennoch kommen ca. 30 % des deutschen Trinkwassers aus Oberflächenwässern oder Uferfiltrationen (Umweltbundesamt 2021). Häufig werden beide Rohwassertypen für die Gewinnung von Trinkwasser gemischt. In Deutschland werden jährlich ca. 700 bis 800 Tonnen Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt (GERMAP 2015). Die Reinigung von Abwässern, die entsprechende Rückstände enthalten können, wird gut kontrolliert und führt nur zu geringen regelmäßigen Einträgen in die Umwelt. Trotzdem können ARG und ARB durch den Eintrag von unvollständig gereinigten Abwässern und Klärschlamm in die aquatische Umwelt gelangen (Hubbard *et al.* 2020; Michael *et al.* 2013), was vor allem bei Starkregenereignissen der Fall sein kann. Übertritte von Abwasser aus Regenüberlaufbecken von Kläranlagen können punktuell zu hohen Werten von ABs, ARB und ARG in der aquatischen Umwelt führen (Stoll *et al.* 2012). Für den Nachweis von ARG und ARB in der Trinkwasseraufbereitung in Deutschland existieren bislang kaum Daten. Voigt *et al.* (2020a) untersuchten ein deutsches Oberflächenwasser, das als Trinkwasser-Reservoir dient, und fanden dabei nur sehr geringe Konzentrationen von Antibiotika, sowie ARG und ARB. Weitere Untersuchungen verschiedener Trinkwasseraufbereitungsanlagen in Deutschland sind nötig, um die Datenbasis zu erweitern und das Vorkommen von Resistenzen für eine Einschätzung des Ausbreitungsrisikos über das Trinkwassernetz zu untersuchen.

Die Aufbereitung von Donauwasser im Wasserwerk des ZV LWV umfasst wesentliche Schritte einer Trinkwasseraufbereitung (siehe Kapitel 2.4). Es wurden neben Proben des Rohwassers zu mehreren Zeitpunkten auch Proben nach der ersten Vorreinigung durch Flockungssedimentation (Floc./Sed) und nach Ozonung (O3) zur Verfügung gestellt und auf ARG untersucht. Da erwartet wurde, dass im Vergleich zu China generell weniger Resistenzen in der aquatischen Umwelt nachgewiesen werden können, wurden weitere Resistenzgene aus der Klasse der  $\beta$ -Laktame in die Untersuchungen einbezogen. In

Abbildung 4-28 ist zunächst die Konzentration der untersuchten ARG im Rohwasser (Zulauf), sowie nach der Ozonung (nach O3) dargestellt. Die Reduktion der im Zulauf nachweisbaren ARG ist zusammenfassend in Abbildung 4-29 gezeigt.

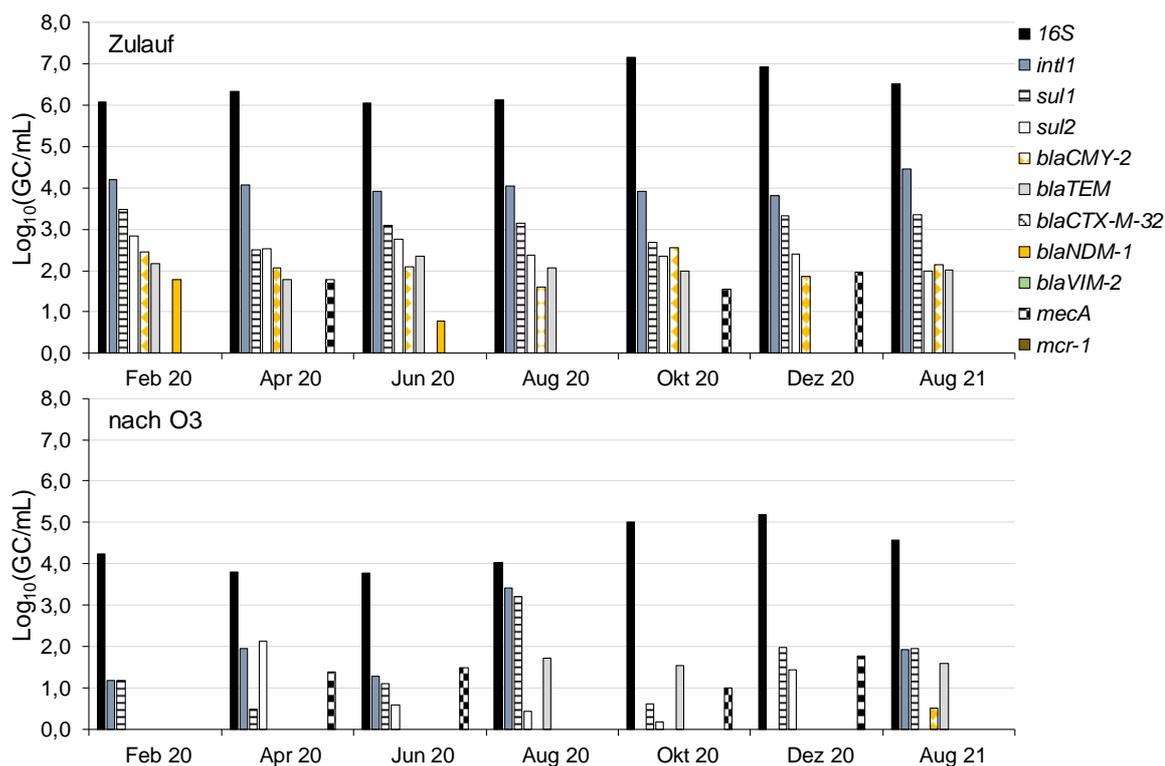


Abbildung 4-28 Konzentrationen der Gene im Zulauf (Donauwasser) und nach Ozonung (nach O<sub>3</sub>) des Wasserwerks ZV LWV (TWA Proben Tabelle 3-1). Fehlende Säulen entsprechen Genkonzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze von 1 Genkopie pro mL.

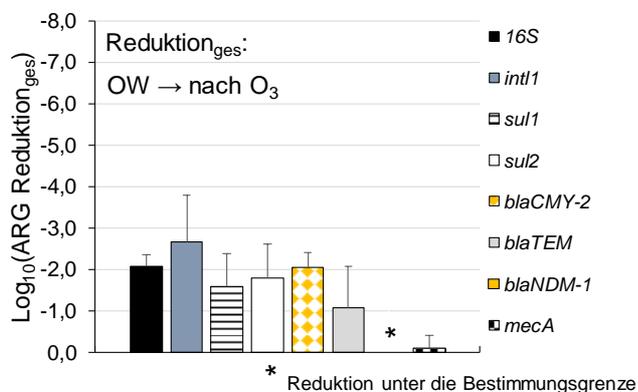


Abbildung 4-29 Mittlere Log-Stufen-Reduktion ( $C/C_0$ ) der Gene nach Flockung/Sedimentation und Ozonung (O<sub>3</sub>) der sieben Proben (ZV LWV, Tabelle 3-1). Die Bestimmungsgrenze liegt bei 1 Genkopie pro mL.

Die Konzentrationen der bakteriellen *16S rDNA* variieren über das Jahr zwischen 6,1 und 7,2 log GC/mL. Ein Anstieg der Konzentration kann nur im Oktober und Dezember beobachtet werden. Zum selben Zeitpunkt trat ebenso eine erhöhte Konzentration von *blaCMY-2* auf. Die anderen nachgewiesenen Resistenzgene (*sul1*, *sul2*, *mecA*) kommen, verglichen mit den anderen Monaten, nicht in auffällig hohen Konzentrationen vor. Die Sulfonamid-Resistenzgene *sul1* und *sul2* wurden in jeder der untersuchten Rohwasserproben (außer Jun 20) mit Konzentrationen zwischen 2,0 und 3,4 log GC/mL detektiert. Das Integrase-Gen *int1* ist mit höheren Konzentrationen zwischen 3,8 bis 4,7 log GC/mL vertreten. Auch in allen Zulauf-Proben vertreten ist *blaTEM* mit 1,8 bis 2,3 log GC/mL (außer Dezember), sowie *blaCMY-2* mit 1,6 bis 2,5 log GC/mL. Das  $\beta$ -Laktamase-Gen *blaCMY-2* kodiert für Resistenzen gegen Cepheme, zu denen die Cephalosporine gehören und wurde bereits 1996 plasmidär in *Klebsiella pneumoniae* identifiziert (Bauernfeind *et al.* 1996).

Es ist bekannt, dass Cephalosporine der 3. und 4. Generation in der Massentierhaltung in Deutschland eingesetzt werden und *K. pneumoniae* ein häufig isolierter Keim aus Veterinärkliniken ist. Auch über das Vorkommen Carbapenemase-bildender Bakterien in der Veterinärmedizin wurden 2014 Berichte veröffentlicht (Hauck *et al.* 2014). Diese Bakterien könnten beispielsweise für die positiven Nachweise des *bla*NDM-1 Gens im Februar und Juni 2020 verantwortlich sein (Dortet *et al.* 2014). Ebenso bekannt ist ein Anstieg des Anteils von MRSA-Stämmen in Deutschland, sowohl in der Veterinär- als auch Humanmedizin (Hauck *et al.* 2014). Bei starken Niederschlägen können solche Keime aus Abwässern über Regenüberlaufbecken in Oberflächenwässer gelangen, was auch das punktuelle Aufkommen von *mecA* im April, Oktober und Dezember 2020 erklären könnte, da es sich hierbei um sehr niederschlagsreiche Monate handeln kann. Jedoch befanden sich die Konzentrationen des *mecA* Gens stets im vergleichsweise niedrigen Bereich, zwischen 0,4 und 2,0 log GC/mL im Oberflächenwasser. Bei der Gesamtreduktion fällt auf, dass das *mecA* Gen durch Vorreinigung und Ozonung nur um 0,2 bis 1,3 Log-Stufen reduziert wird, während *bla*CMY-2 (außer im August 2021) vollständig durch diese Behandlungen eliminiert wird. *Staphylococcus aureus* Stämme, zu denen auch die *mecA* tragenden MRSA Erreger gehören, sind für die Biofilmbildung bekannt (Herrera *et al.* 2007). Die Bildung von Flocken oder Formierung von Biofilmen führt durch eine extrazelluläre Matrix zum Schutz der darin lebenden Mikroorganismen vor externen Stressoren wie Desinfektions- und Oxidationsmittel (McLandsborough *et al.* 2006). Dies könnte eine Erklärung für die niedrige Eliminationsrate sein. In der Abwasseraufbereitung wurde gezeigt, dass eine Ozonung zu einer Anreicherung von bestimmten ARG führen kann, während andere eliminiert werden. Basierend auf weiterführenden Untersuchungen wurde dies auf die relative Anreicherung von Bakterienarten, deren DNA reich an Purinbasen ist, zurückgeführt (Alexander *et al.* 2016). Die bakterielle 16S rDNA wird insgesamt (inkl. Ozonung) um 2,1 Log-Stufen reduziert. Auch die ARG und die Integrone Klasse 1 nehmen durch die Behandlung deutlich ab. Die Konzentrationen nach der Ozonung sind unterhalb der Bestimmungsgrenze oder in einem sehr niedrigen Bereich (1,0-3,2 log GC/mL). Die für den klinischen Bereich wesentlich relevanteren Gene *bla*CTX-M-32 und *bla*VIM-2 können hingegen durch die Ozonung vollständig eliminiert werden.

Da für einige ARG die Reduktion weniger stark ausgeprägt als für die 16S rDNA kann man zum Teil von einem Anstieg relativer Abundanzen (gezeigt in Abbildung 4-30) sprechen. Der Anstieg der relativen ARG-Abundanzen während einer Wasserbehandlung mit unter anderem Flocc./Sed und O3 ist ein häufig beobachtetes Phänomen. Man geht davon aus, dass Organismen, die Antibiotikaresistenzen als Fitness-Vorteil besitzen, auch resistenter gegen Desinfektion und generell äußere Einflüsse sind (Guo *et al.* 2014; Hu *et al.* 2019; Sanganyado und Gwenzi 2019; Wang *et al.* 2019; Xi *et al.* 2009). Auch sogenannte Desinfection by-products (*engl.*, DBPs) werden als Promotoren für die Entwicklung von ARG vermutet (Li und Gu 2019). Insgesamt liegen die absoluten Konzentrationen der nach O3 noch nachweisbaren ARG jedoch bei niedrigen Werten zwischen 1,0 und 3,2 log GC/mL, wobei die höchsten Werte von 2,1 und 3,2 log GC/mL nur vereinzelt bei *sul1* und *sul2* nachgewiesen wurde (siehe Anhang 8.6.2). Da die Behandlungsstraße nach der Ozonung weitere Schritte zur Aufbereitung des Trinkwassers beinhaltet, ist davon auszugehen, dass die geringen Rückstände der ARG durch UV-Bestrahlung, Chlorung und Beimischung von Grundwasser vollständig reduziert werden können (Sharma *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2019b). Einige Proben des zugeführten Grundwassers wurden ebenso auf die entsprechenden ARG untersucht und ergaben kaum Positivbefunde, mit Ausnahme von *bla*CMY-2 mit 1,3 und 1,6 log GC/mL im August und Dezember 2020 (Daten nicht gezeigt, Anhang 8.6.2). Solche vereinzelt auftretenden Positivbefunde können beispielsweise von unregelmäßigen Einträgen aus der Landwirtschaft, wie der Dünger-Nutzung von Schlämmen aus der Tierhaltung, herrühren (Hubbard *et al.* 2020). Die ARG *bla*CTX-M-32 und *bla*VIM-2 können aber durch die Ozonung vollständig eliminiert werden.

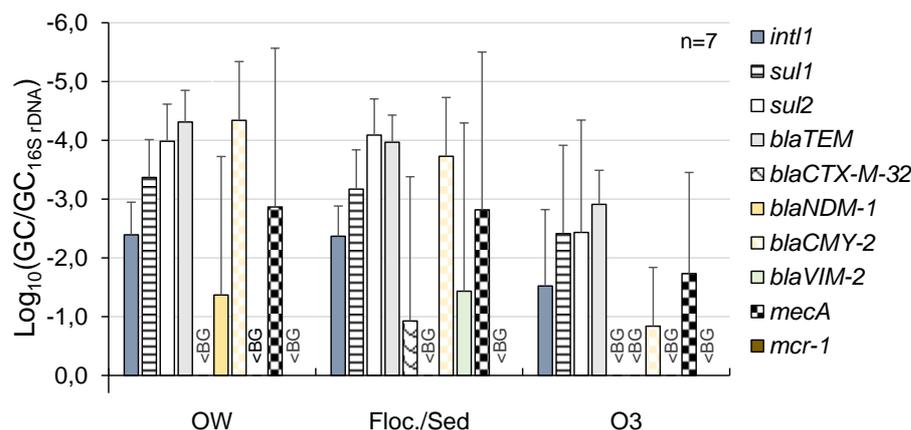


Abbildung 4-30 Mittlere relative Abundanzen der Antibiotikaresistenzgene pro 16S der nach Flockung/Sedimentation (Floc./Sed) und Ozonung (O3) der konventionellen Trinkwasseraufbereitung (ZV LWV, Tabelle 3-1). Die Bestimmungsgrenze liegt bei 1 Genkopie pro mL.

Anhand von Proben aus Trinkwasseraufbereitungen in China und Deutschland konnte gezeigt werden, dass ARG nachweisbar sind und zum Teil nicht vollständig entfernt werden können. ARG, die Resistenzen gegen Antibiotika aus den Klassen der Sulfonamide,  $\beta$ -Laktame, sowie Methicillin und Colistin vermitteln, scheinen bereits ubiquitär in der aquatischen Umwelt vorzukommen und teilweise in das Trinkwassernetz (in China) zu gelangen. Das Risiko der Übertragung von Resistenzen aus dem Trinkwasser auf Pathogene im menschlichen Körper wird in Deutschland derzeit noch als vernachlässigbar gering eingestuft. In anderen Ländern, wie China, wo eine mikrobielle Belastung des Trinkwassers wahrscheinlicher ist, ist dieses Risiko vergleichsweise höher einzuschätzen. Mit steigender Weltbevölkerung ist auch von höheren Belastungen der kommunalen, landwirtschaftlichen und industriellen Abwässer und dadurch mit erhöhten Einträgen von Resistenzen in die aquatische Umwelt zu rechnen. Es müssen Verfahren etabliert und/oder Methodenkombinationen evaluiert werden, die, auch bei Verschlimmerung der Situation mit höheren ARG-Belastungen, zu einer ausreichenden Elimination von potentiell schädlichen Keimen und klinisch relevanten Resistenzen aus dem Trinkwasser beitragen.

#### 4.3.2 Elimination von Antibiotikaresistenzgenen durch Dichte-Ultrafiltration

Aufgrund der raschen Ausbreitung und Übertragung von Resistenzgenen in der Umwelt (Brown 2019; Brown *et al.* 2020; Sidhu *et al.* 2020; Stange *et al.* 2019b; Stoll *et al.* 2012) wurden ARG in mehreren Oberflächengewässern und Trinkwasseraufbereitungsanlagen weltweit nachgewiesen (Bergeron *et al.* 2015; Guo *et al.* 2014; Stange *et al.* 2016). Herkömmliche Aufbereitungsstrategien sind darauf ausgelegt, die wichtigsten organischen Verunreinigungen und hygiene relevanten Mikroorganismen aus dem Trinkwasser zu entfernen (Stange *et al.* 2019a); sie reichen jedoch meist nicht aus, um ARG vollständig zu eliminieren (Hu *et al.* 2019). Die unvollständige Beseitigung von ARG während der Wasseraufbereitung stellt ein gewisses Risiko für die menschliche Gesundheit dar, da horizontale Gentransferprozesse zur weiteren Verbreitung von Antibiotikaresistenzen unter verschiedenen Bakterienarten beitragen könnten (Wintersdorff *et al.* 2016). Der Einsatz von Ultra-, Mikro- und Nanofiltrationsmembranen kann dazu beitragen, den ARG-Gehalt im Trinkwasser zu reduzieren (Breazeal *et al.* 2013). Polyethersulfon-Multibore®-Ultrafiltrationsmembranen (Inge GmbH) wurden mit Polyelektrolyt-Multilayern durch die Layer-by-Layer-Technik (LbL, Surflay Nanotec GmbH) modifiziert, um ihre Rückhaltefähigkeit gegenüber Salzen und ARG zu erhöhen. Die modifizierten Kapillarmembranen wurden so charakterisiert, dass sie einen Molekulargewichts-Cut-off (bei 90 % Rückweisung) von 384 Da aufwiesen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche zum Rückhalt von ARG durch die beschichteten Membranen im Labor- und Pilotmaßstab gezeigt.

#### 4.3.2.1 Rückhalt und Cut-Off der unbeschichteten Membran

Die unbeschichtete Membran wird bereits in vielen Wasserwerken weltweit als Ultrafiltrations-Membran zur Aufbereitung von Ab- oder Trinkwasser eingesetzt (Kerdi *et al.* 2018; Ming Chew *et al.* 2015). Eine Charakterisierung der Membran bezüglich des Rückhalts von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größen wurde bislang noch nicht durchgeführt. Auch um den Effekt der LbL-Beschichtungen zu verdeutlichen, wurden die Filtrations-Experimente mit der UF-Membran mit einem MWCO von 100 kDa durchgeführt. Dafür wurde der Rückhalt von ARG-Fragmenten unterschiedlicher Länge (doppelsträngige DNA-Fragmente von 91 bis 1500 bp) betrachtet. Die Genkopien-Konzentration des Feeds und des Permeats sind in Abbildung 4-31 dargestellt.

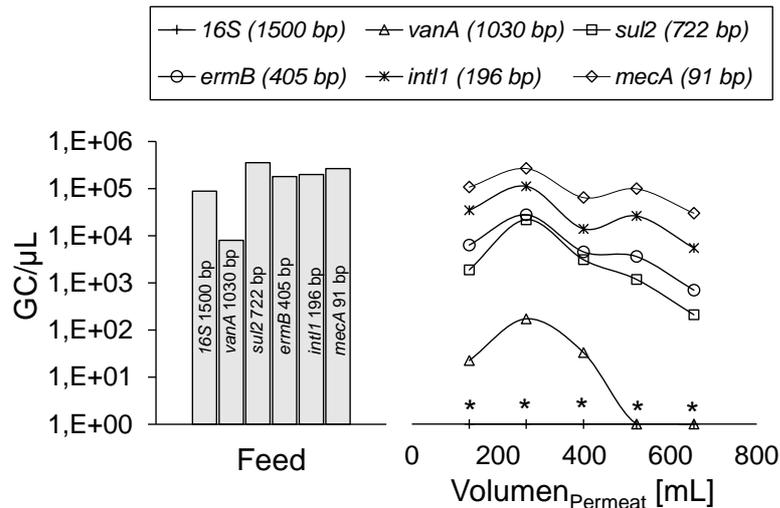


Abbildung 4-31 Reduktion der Genkopienzahl für die unbeschichtete Membran während einer Filtration von insgesamt 650 mL. Werte unter der Bestimmungsgrenze (BG) von 10 Genkopien (GC)/µL sind mit \* markiert.

Die Konzentration der ARG-Fragmente unterschiedlicher Länge in der Permeat-Fraktion nahm mit abnehmender Zahl von Basenpaaren (bp) deutlich zu. Das größte untersuchte Fragment (16S, 1500 bp) wurde im Permeat überhaupt nicht nachgewiesen. Für das 1030 bp (*vanA*) Fragment lag die Konzentration nach der Filtration von 400 mL unter die BG. Intakte Resistenzgene haben häufig eine Länge von 800 bis 1200 bp (wie z.B. in Tabelle 4-2 zusammengefasst) und sind potenziell zwischen Bakterien durch horizontalen Gentransfer übertragbar. Daher wurden repräsentative Gene mit ähnlichen Längen ausgewählt, um zu untersuchen, ob die Ultrafiltration in der Lage ist, intakte Resistenzgene zurückzuhalten. Es zeigte sich, dass ARG vergleichbarer Größe erfolgreich von der Membran zurückgehalten werden und nur kleinere Fragmente die Poren passieren können. Bei den herkömmlichen Methoden zum Nachweis von Resistenzgenen mittels qPCR werden nur kurze Fragmente von 100-400 bp für die Quantifizierung verwendet (Kumar und Chordia 2015). Bei der On-site-Anwendung der Multibore®-Ultrafiltrationsmembranen in der Wasseraufbereitung kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei einem Positiv-Nachweis von ARG im Permeat nur um defekte und durch die Behandlungen bereits fragmentierte Gene handelt.

Der Siebkoeffizient wurde nach Gleichung (3-3) bestimmt, indem die absoluten Genkopien der gepoolten Permeat-Fraktion durch die Kopien im Feed dividiert wurden. Abbildung 4-32 zeigt den berechneten Siebkoeffizienten  $S_0$  in Abhängigkeit von den DNA-Fragmentgrößen und die Rückhalt-Effizienz für die unbeschichtete Ultrafiltrationsmembran in Abhängigkeit der Molekülgrößen.

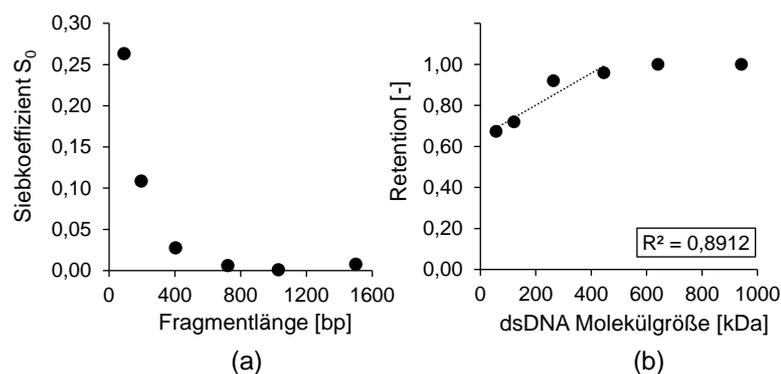


Abbildung 4-32 (a) Der Siebkoeffizient  $S_0$ , bezogen auf die getesteten Fragmentgrößen. (b) Die relative Retention in Abhängigkeit von der DNA-Molekülgröße zur Berechnung des Membran-Cut-Offs für doppelsträngige DNA.

Der Siebkoeffizient nahm mit der Fragmentgröße deutlich ab, was zu einem  $S_0$  von 0,008 und niedriger für Fragmente größer als 722 bp führte. Für die Berechnung der Retention in Abhängigkeit von der Molekülgröße wurde der zweite Permeat-Probenahmepunkt (nach der Membran-Äquibrierung und geringe Fouling-Prozesse) von zwei Filtrationsexperimenten gewählt (Daten des zweiten Filtrationsexperiments nicht gezeigt). Eine lineare Regression der Molekülgrößen zeigte eine deutliche Retention in beiden unabhängigen Experimenten. Eine Bestimmung des Cut-Offs auf der Grundlage der Regression konnte für die unbeschichtete Membran für dsDNA-Moleküle unter den verwendeten Bedingungen nicht genau abgeleitet werden (aufgrund einer statistisch nicht-signifikanten Anzahl von Datenpunkten zwischen 100 und 300 kDa). Ausgehend von der dsDNA kann eine 90 %-ige Retention zwischen den dsDNA-Genfragmenten von 121 und 263 kDa begrenzt werden. Verglichen mit dem MWCO von 100 kDa, das zuvor mit einer PEG/PEO-Mischung bestimmt wurde, ist dieser Wert höher. Es wird vermutet, dass die superhelikale Struktur der DNA-Moleküle durch die Scherung in den Poren gestreckt wird, was auch in einer früheren Studie zur Untersuchung der UF-Membranpenetration durch ein 9,5 kbp-Plasmid festgestellt wurde (Arkhangelsky *et al.* 2011). In dieser Studie zeigten die Beobachtungen, dass sogar das getestete Plasmid von 5871 kDa die Poren einer 20 kDa PES-Membran durchdringen konnte, offensichtlich unabhängig von der elektrostatischen Abstoßung zwischen der stark negativ geladenen DNA und der negativ geladenen PES-Membran. In einer anderen Studie, die sich ebenfalls mit der Permeation von DNA-Molekülen durch Ultra- und Nanofiltrationsporen befasst, konnten ähnliche Effekte beobachtet werden (Borujeni und Zydney 2014). Eine neuere Arbeit kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass linearisierte DNA eine höhere Dehnung und Flexibilität aufweist (Reif *et al.* 2019). Das bedeutet, dass sie bei der Porenfiltration leichter vom Strömungsfeld erfasst werden kann und somit die Membran leichter passiert. Dies erklärt, warum auch ARG-Fragmente von 121 bis 263 kDa die unbeschichteten UF-Membranen während der Dead-End-Filtration durchdringen konnten. Im Vergleich zu den Studien von Arkhangelsky *et al.* (2011; Reif *et al.*) und Reif *et al.* (2019), bei denen größere DNA-Moleküle (als die in der vorliegenden Arbeit getesteten) nur unzureichend von UF-Membranen zurückgehalten wurden, konnte hier gezeigt werden, dass ARG-Fragmente größer als 263 kDa von der unbeschichteten Membran erfolgreich zurückgehalten werden.

#### 4.3.2.2 Rückhalt durch die beschichteten Membranen

Um den Effekt der Beschichtung auf den Rückhalt von ARG-Fragmenten zu evaluieren, wurden weitere Filtrationsexperimente mit zwei LbL-Varianten durchgeführt. In allen durchgeführten Experimenten konnte beobachtet werden, dass die Beschichtung mit 4 bzw. 4,5 Doppelschichten aus PDADMAC/PSS (4DL, 4,5DL) zu einer vollständigen Retention aller Genfragmente führte, selbst für das kleinste Fragment (91 bp). In Abbildung 4-33 sind die absoluten Genkopienzahlen pro Fraktion aufsummiert für alle getesteten Fragmente dargestellt. Die Gesamtretentionseffizienz von 2 Log-Stufen für die unbeschichtete Membran, die einer Entfernung von 98,3 % der gefilterten ARG-Fragmente entspricht, wurde durch die

Beschichtungen optimiert und es wurde für beide Beschichtungsarten ein 100 %-iger Rückhalt aller Genfragmente erzielt. Die gemessene Genkopienzahl im Retentat der unbeschichteten Membran entspricht ungefähr der theoretischen Konzentration bei vollständigem Rückhalt. Im Permeat der beschichteten Membranen konnten keine Genfragmente quantifiziert werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem zuvor bestimmten MWCO der LbL-Membranen (~ 380 Da).

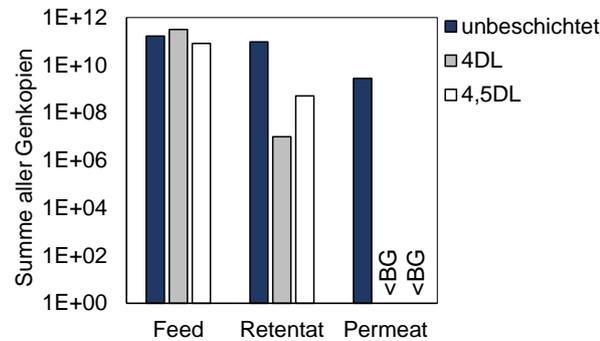


Abbildung 4-33 Summe der absoluten Genkopien für alle getesteten Fragmente in der Feed-, Retentat- und Permeatfraktion für das unbeschichtete Modul im Vergleich zu den LbL-beschichteten Membranen (4DL und 4,5DL). BG = Bestimmungsgrenze.

Nicht nur der niedrigere Cut-Off der beschichteten Membranen zu führt einer vollständigen ARG-Retention. Auch die Wechselwirkungen zwischen der DNA und der LbL-Beschichtung trägt im Vergleich zur unbeschichteten Membran offenbar intensiver sind und zusätzlich zum Rückhalt der DNA bei. Daher wurden Inkubationstest ohne Filtration durchgeführt, um festzustellen, ob die LbL-Beschichtung mit Schichten aus Polyanionen und Polykationen chemisch oder physikalisch mit den ARG-Fragmenten interagieren kann. In den in Abschnitt 3.8 beschriebenen Versuchen wurden die Membrantypen (4DL, 4,5DL und unbeschichtet) gleichmäßig zerschnitten und 24 Stunden in sterilem Reinstwasser mit ARG-Fragmenten inkubiert. Durch Beprobung der Arbeitslösung bei t=0 Stunden (Start) und t=24 Stunden (Überstand), sowie der DNA-Extraktion aus den Membranen nach 24 Stunden (Membran) konnte die Wechselwirkung zwischen ARG und Membranen bestimmt werden. Abbildung 4-34 zeigt die Ergebnisse für alle untersuchten Fraktionen. Als Negativkontrollen wurde ein Ansatz ohne Membranen parallel analysiert.

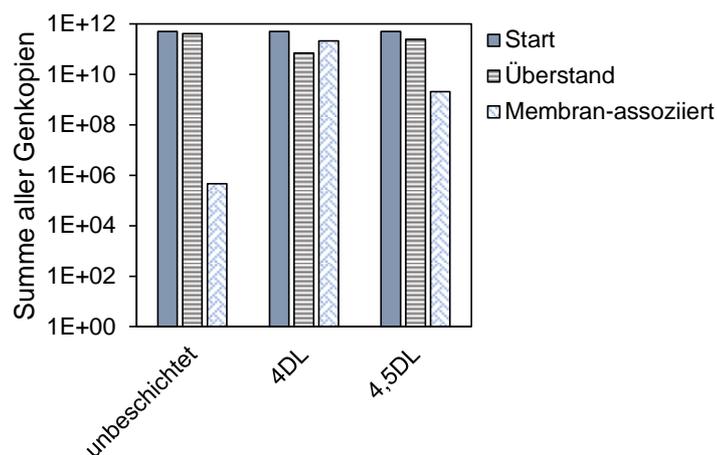


Abbildung 4-34 Summe der absoluten Genkopien, quantifiziert im Überstand nach t=0 h (Start) und 24 h und auf der Membran nach 24 h (Membran-assoziiert).

Die Anzahl der Genkopien im Überstand ist für die unbeschichtete und die beschichteten Membranen ähnlich. Die absolute Anzahl der abgebauten Genfragmente konnte anhand der nachgewiesenen Reduktion der Genfragmente über einen Zeitraum von 24 Stunden in der Negativkontrolle mit der ARG-Lösung, aber ohne Membran, berechnet werden (hier nicht gezeigt, siehe Anhang 8.6.3). Die Anwesenheit der Membran führte offenbar zu erheblichem Abbau von frei vorliegender DNA, was durch die fehlende Sterilität nach Zugabe der Membranstücke zu begründen sein könnte. Daran adsorbierte Mikroorganismen könnten die freie DNA als C-Quelle nutzen und diese somit abbauen. Nichtsdestotrotz ist der Unterschied der auf den Membranen adsorbierbare Anteil von ARG zwischen den getesteten Membranvarianten deutlich erkennbar. Der Anteil der auf der 4DL-Membran ermittelten Genkopienzahlen von 42,9 % deutet auf eine bessere Adsorption der ARG-Fragmente hin. Der Prozentsatz der an die Membranen 4,5DL und unbeschichtet adsorbierten ARG-Menge ist hingegen sehr gering (0,4 % bzw. 0,0001 %). Die Membranbeschichtung wurde so konzipiert, dass nicht nur ein höherer Rückhalt aufgrund der kleineren Porengröße erreicht wird, sondern auch die Oberflächeneigenschaften angepasst werden, um den Rückhalt von organischen Molekülen zu optimieren. Die äußere Schicht ist bei beiden Beschichtungen negativ geladen, aber es kann immer zu einer Vermischung der Polykation- und Polyanion-Schichten kommen, was zu zusätzlichen positiven Ladungen auf der Membranoberfläche führen kann und einige Bindungsstellen für die DNA bietet. Bei der 4DL Membran kann dieser Effekt verstärkt auftreten, da die negativen und positiven Polyelektrolytschichten gleichermaßen vertreten sind. Bei der 4,5DL Membran überwiegen die negativ geladenen Schichten, was zu erhöhten Abstoßungseffekten von Membran und DNA führen könnte.

#### 4.3.2.3 Pilot-Versuche

Am Standort des Wasserwerks in Wujiang wurde im November 2018 und März 2019 eine Pilotanlage beprobt, die vom Hersteller der UF/NF Membrankapillaren dort zwecks der Durchführung der Membranfiltration installiert wurde. In einer Aufbereitungs-Linie von Trinkwasser wurde die UF Membran in einem Maßstab von 6 m<sup>2</sup> Membranoberfläche nach einem Flockungsschritt verbaut und eine Ozonung sowie BAC nachgeschaltet (LINIE-1). In einigen Trinkwasserwerken wird die Anwendung von UF Membranen bislang eher als einer der letzten Schritte, und vor allem nach der Ozonung, in eine Behandlungskette integriert (Guo *et al.* 2014). In anderen Studien zur Anwendung der UF in der Trinkwasseraufbereitung lag der Fokus mehr auf dem Membranfouling (Zhou *et al.* 2014) und der Performance-Verbesserung (Shao *et al.* 2018; Sheng *et al.* 2016; Xu *et al.* 2019). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass eine der UF vorgeschaltete Flockung das Membranfouling verringert, da so hydrophile Substanzen wie Proteine oder Huminsäuren ausgefällt werden, bevor es zu

einer Verblockung der Membran kommen kann (Dixon *et al.* 2013; Li *et al.* 2019b). Die nachgeschaltete Ozonung konnte verglichen mit der vorgeschalteten eine Verbesserung der Trinkwasserqualität im Hinblick auf T&O Stoffe und Algentoxine erzielen, da die Algen auf diese Weise vor der UF nicht desintegriert und ihre Zellbestandteile nicht freigesetzt werden (Kueppers 2019). Ob die Integration der UF zwischen Koagulation und Ozonung jedoch auch zu einem Rückhalt von ARG führt, wurde bisher nicht evaluiert. Die Konzentrationen der bakteriellen DNA (*16S*), des Integrase-Gens *intl1* und verschiedener ARG für diese Prozesskette, sowie für UF und UF/NF, sind in Abbildung 4-35 gezeigt.

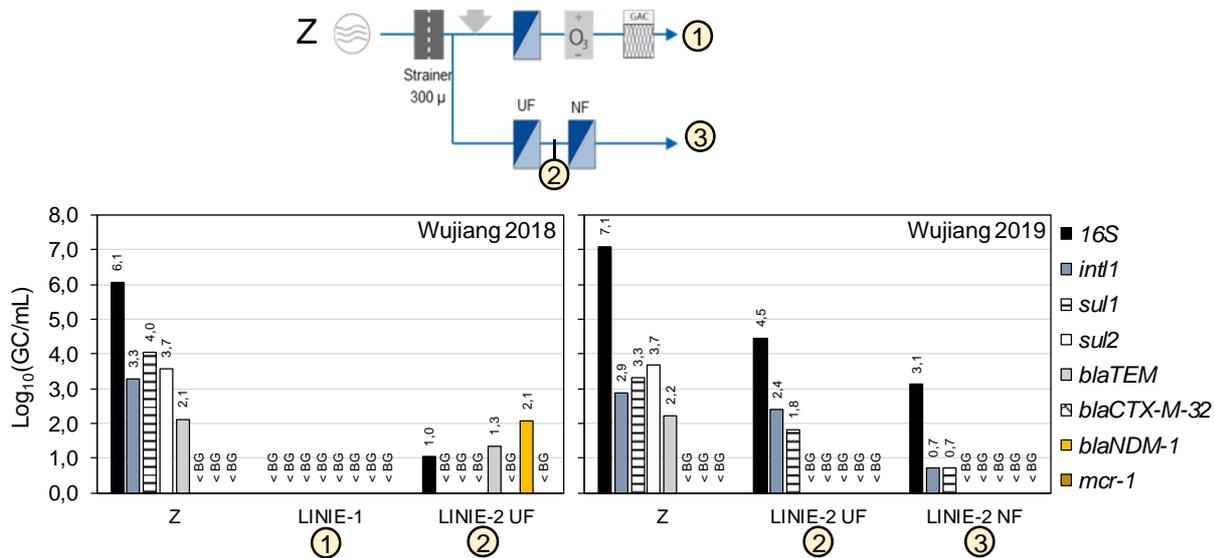


Abbildung 4-35 Pilot-Anlage am Standort des Wasserwerks in Wujiang mit UF und NF Membranen der Firma Inge GmbH. Probenahmen im November 2018 und März 2019, siehe Tabelle 3-3.

Bei der Probenahme 2018 wurden die Genkonzentrationen der Linien 1 und 2 verglichen. Da die NF zu diesem Zeitpunkt noch nicht aktiv war, wurde die Linie 2 bereits nach der UF beprobt. Im Zulauf der Pilotanlage konnten die in Oberflächenwasser üblichen *16S* Konzentrationen von 6,1 log GC/mL detektiert werden. *Intl1*, sowie die ARG *sul1*, *sul2*, *blaTEM* und *blaCTX-M-32* wurde mit intermediären Konzentrationen von 2,1 bis 4,0 log GC/mL detektiert. Die Beprobung des Ablaufs von Linie 1 zeigte, dass alle zuvor detektierbaren Gene vollständig durch die Abfolge Koagulation/UF/O<sub>3</sub>/BAC eliminiert werden konnten. Die Reduktion der bakteriellen *16S rDNA* um ganze 6 Log-Stufen ist damit vergleichsweise hoch. Wie bei Proteinen oder Huminsäuren handelt es sich bei DNA-Molekülen um hydrophile organische Moleküle, die durch Flockung ausgefällt werden können. Zudem konnte auch die Elimination von resistenten Mikroorganismen durch die Flockung und anschließende Sedimentation der Koagulate bereits demonstriert werden (Hu *et al.* 2019). Auch die UF sollte aufgrund der geringen Porengröße von nur 100 kDa Mikroorganismen zurückhalten. Die Ergebnisse von Linie 2 zeigen jedoch, dass auch nach der UF, ohne nachgeschaltete Behandlungen, Rückstände der *16S rDNA*, sowie der ARG *blaTEM* und *blaNDM-1* detektiert werden konnten. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um Bakterien handelt, die auf der Permeat-Seite der Membran aufgewachsen sind und die erhöhten Werte im Ablauf der UF somit durch eine Kontamination des Systems verursachen (Baker und Dudley 1998). Eine Ozonung im Anschluss an die UF, wie sie in Linie 1 getestet wurde, kann vorteilhaft sein, da durch die Zugabe von Ozon eine zusätzliche Desinfizierung des UF-Permeats stattfindet, was die Ergebnisse der Beprobung von Linie 1 beweisen. Im März 2019 wurde hingegen nur Linie 2 beprobt, da Linie 1 inaktiv war. Hier konnte nun jedoch auch die aktive NF beprobt werden. Es zeigte sich, dass die Log-Stufenreduktion durch die UF im Vergleich zur Beprobung im November 2018 sowohl für *16S* mit nur 2,6 Log-Stufen, als auch für *intl1* und *sul1* mit 0,5 bis 1,5 Log-Stufen geringer war. Die NF Membran konnte alle drei Gene um weitere 1,4 (*16S*) 1,7 (*intl1*) und 0,9 (*sul1*) Log-Stufen reduzieren, führte jedoch nicht zur vollständigen Elimination

dieser Gene. Aufgrund der geringen Porengröße der NF, die in der Regel bei 1-2 nm liegt, ist die Wiederfindung von bakterieller DNA und ARG im Permeat lediglich auf einen Bewuchs mit Bakterien zurückzuführen, was ein bekanntes Problem ist (Flemming 2002).

Die in Kapitel 4.3.2.2 im Labor-Maßstab getesteten Dichte-Ultrafiltrations- (DUF) Membranen, sollten anstelle der NF in die Pilot-Anlage des Wujiang Wasserwerks integriert werden, um den Rückhalt von unter anderem ARG unter realen Bedingungen zu untersuchen. Aufgrund der Covid-19-Pandemie konnten diese Arbeiten leider nicht umgesetzt werden und es wurde eine mobile Pilotanlage entworfen, die die Beprobung von Oberflächenwässern in Deutschland mit der UF und der DUF Membran ermöglichte. So konnten zwei Kampagnen, eine an der Ruhr und eine an der Alz, durchgeführt werden. Auch für diese Proben wurde, aufgrund der parallelen Anwendung der kulturbasierten Methoden zum Nachweis  $\beta$ -Laktam-resistenter Umweltbakterien, das Spektrum der analysierten ARG auf weitere  $\beta$ -Laktamase Gene erweitert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-36 dargestellt.

Die Filtration mit der DUF-Membran ließ sich im Cross-Flow-Betrieb mit einem Flux von ~15 LMH für einen Zeitraum von mindestens 8 h stabil durchführen, wobei das Oberflächenwasser aus dem Fluss vor dem Eintritt in die Membran durch einen 300  $\mu$ m Filter geleitet wurde. Somit bestätigten die ersten beiden Pilot-Versuche, dass die DUF auch unter realen Bedingungen effizient filtriert. Eine Verblockung der Membran blieb über den gesamten Zeitraum der Beprobung aus.

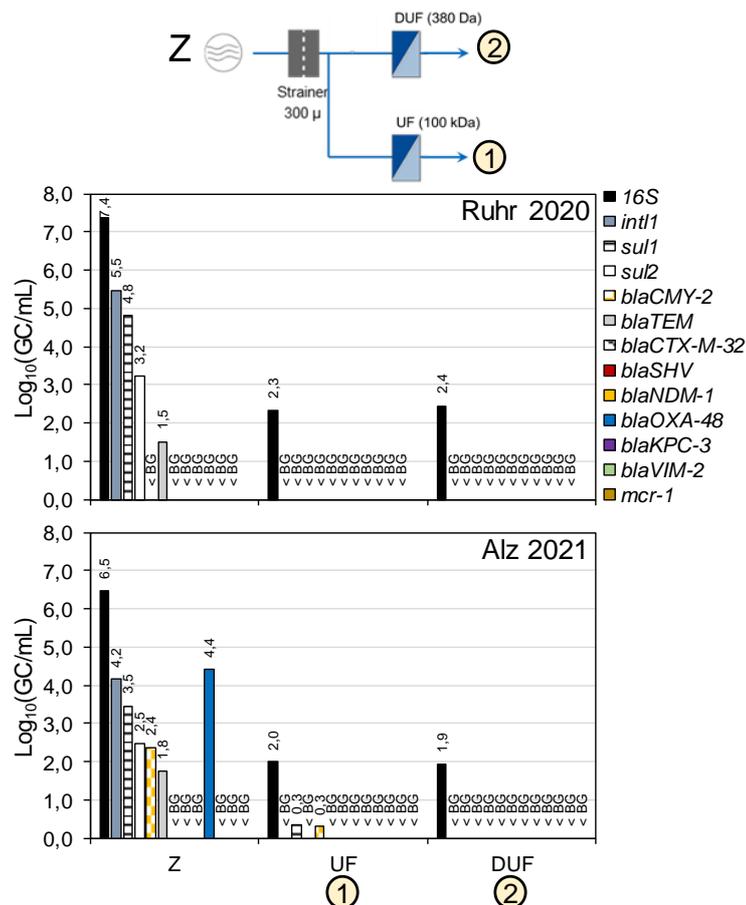


Abbildung 4-36 Beprobung der mobilen Pilot-Anlage zur Filtration von Oberflächenwasser (Ruhr im September 2020 und Alz im August 2021) mittels Ultrafiltration (UF) und Dichte-Ultrafiltration (DUF). Die Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 1 Genkopie (GC) pro mL.

In beiden Oberflächengewässern treten, trotz räumlicher und zeitlicher Unabhängigkeit, ähnliche ARG in ähnlichen Konzentrationen auf. Dadurch bestätigt sich erneut die hohe

Relevanz der Sulfonamid-Resistenzen *sul1* und *sul2* sowie *blaTEM* als wichtiger Vertreter der  $\beta$ -Laktamase Gene. Die Konzentrationen sind für die meisten Gene (außer *blaTEM*) in der Ruhr etwas höher. Da es eine Nacht vor der Probenahme an der Alz allerdings zu einem starken Niederschlagsereignis kam, durch welches der Wasserstand von ca. 20 auf ca. 50 cm anstieg, kann dieser Unterschied auch durch Verdünnungseffekte verursacht sein. Zu den genannten Resistenzgenen und *intl1*, wurden in der Alz zudem auch *blaNDM-1* und *blaOXA-48* detektiert. Diese  $\beta$ -Laktamasen können Resistenzen gegen Carbapeneme vermitteln. Sie werden durch die Filtration mit der DUF vollständig zurückgehalten. Die konventionelle UF hingegen kann zwar *blaOXA-48* erfolgreich zurückhalten, im Filtrat zeigten sich, neben *sul2*, weiterhin geringe Konzentrationen von 0,3 log GC/mL von *blaNDM-1*. Da die Unterbindung der Verbreitung von Resistenzen gegen Reserve-Antibiotika wie Carbapeneme besonders wichtig ist, scheint hier die DUF definitiv eine Verbesserung gegenüber der UF zu sein. Zwar werden bereits durch die UF die meisten ARG zurückgehalten, sowie die bakterielle 16S rDNA um 4,5 Log-Stufen reduziert, jedoch können auch geringe Konzentrationen bereits Risiken für die menschliche Gesundheit bergen. Diese Risiken sind besonders hoch, wenn es sich um intakte, intrazelluläre ARG handelt, die durch HGT potentiell übertragen und verbreitet werden können. Hier sind die etablierten kulturbasierten Verfahren für den Nachweis  $\beta$ -Laktam-resistenter Umweltbakterien eine große Bereicherung für das Monitoring, da so evaluiert werden kann, ob es sich um kritische ESBL-bildende Bakterien im Filtrat handelt (nachweisbar auf ChromESBL), oder lediglich um oligotrophe Umweltbakterien, die natürliche Resistenzen tragen können. Anhand des Bakterienkonsortiums im Rohwasser (Z, Abbildung 4-37), das auf den Antibiotika-haltigen Medien isoliert wurde (ChromESBL, BL1, BL2), verglichen mit den Stämmen, die nach UF oder DUF identifiziert werden konnten, lässt sich folgende Annahme treffen: Sowohl die UF, als auch die DUF entfernen pathogene Stämme und Fäkalindikatoren wie z.B. *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* vollständig.

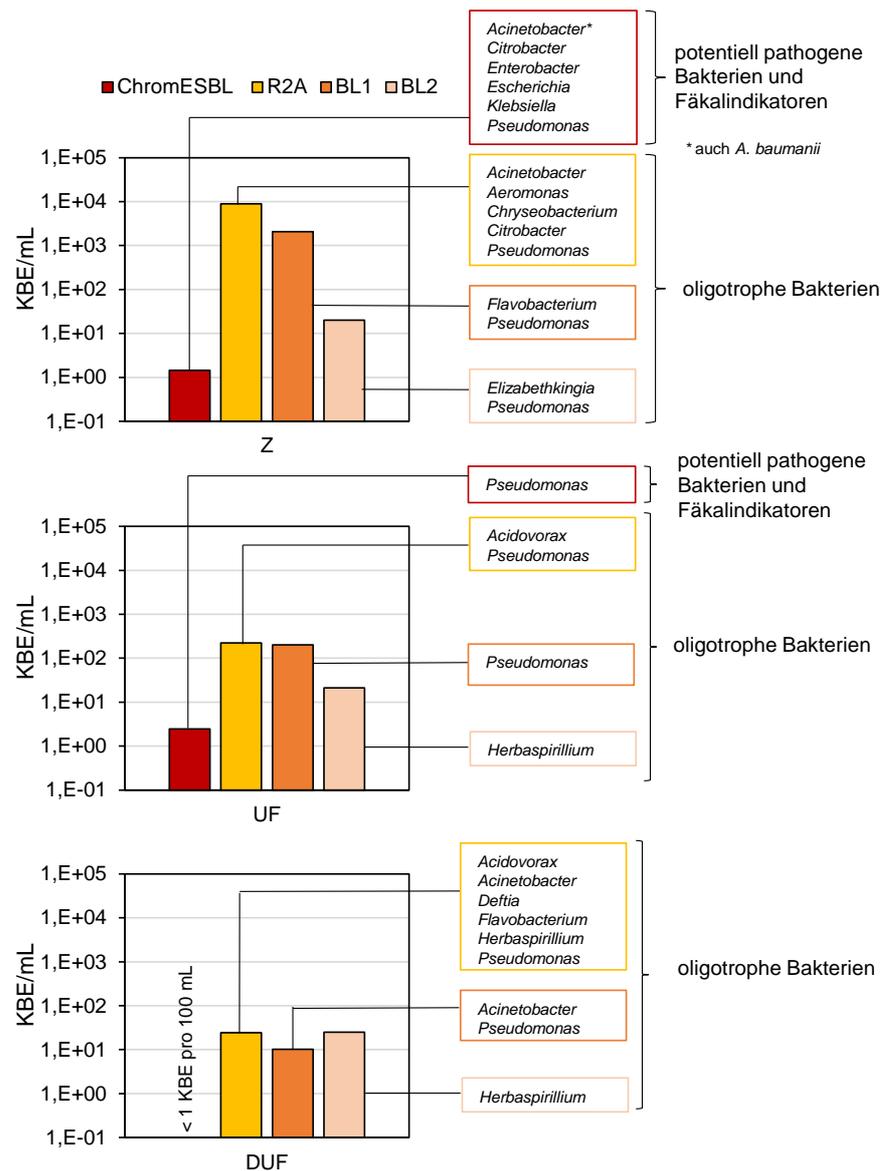


Abbildung 4-37 KBE pro mL der Rohwasserprobe (Z, Alz) und der Filtrate (UF, DUF) nach Inkubation auf chromogenem ESBL Medium und den R2A basierten Medien lt. Kapitel 3.7.2 (R2A, BL1 und BL2). Rechts sind die stichprobenartig identifizierten Bakteriengattungen pro Medium gelistet.

Bei den auf ChromESBL gefundenen Isolaten handelte es sich um *Pseudomonas sp.* mit geringer Sicherheit bei der Identifizierung (Score Value zwischen 1,7 und 1,99). Demnach kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich um Umweltrelevante Pseudomonaden handelt, die sowohl unter oligotrophen, als auch nährstoffreichen Bedingungen wachsen können. Da auf dem BL2 Medium nach UF und DUF lediglich *Herbaspirillum* gefunden wurde, diese Gattung im Zulauf jedoch nicht präsent ist, kann von einer Kontamination des Systems ausgegangen werden. *Herbaspirillum* wurde ursprünglich aus destilliertem Wasser isoliert, und erst 2004 als separate Gattung definiert (vorher *Pseudomonas*, Ding und Yokota 2004), was zusätzlich dafür spricht, dass es sich hier um Bakterien handeln könnte, die sich auch unter den enorm oligotrophen Bedingungen im System ansiedeln und auf dem R2A-basierten Medium dann anwachsen, wenn keine Konkurrenz durch andere Bakterien besteht. Gleiches gilt für die Gattungen *Acinetobacter* und *Pseudomonas*, die in den Filtraten auf BL1 isoliert wurden. Pseudomonaden wurden bereits in anderen Studien mit dem Biofouling von Membranen (z.B. RO Membranen) assoziiert und wiesen auch hier zum Teil Antibiotikaresistenzen auf (Sala-Comorera *et al.* 2016). Die trotz Filtration weiterhin hohe Vielfalt an oligotrophen Bakteriengattungen auf dem Antibiotika-freien R2A Medium sollte für die Evaluation der Filtrationseffizienz nicht berücksichtigt werden. Da

es sich um eine Beprobung des Filtrats im Freien handelt, ist die Einbringung von Bakterien über Luft wahrscheinlich. Da die Isolation von Umweltbakterien auf R2A Medium eine sehr sensitive und nicht-selektive Methode ist, die grundsätzlich zu hohen Koloniezahlen führt, sind für die Risikobewertung die KBE auf den selektiven, Antibiotika-haltigen Medien zu berücksichtigen.

Die Kombination der Daten zu den ARG (PCR-Methoden) und ARB (Kulturverfahren) führte zu dem Schluss, dass die Filtrations-Effizienz der DUF-Membran gegenüber der UF-Membran zu einem verbesserten Rückhalt führt. Durch Identifikation der Bakterien im Permeat konnte sichergestellt werden, dass es sich nicht um Membrandurchbrüche, sondern um Bakterien-Ansiedlungen aufgrund nicht-steriler System-Bedingungen handelte. Die Ergebnisse verdeutlichen die hohe Relevanz von Resistenzen auch unter oligotrophen Bakterien, die sich in Wasseraufbereitungssystemen ansiedeln können. Eine Verbreitung der Resistenzen mit dem Trinkwasser ist dann wahrscheinlich. Deshalb sollte das Vorkommen von ARG und ARB in der Trinkwasseraufbereitung stets durch eine Überprüfung der Behandlungs-Stufen ausgeschlossen werden.

#### **4.3.3 Fazit der Untersuchungen zur Elimination von Resistenzgenen**

Für die Untersuchungen von ARG in der Trinkwasseraufbereitung standen Proben aus der Oberflächenwasser-Aufbereitung in China und Aufbereitungen von Oberflächenwässern nach Bodenpassage und Grundwasseranreicherungen in Deutschland zur Verfügung. Anhand dieser Proben konnte die gute Trinkwasserqualität in Deutschland bestätigt werden. Durch den Nachweis von vereinzelt ARG im Reinwasser nach der Trinkwasseraufbereitung in chinesischen Trinkwasserwerken konnte gezeigt werden, dass die Aufbereitung dort Verbesserungspotential hat. Untersuchungen zum Rückhalt von ARG-Fragmenten mit neuen Membrantechnologien führten zu dem Schluss, dass diese Membranen eine Verbesserung der Reinwasserqualität bezüglich der Elimination von ARG bewirken könnten. Die Einsetzbarkeit dieser sogenannten dichten Ultrafiltrations-Membranen konnte in Pilotstudien bestätigt werden.

## 5 FAZIT

Das zunehmende Risiko einer Infektion mit antibiotikaresistenten Krankheitserregern ist im medizinischen Bereich seit langem bekannt und wird in der Öffentlichkeit in den letzten Jahren verstärkt wahrgenommen. Laut Verbrauchermonitor des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) waren 2021 70 % aller Deutschen bezüglich des Themas Antibiotikaresistenzen beunruhigt (BfR 2018). Öffentlich rechtliche Medien, wie das ZDF, informieren über die Problematik des Eintrags von Antibiotika in Gewässer und die daraus resultierende Entwicklung „gefährlicher Keime“ (Beitrag von November 2019, ZDF 2019). Selbst Pharma-Konzerne wie Pfizer berichten über die brisante Thematik der „stillen Pandemie“ und betonen, dass durch resistente Erreger verursachte „Infektionskrankheiten in den Mittelpunkt unseres Handelns“ gestellt werden müssen (Pfizer 2021).

Aufgrund der fortwährenden Brisanz des Themas, haben sich die Mitgliedsstaaten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) auf einen globalen Aktionsplan für den Kampf gegen Antibiotikaresistenzen verständigt (One Health). Ziel ist es, eine wirksame Behandlung und Vorbeugung bakterieller Infektionen durch effektive und sichere Medikamente auch weiter gewährleisten zu können. Der globale Aktionsplan benennt fünf strategische Ziele, wozu auch das Erhöhen der Aufmerksamkeit und Wissen innerhalb der Bevölkerung zählt. Allerdings sind die Zusammenhänge der Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen sehr komplex und werden von vielen Faktoren beeinflusst. Diese komplexen Zusammenhänge müssen der Öffentlichkeit verständlich kommuniziert werden. Die sachgerechte Kommunikation stellt eine große Herausforderung dar.

Eins der Ziele dieser Arbeit war, die Datenbasis hinsichtlich Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt zu erweitern. Durch die Untersuchung von Oberflächenwässern auf ARG in China und Deutschland mittels qPCR-basierter Methoden, konnte die hohe Relevanz von Resistenzen in der aquatischen Umwelt aber auch in Sedimenten gezeigt werden.

Durch Fraktionierungen von Wasserproben in verschieden große Partikel-assoziierte Fraktionen, bakterielle DNA, Phagen-DNA und frei vorliegende eDNA, konnte gezeigt werden, dass in all diesen Fraktionen ARG nachweisbar sind. Dies ist damit ein Indiz dafür, dass der horizontale Gentransfer zwischen Phagen und Bakterien, sowie die Aufnahme/Abgabe von freien ARG durch Bakterien eine wichtige Rolle bei der Verbreitung von ARG spielen könnte.

Die Etablierung kulturbasierter Verfahren zum Nachweis  $\beta$ -Laktam-resistenter oligotropher Mikroorganismen aus der aquatischen Umwelt konnte weitere Erkenntnisse über die aktuelle Situation in der Distribution von Resistenzen liefern. Oligotrophe Mikroorganismen mit Resistenzen gegen Cephalosporine kommen in deutlich höherer Zahl vor, als entsprechende Bakterien mit einer Unempfindlichkeit gegen die Reserve-AB-Gruppe der Carbapeneme. Dass trotz des geringeren Einsatzes von Carbapenemen in Deutschland in allen untersuchten Oberflächenwässern resistente und insbesondere Carbapenemase-bildende Organismen gefunden werden konnten, ist alarmierend und zeigt, dass Handlungsbedarf besteht.

Da Antibiotikaresistenzen in der Umwelt weit verbreitet sind, ist es naheliegend ARG und ARB in der Trinkwasseraufbereitung zu untersuchen. Aufgrund des hohen Vorkommens der Resistenzen in der Umwelt muss möglichst sichergestellt werden, dass sie nicht ins Trinkwasser-Verteilungsnetz gelangen, wo ein Transfer von Resistenzen auf Pathogene im menschlichen Körper nicht ausgeschlossen werden kann. Es wurden konventionelle Trinkwasseraufbereitungen in chinesischen und deutschen Wasserwerken untersucht und dabei bestätigt, dass das Reinwasser nach einer Aufbereitung in Deutschland frei von ARG ist, in China diese zum Teil jedoch durch konventionelle und reaktive Verfahren nicht ganz eliminiert werden können. Daraus kann geschlossen werden, dass vor allem dort, wo erhöhte Einträge aus Industrie und urbanen Ballungsräumen in ein Trinkwasser-Reservoir (wie den Tai See in der Nähe Shanghais) zu erwarten sind, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die

Detektion resistenter Bakterien im Trinkwasser besteht. Ein standardisiertes Monitoring von sowohl ARG als auch ARB in Trinkwasser-Reservoirs, aber auch in aufbereiteten Wässern wird aus diesem Grund zukünftig immer wahrscheinlicher werden. Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse können hierbei wichtige Grundlagen für die Etablierung solcher möglichen Standardverfahren liefern. Zum Beispiel konnten die Resistenzgene *sul1*, *sul2* und *blaTEM* als besonders häufig in Oberflächenwässern (sowohl in Deutschland, als auch China) nachweisbare ARG identifiziert werden, was sie für ein standardisiertes Monitoring-Konzept qualifizieren könnte.

Durch die Entwicklung einer Long-Amplikon qPCR Methode für u.a. *sul1* und *blaTEM*, bei der das ganze Gen in der qPCR erfasst wird, konnte gezeigt werden, dass reaktive Verfahren, wie UV-Bestrahlung, Chlorung oder Ozonung in der Wasseraufbereitung zu geschädigten DNA-Strängen führen. Diese Schädigungen können mit der konventionellen qPCR (kurze Amplifikate) zum Teil nicht erkannt werden, was zu einer Unterschätzung der Eliminationsleistung führen kann. Da Überschätzungen von ARG-Konzentrationen in aufbereiteten Wässern für eine realistische Risikobewertung zu vermeiden sind, könnte die Anwendung der LA qPCR zu sicheren Ergebnissen führen.

Die Ultra- und Nanofiltration ist eine in der Trinkwasseraufbereitung immer häufiger angewendete Methode, die nachweislich sowohl resistente Bakterien, als auch Resistenzgene entfernen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu sowohl Versuche im Labor- als auch im Pilot-Maßstab durchgeführt. Diese zeigten, dass bereits die Ultrafiltration Resistenzgenfragmente von rund 1000 bp Länge erfolgreich zurückhält. Bei Filtration einer Oberflächenwasser-Probe wurden ARB vollständig zurückgehalten. Erstmals wurde auch eine spezielle Layer-by-Layer Beschichtung, die einen deutlich geringeren Cut-Off ermöglicht, auf den Rückhalt von ARG getestet und dabei festgestellt, dass dadurch sogar kleinste Genfragmente (< 100 bp) zurückgehalten werden können. Diese Methode der Aufbereitung ist demnach vielversprechend hinsichtlich der Minimierung von Antibiotikaresistenzen in der Trinkwasseraufbereitung.

Die in dieser Studie vorgestellten Ergebnisse zeigen deutlich, wie weit ARB und ARG bereits in der aquatischen Umwelt verbreitet sind. Eine standardisierte und regelmäßige Überwachung von Umweltproben ist angezeigt, um die weitere Verbreitung von Antibiotikaresistenzen kritisch zu beobachten.

## 6 AUSBLICK

Der Vergleich von lokalen Resistenzgen-Aufkommen in Deutschland und China konnte das globale Ausmaß der Verbreitung von ARG zeigen. Aufgrund der Covid-19 Pandemie konnten die kulturbasierten Verfahren, sowie die fraktionsbasierten Analysen von ARG im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr auf Proben aus dem Tai See angewendet werden. Da der Tai See als Trinkwasser-Reservoir stärker von industriellen und kommunalen Abwässern beeinflusst ist als die in Deutschland untersuchten Oberflächenwässer, wäre eine Anwendung der etablierten Methoden von großem Interesse, um Unterschiede und Parallelen in der Verbreitung resistenter Bakterien (sowohl Pathogene und Fäkalindikatoren als auch oligotrophe Bakterien) zu untersuchen.

Da sich die Analyse von ganzen ARG mit der LA qPCR nach einem reaktiven Wasseraufbereitungsverfahren im Vergleich zur konventionellen PCR als aussagekräftiger erwies und Überschätzungen der Genkopienzahl vermieden werden können, sollte diese PCR-Methode für weitere ARG etabliert werden. Da vor allem bei der Analyse von Umweltproben Probleme bei der Amplifikation von Genfragmenten > 1000 bp auftraten, muss nach Möglichkeiten gesucht werden, um Inhibitionen während der qPCR zu unterbinden. Reagenzien, die zu einer stabileren Bindung zwischen Polymerase und DNA-Zielstrang führen, oder DNA-Extraktionsmethoden, die Inhibitoren besser entfernen, könnten hierbei vielversprechende Ansätze sein.

Auch die Anwendung der fraktionsbasierten ARG-Untersuchung, vor allem der ARG-Nachweis in der Phagen- und eDNA-Fraktion sollte auf weitere Oberflächenwässer angewendet werden, um zu sehen, ob sich die hohe Relevanz von bestimmten ARG in diesen Fraktionen bestätigt.

Die zugrundeliegenden Daten aus etablierten PCR- und kulturbasierten Verfahren bieten eine gute Grundlage für ein ganzheitliches Monitoring von ARG und ARB in der aquatischen Umwelt und in der Trinkwasseraufbereitung und damit womöglich auch eine verbesserte Risikobewertung. Diese gestaltet sich dennoch weiterhin schwierig. Je nach Art und Pathogenität kann ein Resistenz-tragendes Bakterium zur direkten Gefährdung werden. Auch bei fehlender Virulenz (z.B. bei Umweltbakterien) kann es durch HGT-Prozesse zur Verbreitung der Resistenzen kommen, was eine indirekte Gefährdung darstellt. Insbesondere in der Umwelt sind die ablaufenden Prozesse der ARG-Verbreitung kaum erfassbar. Kombiniert man die Analyse von Resistenzgenen und den entsprechend resistenten Bakterien inklusive deren Identifikation könnten Risiken deutlich umfassender eingeschätzt werden. Die kulturbasierten Verfahren zum Nachweis  $\beta$ -Laktam-resistenter oligotropher Bakterien lassen sich vermutlich gut auf den Nachweis von Umweltbakterien mit Resistenzen gegen andere Antibiotika-Gruppen übertragen, indem dem R2A-Medium andere Antibiotika zugesetzt werden. Auch im Hinblick auf die Einleitung von Maßnahmen zur Reduzierung von ARG können die gewonnenen Daten und etablierten Methoden hilfreich sein, sofern sie langfristig Anwendung finden. Nur durch langjährige Datenerfassung kann die Entwicklung von Resistenzen in der Umwelt wirklich abgebildet werden. Aufgrund der Entwicklung ist außerdem davon auszugehen, dass das Wasser als Reservoir für Antibiotikaresistenzen in den nächsten Jahren weiter in den Fokus der Öffentlichkeit rücken wird. Um Ängsten hinsichtlich der Trinkwasser-Qualitätssicherung vorzubeugen ist eine gute Datenbasis wichtig.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Adelowo, O. O.; Caucci, S.; Banjo, O. A.; Nnanna, O. C.; Awotipe, E. O.; Peters, F. B.; Fagade, O. E.; Berendonk, T. U. (2018): Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing bacteria isolated from hospital wastewaters, rivers and aquaculture sources in Nigeria. *Environmental science and pollution research international* 25 (3), S. 2744–2755. DOI: 10.1007/s11356-017-0686-7.

Ager, K.; Latulippe, D. R.; Zydney, A. L. (2009): Plasmid DNA transmission through charged ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* 344 (1-2), S. 123–128. DOI: 10.1016/j.memsci.2009.07.047.

Ahmed, F.; Lalia, B. S.; Kochkodan, V.; Hilal, N.; Hashaikheh, R. (2016): Electrically conductive polymeric membranes for fouling prevention and detection. A review. *Desalination* 391, S. 1–15. DOI: 10.1016/j.desal.2016.01.030.

Alexander, J. (2017): Mikrobiologische Charakterisierung von anthropogen beeinflussten Wassersystemen und Evaluierung von Abwasserbehandlungsverfahren. Dissertation. Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe.

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, S. 103–112. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.154.

Amarasiri, M.; Sano, D.; Suzuki, S. (2020): Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments. Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 50 (19), S. 2016–2059. DOI: 10.1080/10643389.2019.1692611.

An, X.-L.; Su, J.-Q.; Li, B.; Ouyang, W.-Y.; Zhao, Y.; Chen, Q.-L.; Cui, L.; Chen, H.; Gillings, M. R.; Zhang, T.; Zhu, Y.-G. (2018): Tracking antibiotic resistome during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR. *Environment international* 117, S. 146–153. DOI: 10.1016/j.envint.2018.05.011.

Andersson, D. I.; Hughes, D. (2017): Selection and transmission of antibiotic-resistant bacteria. *Microbiology spectrum* 5 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0013-2016.

Antão, E.-M.; Vincze, S.; Hanke, R.; Klimmek, L.; Suchecka, K.; Lübke-Becker, A.; Wieler, L. H. (2018): Antibiotic resistance, the 3As and the road ahead. *Gut pathogens* 10, S. 52. DOI: 10.1186/s13099-018-0280-7.

Arkhangelsky, E.; Sefi, Y.; Hajaj, B.; Rothenberg, G.; Gitis, V. (2011): Kinetics and mechanism of plasmid DNA penetration through nanopores. *Journal of Membrane Science* 371 (1-2), S. 45–51. DOI: 10.1016/j.memsci.2011.01.014.

Ashbolt, N. J.; Amézquita, A.; Backhaus, T.; Borriello, P.; Brandt, K. K.; Collignon, P.; Coors, A.; Finley, R.; Gaze, W. H.; Heberer, T.; Lawrence, J. R.; Larsson, D. G. J.; McEwen, S. A.; Ryan, J. J.; Schönfeld, J.; Silley, P.; Snape, J. R.; van den Eede, C.; Topp, E. (2013): Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environmental health perspectives* 121 (9), S. 993–1001. DOI: 10.1289/ehp.1206316.

Baker, J. S.; Dudley, L. Y. (1998): Biofouling in membrane systems — A review. *Desalination* 118 (1-3), S. 81–89. DOI: 10.1016/S0011-9164(98)00091-5.

Barancheshme, F.; Munir, M. (2017): Strategies to combat antibiotic resistance in the wastewater treatment plants. *Frontiers in microbiology* 8, S. 2603. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02603.

- Barraud, O.; Baclet, M. C.; Denis, F.; Ploy, M. C. (2010): Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65 (8), S. 1642–1645. DOI: 10.1093/jac/dkq167.
- Bauernfeind, A.; Stemplinger, I.; Jungwirth, R.; Giamarellou, H. (1996): Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1), S. 221–224. DOI: 10.1128/AAC.40.1.221.
- Beck, S. E.; Rodriguez, R. A.; Linden, K. G.; Hargy, T. M.; Larason, T. C.; Wright, H. B. (2014): Wavelength dependent UV inactivation and DNA damage of adenovirus as measured by cell culture infectivity and long range quantitative PCR. *Environmental science & technology* 48 (1), S. 591–598. DOI: 10.1021/es403850b.
- Bellanger, X.; Guilloteau, H.; Bonot, S.; Merlin, C. (2014): Demonstrating plasmid-based horizontal gene transfer in complex environmental matrices. A practical approach for a critical review. *The Science of the total environment* 493, S. 872–882. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.070.
- Bengtsson-Palme, J. (2018): The diversity of uncharacterized antibiotic resistance genes can be predicted from known gene variants-but not always. *Microbiome* 6 (1), S. 1–12. DOI: 10.1186/s40168-018-0508-2.
- Benlikurt, G.; Özpınar, H. (2016): Characterization of ESBL- and MBL- Type Enzymes in Enterobacteriaceae From Wild and Farming Fishes. *International Journal of Food Engineering Research (IJFER)* 2 (3), S. 17–25.
- Berendonk, T. U.; Manaia, C. M.; Merlin, C.; Fatta-Kassinos, D.; Cytryn, E.; Walsh, F.; Bürgmann, H.; Sørum, H.; Norström, M.; Pons, M.-N.; Kreuzinger, N.; Huovinen, P.; Stefani, S.; Schwartz, T.; Kisand, V.; Baquero, F.; Martinez, J. L. (2015): Tackling antibiotic resistance. The environmental framework. *Nature reviews. Microbiology* 13 (5), S. 310–317. DOI: 10.1038/nrmicro3439.
- Berg, G.; Roskot, N.; Smalla, K. (1999): Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* 37 (11), S. 3594–3600. DOI: 10.1128/JCM.37.11.3594-3600.1999.
- Bergeron, S.; Boopathy, R.; Nathaniel, R.; Corbin, A.; LaFleur, G. (2015): Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. *International Biodeterioration & Biodegradation* 102, S. 370–374. DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.04.017.
- Bibbal, D.; Dupouy, V.; Ferré, J. P.; Toutain, P. L.; Fayet, O.; Prère, M. F.; Bousquet-Mélou, A. (2007): Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in Enterobacteriaceae and excretion of blaTEM genes in swine feces. *Applied and environmental microbiology* 73 (15), S. 4785–4790. DOI: 10.1128/AEM.00252-07.
- Bilal, M.; Mehmood, S.; Rasheed, T.; Iqbal, H. M.N. (2020): Antibiotics traces in the aquatic environment. Persistence and adverse environmental impact. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 13 (11), S. 68–74. DOI: 10.1016/j.coesh.2019.11.005.
- Bolton, J. R.; Beck, S. E.; Linden, K. G. (2015): Protocol for the Determination of Fluence (UV Dose) Using A Low-Pressure or Low-Pressure High-Output UV Lamp in Bench-Scale Collimated Beam Ultraviolet Experiments. IUVA News. Online verfügbar unter <https://iuvanews.com/stories/pdf/archives/170101BoltonEtAl2015.pdf>, zuletzt geprüft am 14.12.2018.
- Bonura, T.; Smith, K. C. (1975a): Enzymatic production of deoxyribonucleic acid double-strand breaks after ultraviolet irradiation of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 121 (2), S. 511–517. DOI: 10.1128/jb.121.2.511-517.1975.
- Bonura, T.; Smith, K. C. (1975b): Quantitative evidence for enzymatically-induced DNA double-strand breaks as lethal lesions in UV irradiated pol+ and polA1 strains of *E. coli* K-12. *Photochemistry and Photobiology* 22 (6), S. 243–248. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1975.tb06743.x.

- Boost, M. V.; Ho, J.; Guardabassi, L.; O'Donoghue, M. M. (2012): High meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in intensive pig farms in southern China. *The Veterinary record* 171 (6), 156, 1-2. DOI: 10.1136/vr.100779.
- Borujeni, E. E.; Zydney, A. L. (2014): Membrane fouling during ultrafiltration of plasmid DNA through semipermeable membranes. *Journal of Membrane Science* 450, S. 189–196. DOI: 10.1016/j.memsci.2013.08.032.
- Branz, A.; Levine, M.; Lehmann, L.; Bastable, A.; Ali, S. I.; Kadir, K.; Yates, T.; Bloom, D.; Lantagne, D. (2017): Chlorination of drinking water in emergencies: a review of knowledge to develop recommendations for implementation and research needed. *Waterlines* 36 (1). DOI: 10.3362/1756-3488.207.002.
- Breazeal, M. V. R.; Novak, J. T.; Vikesland, P. J.; Pruden, A. (2013): Effect of wastewater colloids on membrane removal of antibiotic resistance genes. *Water research* 47 (1), S. 130–140. DOI: 10.1016/j.watres.2012.09.044.
- Brown, P. (2019): Impact of antibiotics and particulate matter from wastewater discharges on the abundance of antibiotic resistance genes in river sediments. Dissertation. Karlsruher Institut für Technologie.
- Brown, P. C.; Borowska, E.; Peschke, R.; Schwartz, T.; Horn, H. (2020): Decay of elevated antibiotic resistance genes in natural river sediments after sedimentation of wastewater particles. *The Science of the total environment* 705, S. 135861. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135861.
- Brown-Jaque, M.; Calero-Cáceres, W.; Espinal, P.; Rodríguez-Navarro, J.; Miró, E.; González-López, J. J.; Cornejo, T.; Hurtado, J. C.; Navarro, F.; Muniesa, M. (2018): Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates. *International journal of antimicrobial agents* 51 (3), S. 434–442. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014.
- Brüssow, H.; Canchaya, C.; Hardt, W.-D. (2004): Phages and the evolution of bacterial pathogens. From genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 68 (3), 560-602. DOI: 10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004.
- Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (2019): Umsichtiger Einsatz von Antibiotika bei Hunden und Katzen. Hg. v. Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen. Online verfügbar unter [file:///C:/Users/Lara.Stelmaszyk/Downloads/Leitfaden\\_Kleintier\\_final\\_publ\\_d.pdf](file:///C:/Users/Lara.Stelmaszyk/Downloads/Leitfaden_Kleintier_final_publ_d.pdf), zuletzt geprüft am 12.10.2021.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (2018): BfR-Verbrauchermonitor 02 | 2018. Online verfügbar unter <https://mobil.bfr.bund.de/cm/350/bfr-verbrauchermonitor-02-2018.pdf>, zuletzt geprüft am 22.02.2022.
- Bünning, G.; Hempel, D. C. (1996): Vital-Fluorochromization of microorganisms using 3, 6-diacetylfluorescein to determine damages of cell membranes and loss of metabolic activity by ozonation. *Ozone: Science & Engineering* 18 (2), S. 173–181. DOI: 10.1080/01919519608547336.
- Calero-Cáceres, W.; Melgarejo, A.; Colomer-Lluch, M.; Stoll, C.; Lucena, F.; Jofre, J.; Muniesa, M. (2014): Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environmental science & technology* 48 (13), S. 7602–7611. DOI: 10.1021/es501851s.
- Calero-Cáceres, W.; Muniesa, M. (2016): Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water research* 95, S. 11–18. DOI: 10.1016/j.watres.2016.03.006.
- Calero-Cáceres, W.; Ye, M.; Balcázar, J. L. (2019): Bacteriophages as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in microbiology* 27 (7), S. 570–577. DOI: 10.1016/j.tim.2019.02.008.

- Caltagirone, M.; Nucleo, E.; Spalla, M.; Zara, F.; Novazzi, F.; Marchetti, V. M.; Piazza, A.; Bitar, I.; Cicco, M. de; Paolucci, S.; Pilla, G.; Migliavacca, R.; Pagani, L. (2017): Occurrence of extended spectrum  $\beta$ -lactamases, KPC-Type, and MCR-1.2-producing enterobacteriaceae from wells, river water, and wastewater treatment plants in Oltrepò Pavese area, northern Italy. *Frontiers in microbiology* 8, S. 2232. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02232.
- Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. (1997): Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Analytical chemistry* 69 (23), S. 4751–4760. DOI: 10.1021/ac970888i.
- Chaïbi, E. B.; Sirot, D.; Paul, G.; Labia, R. (1999): Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases. Phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 43 (4), S. 447–458. DOI: 10.1093/jac/43.4.447.
- Chakraborty, R.; Kumar, A.; Bhowal, S. S.; Mandal, A. K.; Tiwary, B. K.; Mukherjee, S. (2013): Diverse gene cassettes in class 1 integrons of facultative oligotrophic bacteria of River Mahananda, West Bengal, India. *PloS one* 8 (8), e71753. DOI: 10.1371/journal.pone.0071753.
- Chang, P. H.; Juhrend, B.; Olson, T. M.; Marrs, C. F.; Wigginton, K. R. (2017): Degradation of extracellular antibiotic resistance genes with UV254 treatment. *Environmental science & technology* 51 (11), S. 6185–6192. DOI: 10.1021/acs.est.7b01120.
- Chaturvedi, P.; Singh, A.; Chowdhary, P.; Pandey, A.; Gupta, P. (2021): Occurrence of emerging sulfonamide resistance (sul1 and sul2) associated with mobile integrons-integrase (intl1 and intl2) in riverine systems. *The Science of the total environment* 751, S. 142217. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142217.
- Chen, H.; Jing, L.; Yao, Z.; Meng, F.; Teng, Y. (2019): Prevalence, source and risk of antibiotic resistance genes in the sediments of Lake Tai (China) deciphered by metagenomic assembly. A comparison with other global lakes. *Environment international* 127, S. 267–275. DOI: 10.1016/j.envint.2019.03.048.
- Chikwendu, C. I. (2011): Detection of blaSHV and blaTEM beta-lactamase genes in multi-resistant Pseudomonas isolates from environmental sources. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5 (15). DOI: 10.5897/AJMR11.149.
- Christou, A.; Agüera, A.; Bayona, J. M.; Cytryn, E.; Fotopoulos, V.; Lambropoulou, D.; Manaia, C. M.; Michael, C.; Revitt, M.; Schröder, P.; Fatta-Kassinos, D. (2017): The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: The knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes - A review. *Water research* 123, S. 448–467. DOI: 10.1016/j.watres.2017.07.004.
- Clark, N. C.; Cooksey, R. C.; Hill, B. C.; Swenson, J. M.; Tenover, F. C. (1993): Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (11), S. 2311–2317. DOI: 10.1128/AAC.37.11.2311.
- Colomer-Lluch, M.; Jofre, J.; Muniesa, M. (2011): Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PloS one* 6 (3), e17549. DOI: 10.1371/journal.pone.0017549.
- Cooper, R. M.; Tsimring, L.; Hasty, J. (2017): Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *eLife*. DOI: 10.7554/eLife.25950.001.
- Corinaldesi, C.; Danovaro, R.; Dell'Anno, A. (2005): Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Applied and environmental microbiology* 71 (1), S. 46–50. DOI: 10.1128/AEM.71.1.46-50.2005.
- Davies, J.; Davies, D. (2010): Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 74 (3), S. 417–433. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.

- Diab, M.; Hamze, M.; Bonnet, R.; Saras, E.; Madec, J.-Y.; Haenni, M. (2018): Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in water sources in Lebanon. *Veterinary microbiology* 217, S. 97–103. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.03.007.
- Ding, L.; Yokota, A. (2004): Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of *Pseudomonas huttiensis*, *Pseudomonas lanceolata*, *Aquaspirillum delicatum* and *Aquaspirillum autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54 (Pt 6), S. 2223–2230. DOI: 10.1099/ij.s.0.02975-0.
- Dixon, M.; Staaks, C.; Fabris, R.; Vimonses, V.; Chow, C. W.K.; Panglisch, S.; van Leeuwen, J. A.; Drikas, M. (2013): The impact of optimised coagulation on membrane fouling for coagulation/ultrafiltration process. *Desalination and Water Treatment* 51 (13-15), S. 2718–2725. DOI: 10.1080/19443994.2012.749367.
- Do, T.; Page, J. E.; Walker, S. (2020): Uncovering the activities, biological roles, and regulation of bacterial cell wall hydrolases and tailoring enzymes. *The Journal of biological chemistry* 295 (10), S. 3347–3361. DOI: 10.1074/jbc.REV119.010155.
- Docquier, J.-D.; Lopizzo, T.; Liberatori, S.; Prenna, M.; Thaller, M. C.; Frère, J.-M.; Rossolini, G. M. (2004): Biochemical characterization of the THIN-B metallo-beta-lactamase of *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (12), S. 4778–4783. DOI: 10.1128/AAC.48.12.4778-4783.2004.
- Dodd, M. C. (2012): Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *Journal of environmental monitoring* 14 (7), S. 1754–1771. DOI: 10.1039/c2em00006g.
- Dortet, L.; Poirel, L.; Nordmann, P. (2014): Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed research international* 2014, S. 249856. DOI: 10.1155/2014/249856.
- Duan, H.; Ma, R.; Xu, X.; Kong, F.; Zhang, S.; Kong, W.; Hao, J.; Shang, L. (2009): Two-decade reconstruction of algal blooms in China's Lake Taihu. *Environmental science & technology* 43 (10), S. 3522–3528. DOI: 10.1021/es8031852.
- Durso, L. M.; Cook, K. L. (2018): One health and antibiotic resistance in agroecosystems. *EcoHealth*. DOI: 10.1007/s10393-018-1324-7.
- DVGW W 202 Technische Regel - Arbeitsblatt, März 2010: Arbeitsblatt DVGW W 202 (A) Technische Regeln Wasseraufbereitung (TRWA) - Planung, Bau, Betrieb und Instandhaltung von Anlagen zur Trinkwasseraufbereitung.
- DVGW W 225 Technische Regel - Arbeitsblatt, Juni 2015: Arbeitsblatt DVGW W 225 (A) Ozon in der Trinkwasseraufbereitung.
- DVGW W 290 Technische Regel - Arbeitsblatt, Mai 2018: Arbeitsblatt DVGW W 290 Trinkwasserdesinfektion; Einsatz.
- DVGW W 217 Technische Regel - Arbeitsblatt, Mai 2021: Arbeitsblatt DVGW W 217 (A) Einsatz von Flockung in der Wasseraufbereitung.
- DVGW W 239 Technische Regel - Arbeitsblatt, Oktober 2021: Arbeitsblatt DVGW W 239 Einsatz von Aktivkohle zur Entfernung organischer Stoffe bei der Trinkwasseraufbereitung.
- Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H.; Stackebrandt, E. (2006): The Prokaryotes. Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. New York, NY: Springer-Verlag. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30746-X>.

- eawag (2021): Antibiotikaresistenzen als Umweltkontamination. Online verfügbar unter <https://www.eawag.ch/abteilung/surf/projekte/antibiotikaresistenzen/>, zuletzt geprüft am 28.10.2021.
- Ellison, M. J.; Childs, J. D. (1981): Pyrimidine dimers induced in *Escherichia coli* DNA by ultraviolet radiation present in sunlight. *Photochem Photobiol* 34 (4), S. 465–469. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1981.tb09026.x.
- Fadhillah, F.; Zaidi, S.M.J.; Khan, Z.; Khaled, M. M.; Rahman, F.; Hammond, P. T. (2013): Development of polyelectrolyte multilayer thin film composite membrane for water desalination application. *Desalination* 318, S. 19–24. DOI: 10.1016/j.desal.2013.03.011.
- Faldynova, M.; Pravcova, M.; Sisak, F.; Havlickova, H.; Kolackova, I.; Cizek, A.; Karpiskova, R.; Rychlik, I. (2003): Evolution of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains isolated in the Czech Republic between 1984 and 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (6), S. 2002–2005. DOI: 10.1128/AAC.47.6.2002-2005.2003.
- Findlay, J.; Hamouda, A.; Dancer, S. J.; Amyes, S. G. B. (2012): Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European society of clinical microbiology and Infectious Diseases* 18 (2), S. 140–146. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03515.x.
- Finley, R. L.; Collignon, P.; Larsson, D. G. J.; McEwen, S. A.; Li, X.-Z.; Gaze, W. H.; Reid-Smith, R.; Timinouni, M.; Graham, D. W.; Topp, E. (2013): The scourge of antibiotic resistance. The important role of the environment. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 57 (5), S. 704–710. DOI: 10.1093/cid/cit355.
- Flemming, H.-C. (2002): Biofouling in water systems-cases, causes and countermeasures. *Applied microbiology and biotechnology* 59 (6), S. 629–640. DOI: 10.1007/s00253-002-1066-9.
- Gan, T.; Shu, G.; Fu, H.; Yan, Q.; Zhang, W.; Tang, H.; Yin, L.; Zhao, L.; Lin, J. (2021): Antimicrobial resistance and genotyping of *Staphylococcus aureus* obtained from food animals in Sichuan Province, China. *BMC veterinary research* 17 (1), S. 177. DOI: 10.1186/s12917-021-02884-z.
- Garcia-Armisen, T.; Anzil, A.; Cornelis, P.; Chevreuil, M.; Servais, P. (2013): Identification of antimicrobial resistant bacteria in rivers. Insights into the cultivation bias. *Water research* 47 (14), S. 4938–4947. DOI: 10.1016/j.watres.2013.05.036.
- Gautam, B. (2021): Microbiological quality assessment (including antibiogram and threat assessment) of bottled water. *Food science & nutrition* 9 (4), S. 1980–1988. DOI: 10.1002/fsn3.2164.
- Geesink, P.; Tyc, O.; Küsel, K.; Taubert, M.; van de Velde, C.; Kumar, S.; Garbeva, P. (2018): Growth promotion and inhibition induced by interactions of groundwater bacteria. *FEMS microbiology ecology* 94 (11), S. 1–8. DOI: 10.1093/femsec/fiy164.
- Gekenidis, M.-T.; Qi, W.; Hummerjohann, J.; Zbinden, R.; Walsh, F.; Drissner, D. (2018): Antibiotic-resistant indicator bacteria in irrigation water. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *PLoS one* 13 (11), e0207857. DOI: 10.1371/journal.pone.0207857.
- GERMAP (2015): GERMAP 2015 Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Unter Mitarbeit von Winfried Kern, Greif, Gerhard, Georg Peters und Uwe Rösler. Online verfügbar unter [https://www.bvl.bund.de/DE/Arbeitsbereiche/05\\_Tierarzneimittel/01\\_Aufgaben/05\\_AufgAntibiotikaResistenz/04\\_GERMAP/GERMAP\\_node.html](https://www.bvl.bund.de/DE/Arbeitsbereiche/05_Tierarzneimittel/01_Aufgaben/05_AufgAntibiotikaResistenz/04_GERMAP/GERMAP_node.html), zuletzt geprüft am 24.02.2022.
- Gevers, D.; Danielsen, M.; Huys, G.; Swings, J. (2003): Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and environmental microbiology* 69 (2), S. 1270–1275. DOI: 10.1128/aem.69.2.1270-1275.2003.

Ghernaout, D. (2017): Water treatment chlorination: An updated mechanistic insight review. *Chemistry Research Journal* 2, S. 125–138.

Girlich, D.; Groperrin, V.; Naas, T.; Dortet, L. (2019): CHROMagar™ ESBL/mSuperCARBA bi-plate medium for detection of ESBL- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from spiked stools. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 95 (2), S. 107–112. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.05.002.

Glupczynski, Y.; Berhin, C.; Bauraing, C.; Bogaerts, P. (2007): Evaluation of a new selective chromogenic agar medium for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 45 (2), S. 501–505. DOI: 10.1128/JCM.02221-06.

Gregurec, D.; Olszyna, M.; Politakos, N.; Yate, L.; Dahne, L.; Moya, S. E. (2015): Stability of polyelectrolyte multilayers in oxidizing media. A critical issue for the development of multilayer based membranes for nanofiltration. *Colloid and Polymer Science* 293 (2), S. 381–388. DOI: 10.1007/s00396-014-3423-5.

Gudeta, D. D.; Bortolaia, V.; Amos, G.; Wellington, E. M. H.; Brandt, K. K.; Poirel, L.; Nielsen, J. B.; Westh, H.; Guardabassi, L. (2016): The soil microbiota harbors a diversity of carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases of potential clinical relevance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (1), S. 151–160. DOI: 10.1128/AAC.01424-15.

Guo, X.; Li, J.; Yang, F.; Yang, J.; Yin, D. (2014): Prevalence of sulfonamide and tetracycline resistance genes in drinking water treatment plants in the Yangtze River Delta, China. *The Science of the total environment* 493, S. 626–631. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.035.

Haas, C. N.; Engelbrecht, R. S. (1980): Physiological alterations of vegetative microorganisms resulting from chlorination. *Water Pollution Control Federation* 52 (7), S. 1976–1989.

Haberecht, H. B.; Nealon, N. J.; Gilliland, J. R.; Holder, A. V.; Runyan, C.; Opiel, R. C.; Ibrahim, H. M.; Mueller, L.; Schrupp, F.; Vilchez, S.; Antony, L.; Scaria, J.; Ryan, E. P. (2019): Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from environmental waters in northern Colorado. *Journal of environmental and public health* 2019, S. 3862949. DOI: 10.1155/2019/3862949.

Hamza, I. A.; Jurzik, L.; Überla, K.; Wilhelm, M. (2011): Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International journal of hygiene and environmental health* 214 (6), S. 424–436. DOI: 10.1016/j.ijheh.2011.07.014.

Hao, H.; Shi, D.-Y.; Yang, D.; Yang, Z.-W.; Qiu, Z.-G.; Liu, W.-L.; Shen, Z.-Q.; Yin, J.; Wang, H.-R.; Li, J.-W.; Wang, H.; Jin, M. (2019): Profiling of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in tap water. *Journal of hazardous materials* 365, S. 340–345. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.11.004.

Haramoto, E.; Katayama, H.; Oguma, K.; Ohgaki, S. (2005): Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Applied and environmental microbiology* 71 (5), S. 2403–2411. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2403-2411.2005.

Hauck, R.; Wallmann, J.; Heberer, T. (2014): Antibakterielle Resistenzen in Deutschland. Lage, Ursachen und Gegenmaßnahmen. *J. Verbr. Lebensm.* 9 (1), S. 71–79. DOI: 10.1007/s00003-013-0858-4.

Hayes, M. M.; MacIntyre, A. M.; Allen, C. (2017): Complete Genome Sequences of the Plant Pathogens *Ralstonia solanacearum* Type Strain K60 and *R. solanacearum* Race 3 Biovar 2 Strain UW551. *Genome announcements* 5 (40). DOI: 10.1128/genomeA.01088-17.

He, Y.; Yuan, Q.; Mathieu, J.; Stadler, L.; Senehi, N.; Sun, R.; Alvarez, P. J. J. (2020): Antibiotic resistance genes from livestock waste. Occurrence, dissemination, and treatment. *npj Clean Water* 3 (1), S. 1216. DOI: 10.1038/s41545-020-0051-0.

- 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 (1), S. 12843. DOI: 10.1038/s41598-019-49263-1.
- Hembach, N.; Schmid, F.; Alexander, J.; Hiller, C.; Rogall, E. T.; 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, S. 1282. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01282.
- Hendrickson, E. R.; Payne, J. A.; Young, R. M.; Starr, M. G.; Perry, M. P.; Fahnestock, S.; Ellis, D. E.; Ebersole, R. C. (2002): Molecular analysis of Dehalococcoides 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Applied and environmental microbiology* 68 (2), S. 485–495. DOI: 10.1128/aem.68.2.485-495.2002.
- Hercules, D. M. (2008): Franz Hillenkamp and Jasna Peter-Katalinic (Eds.). MALDI MS. A practical guide to instrumentation, methods and applications. *Anal Bioanal Chem* 392 (4), S. 565–566. DOI: 10.1007/s00216-008-2090-0.
- Herrera, J. J. R.; Cabo, M. L.; González, A.; Pazos, I.; Pastoriza, L. (2007): Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food microbiology* 24 (6), S. 585–591. DOI: 10.1016/j.fm.2007.01.001.
- Ho, J.; Seidel, M.; Niessner, R.; Eggers, J.; Tiehm, A. (2016): Long amplicon (LA)-qPCR for the discrimination of infectious and noninfectious phix174 bacteriophages after UV inactivation. *Water research* 103, S. 141–148. DOI: 10.1016/j.watres.2016.07.032.
- Hooban, B.; Joyce, A.; Fitzhenry, K.; Chique, C.; Morris, D. (2020): The role of the natural aquatic environment in the dissemination of extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase encoding genes. A scoping review. *Water research* 180, S. 115880. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115880.
- Hoslett, J.; Massara, T. M.; Malamis, S.; Ahmad, D.; van den Boogaert, I.; Katsou, E.; Ahmad, B.; Ghazal, H.; Simons, S.; Wrobel, L.; Jouhara, H. (2018): Surface water filtration using granular media and membranes. A review. *The Science of the total environment* 639, S. 1268–1282. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.247.
- Hu, X.-L.; Bao, Y.-F.; Hu, J.-J.; Liu, Y.-Y.; Yin, D.-Q. (2017): Occurrence of 25 pharmaceuticals in Taihu Lake and their removal from two urban drinking water treatment plants and a constructed wetland. *Environmental science and pollution research international* 24 (17), S. 14889–14902. DOI: 10.1007/s11356-017-8830-y.
- Hu, Y.; Jiang, L.; Zhang, T.; Jin, L.; Han, Q.; Zhang, D.; Lin, K.; Cui, C. (2018): Occurrence and removal of sulfonamide antibiotics and antibiotic resistance genes in conventional and advanced drinking water treatment processes. *Journal of hazardous materials* 360, S. 364–372. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.08.012.
- Hu, Y.; Zhang, T.; Jiang, L.; Luo, Y.; Yao, S.; Zhang, D.; Lin, K.; Cui, C. (2019): Occurrence and reduction of antibiotic resistance genes in conventional and advanced drinking water treatment processes. *The Science of the total environment* 669, S. 777–784. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.143.
- Huang, C.; Zhang, M.; Zou, J.; Zhu, A.-X.; Chen, X.; Mi, Y.; Wang, Y.; Yang, H.; Li, Y. (2015): Changes in land use, climate and the environment during a period of rapid economic development in Jiangsu Province, China. *The Science of the total environment* 536, S. 173–181. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.07.014.

- Huang, Z.; Zhao, W.; Xu, T.; Zheng, B.; Yin, D. (2019): Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the water and sediments of Qingcaosha Reservoir, Shanghai, China. *Environ Sci Eur* 31 (1), S. 1195. DOI: 10.1186/s12302-019-0265-2.
- Hubbard, L. E.; Givens, C. E.; Griffin, D. W.; Iwanowicz, L. R.; Meyer, M. T.; Kolpin, D. W. (2020): Poultry litter as potential source of pathogens and other contaminants in groundwater and surface water proximal to large-scale confined poultry feeding operations. *Science of The Total Environment* 735, S. 139459. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139459.
- Ibáñez-de-Aldecoa, A. L.; Zafra, O.; González-Pastor, J. E. (2017): Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. *Frontiers in microbiology* 8, S. 1390. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01390.
- Ishigami, T.; Amano, K.; Fujii, A.; Ohmukai, Y.; Kamio, E.; Maruyama, T.; Matsuyama, H. (2012): Fouling reduction of reverse osmosis membrane by surface modification via layer-by-layer assembly. *Separation and Purification Technology* 99, S. 1–7. DOI: 10.1016/j.seppur.2012.08.002.
- Ivančev-Tumbas, I. (2014): The fate and importance of organics in drinking water treatment. A review. *Environmental science and pollution research international* 21 (20), S. 11794–11810. DOI: 10.1007/s11356-014-2894-8.
- Jia, S.; Shi, P.; Hu, Q.; Li, B.; Zhang, T.; Zhang, X.-X. (2015): Bacterial Community Shift Drives Antibiotic Resistance Promotion during Drinking Water Chlorination. *Environmental science & technology* 49 (20), S. 12271–12279. DOI: 10.1021/acs.est.5b03521.
- Jiang, L.; Hu, X.; Xu, T.; Zhang, H.; Sheng, D.; Yin, D. (2013): Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *The Science of the total environment* 458-460, S. 267–272. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.038.
- Jiang, L.; Hu, X.; Yin, D.; Zhang, H.; Yu, Z. (2011): Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere* 82 (6), S. 822–828. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.11.028.
- Jutkina, J.; Rutgersson, C.; Flach, C.-F.; Joakim Larsson, D. G. (2016): An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance. *The Science of the total environment* 548-549, S. 131–138. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.044.
- Kämpfer, P.; Matthews, H.; Glaeser, S. P.; Martin, K.; Lodders, N.; Faye, I. (2011): *Elizabethkingia anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Anopheles gambiae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61 (Pt 11), S. 2670–2675. DOI: 10.1099/ij.s.0.026393-0.
- Kerdi, S.; Qamar, A.; Vrouwenvelder, J. S.; Ghaffour, N. (2018): Fouling resilient perforated feed spacers for membrane filtration. *Water research* 140, S. 211–219. DOI: 10.1016/j.watres.2018.04.049.
- Kern, W. V.; Fellhauer, M.; Hug, M.; Hoppe-Tichy, T.; Först, G.; Steib-Bauert, M.; With, K. de (2015): Antibiotika-Anwendung 2012/13 in 109 deutschen Akutkrankenhäusern. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 140 (23), e237-46. DOI: 10.1055/s-0041-105938.
- Kern, W. V.; Fellhauer, M.; With, K. de (2019): ADKA-if-DGI Antiinfektiva-Surveillance. 11. Krankenhausvergleichs-Report. Online verfügbar unter <https://www.antiinfektiva-surveillance.de/43-0-Ergebnisse.html>, zuletzt geprüft am 24.08.2021.
- Khan, S.; Knapp, C. W.; Beattie, T. K. (2016): Antibiotic Resistant Bacteria Found in Municipal Drinking Water. *Environ. Process.* 3 (3), S. 541–552. DOI: 10.1007/s40710-016-0149-z.
- King, L.; Tong, J. (1994): Hochwasser im Yangtze-Delta: Ursachenanalyse in einem deutsch-chinesischen Projekt. *Spiegel der Forschung* 11 (2), S. 2–8.

- Knapp, C. W.; Dolfing, J.; Ehlert, P. A. I.; Graham, D. W. (2010): Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental science & technology* 44 (2), S. 580–587. DOI: 10.1021/es901221x.
- Korzeniewska, E.; Korzeniewska, A.; Harnisz, M. (2013): Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and environmental safety* 91, S. 96–102. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.014.
- Kueppers, S. (2019): Fostering water treatment in eutrophic areas: Innovative water quality monitoring, and technologies mitigating taste & odor problems demonstrated at Tai Hu. 12. Aufl.: Springer.
- Kukutla, P.; Lindberg, B. G.; Pei, D.; Rayl, M.; Yu, W.; Steritz, M.; Faye, I.; Xu, J. (2014): Insights from the genome annotation of *Elizabethkingia anophelis* from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PLoS one* 9 (5), e97715. DOI: 10.1371/journal.pone.0097715.
- Kumar, A.; Chordia, N. (2015): In silico PCR primer designing and validation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1275, S. 143–151. DOI: 10.1007/978-1-4939-2365-6\_10.
- Kümmerer, K. (2009): Antibiotics in the aquatic environment-a review-part II. *Chemosphere* 75 (4), S. 435–441. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.006.
- Kurpiel, P. M.; Hanson, N. D. (2011): Association of IS5 with divergent tandem *bla*CMY-2 genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 66 (8), S. 1734–1738. DOI: 10.1093/jac/dkr212.
- Lamba, M.; Sreekrishnan, T. R.; Ahammad, S. Z. (2020): Sewage mediated transfer of antibiotic resistance to River Yamuna in Delhi, India. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8 (1), S. 102088. DOI: 10.1016/j.jece.2017.12.041.
- Langlais, B.; Reckhow, D. A.; Brink, D. R. (1991): Ozone in water treatment. Application and Engineering. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Larsson, D. G. J.; Andremon, A.; Bengtsson-Palme, J.; Brandt, K. K.; Roda Husman, A. M. de; Fagerstedt, P.; Fick, J.; Flach, C.-F.; Gaze, W. H.; Kuroda, M.; Kvint, K.; Laxminarayan, R.; Manaia, C. M.; Nielsen, K. M.; Plant, L.; Ploy, M.-C.; Segovia, C.; Simonet, P.; Smalla, K.; Snape, J.; Topp, E.; van Hengel, A. J.; Verner-Jeffreys, D. W.; Virta, M. P. J.; Wellington, E. M.; Wernersson, A.-S. (2018): Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment international* 117, S. 132–138. DOI: 10.1016/j.envint.2018.04.041.
- Latulippe, D. R.; Ager, K.; Zydney, A. L. (2007): Flux-dependent transmission of supercoiled plasmid DNA through ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* 294 (1-2), S. 169–177. DOI: 10.1016/j.memsci.2007.02.033.
- Le, T.-H.; Ng, C.; Tran, N. H.; Chen, H.; Gin, K. Y.-H. (2018): Removal of antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in municipal wastewater by membrane bioreactor systems. *Water research* 145, S. 498–508. DOI: 10.1016/j.watres.2018.08.060.
- Lekunberri, I.; Villagrasa, M.; Balcázar, J. L.; Borrego, C. M. (2017): Contribution of bacteriophage and plasmid DNA to the mobilization of antibiotic resistance genes in a river receiving treated wastewater discharges. *The Science of the total environment* 601-602, S. 206–209.
- Lerminiaux, N. A.; Cameron, A. D. S. (2019): Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian journal of microbiology* 65 (1), S. 34–44. DOI: 10.1139/cjm-2018-0275.
- Li, D.; Gu, A. Z. (2019): Antimicrobial resistance. A new threat from disinfection byproducts and disinfection of drinking water? *Current Opinion in Environmental Science & Health* 7, S. 83–91. DOI: 10.1016/j.coesh.2018.12.003.

- Li, J.; Liu, S.; Fu, J.; Yin, J.; Zhao, J.; Zhong, C.; Cao, G. (2019a): Co-Occurrence of Colistin and Meropenem Resistance Determinants in a *Stenotrophomonas* Strain Isolated from Sewage Water. *Microbial drug resistance (Larchmont, N. Y.)* 25 (3), S. 317–325. DOI: 10.1089/mdr.2018.0418.
- Li, L.-G.; Huang, Q.; Yin, X.; Zhang, T. (2020): Source tracking of antibiotic resistance genes in the environment - Challenges, progress, and prospects. *Water research* 185, S. 116127. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116127.
- Li, N.; Sheng, G.-P.; Lu, Y.-Z.; Zeng, R. J.; Yu, H.-Q. (2017): Removal of antibiotic resistance genes from wastewater treatment plant effluent by coagulation. *Water research* 111, S. 204–212. DOI: 10.1016/j.watres.2017.01.010.
- Li, T.; Zhang, Y.; Gui, B.; Gao, K.; Zhao, Q.; Qu, R.; Liu, T.; Hoffmann, M.; Staaks, C.; Dong, B. (2019b): Application of coagulation-ultrafiltration-nanofiltration in a pilot study for Tai Lake water treatment. *Water environment research: a research publication of the Water Environment Federation*. DOI: 10.1002/wer.1247.
- Li, Y.; Zhang, X.; Wang, C.; Hu, Y.; Niu, X.; Pei, D.; He, Z.; Bi, Y. (2015): Characterization by phenotypic and genotypic methods of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *Molecular medicine reports* 11 (1), S. 494–498. DOI: 10.3892/mmr.2014.2685.
- Li, Y.; Zhou, S.; Jia, Z.; Ge, L.; Mei, L.; Sui, X.; Wang, X.; Li, B.; Wang, J.; Wu, S. (2018): Influence of Industrialization and Environmental Protection on Environmental Pollution. A Case Study of Taihu Lake, China. *International journal of environmental research and public health* 15 (12). DOI: 10.3390/ijerph15122628.
- Liang, Z.; Keeley, A. (2013): Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples. *Environmental science & technology* 47 (16), S. 9324–9331. DOI: 10.1021/es401342b.
- Lin, W.; Zhang, M.; Zhang, S.; Yu, X. (2016): Can chlorination co-select antibiotic-resistance genes? *Chemosphere* 156, S. 412–419. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.139.
- Lindgrün GmbH (2017): Einführung der Antibiotikaklassen/-wirkstoffe und Resistenzentwicklung. Online verfügbar unter <http://www.antibiotika-wissen.de/>, zuletzt geprüft am 21.12.2020.
- Lipp, P.; Sacher, F.; Baldauf, G. (2012): Removal of organic micro-pollutants during drinking water treatment by nanofiltration and reverse osmosis. *Desalination and Water Treatment* 13 (1-3), S. 226–237. DOI: 10.5004/dwt.2010.1063.
- Liu, H.; Xu, X.; Lin, Z.; Zhang, M.; Mi, Y.; Huang, C.; Yang, H. (2016): Climatic and human impacts on quasi-periodic and abrupt changes of sedimentation rate at multiple time scales in Lake Taihu, China. *Journal of Hydrology* 543 (2), S. 739–748. DOI: 10.1016/j.jhydrol.2016.10.046.
- Liu, S.-S.; Qu, H.-M.; Yang, D.; Hu, H.; Liu, W.-L.; Qiu, Z.-G.; Hou, A.-M.; Guo, J.; Li, J.-W.; Shen, Z.-Q.; Jin, M. (2018): Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant. *Water research* 136, S. 131–136. DOI: 10.1016/j.watres.2018.02.036.
- Liu, X.; Steele, J. C.; Meng, X.-Z. (2017): Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture. A review. *Environmental pollution* 223, S. 161–169. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.01.003.
- Manaia, C. M.; Rocha, J.; Scaccia, N.; Marano, R.; Radu, E.; Biancullo, F.; Cerqueira, F.; Fortunato, G.; Iakovides, I. C.; Zammit, I.; Kampouris, I.; Vaz-Moreira, I.; Nunes, O. C. (2018): Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment international* 115, S. 312–324. DOI: 10.1016/j.envint.2018.03.044.

- Mao, D.; Luo, Y.; Mathieu, J.; Wang, Q.; Feng, L.; Mu, Q.; Feng, C.; Alvarez, P. J. J. (2014): Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation. *Environmental science & technology* 48 (1), S. 71–78. DOI: 10.1021/es404280v.
- Maynard, C.; Fairbrother, J. M.; Bekal, S.; Sanschagrín, F.; Levesque, R. C.; Brousseau, R.; Masson, L.; Larivière, S.; Harel, J. (2003): Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (10), S. 3214–3221. DOI: 10.1128/aac.47.10.3214-3221.2003.
- Mazel, D. (2006): Integrons. Agents of bacterial evolution. *Nature reviews. Microbiology* 4 (8), S. 608–620. DOI: 10.1038/nrmicro1462.
- McKinney, C. W.; Pruden, A. (2012): Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environmental science & technology* 46 (24), S. 13393–13400. DOI: 10.1021/es303652q.
- McLandsborough, L.; Rodríguez, A.; Pérez-Conesa, D.; Weiss, J. (2006): Biofilms. At the Interface between Biophysics and Microbiology. *Food Biophysics* 1 (2), S. 94–114. DOI: 10.1007/s11483-005-9004-x.
- Merlin, C.; Bonot, S.; Courtois, S.; Block, J.-C. (2011): Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in the microbial communities of wastewater sludge microcosms. *Water research* 45 (9), S. 2897–2905. DOI: 10.1016/j.watres.2011.03.002.
- Michael, I.; Rizzo, L.; McArdell, C. S.; Manaia, C. M.; 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 research* 47 (3), S. 957–995. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.027.
- Mills, M. C.; Lee, J. (2019): The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment. Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 255 (Pt 1), S. 113143. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113143.
- Ming Chew, C.; David Ng, K. M.; Richard Ooi, H. H.; Ismail, W. M. Z. W. (2015): Malaysia's largest river bank filtration and ultrafiltration systems for municipal drinking water production. *Water Practice and Technology* 10 (1), S. 59–65. DOI: 10.2166/wpt.2015.008.
- Mo, W. Y.; Chen, Z.; Leung, H. M.; Leung, A. O. W. (2017): Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environmental science and pollution research international* 24 (10), S. 8978–8989. DOI: 10.1007/s11356-015-5607-z.
- Monteiro, J.; Widen, R. H.; Pignatari, A. C. C.; Kubasek, C.; Silbert, S. (2012): Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67 (4), S. 906–909. DOI: 10.1093/jac/dkr563.
- Müller, H.; Sib, E.; Gajdiss, M.; Klanke, U.; Lenz-Plet, F.; Barabasch, V.; Albert, C.; Schallenberg, A.; Timm, C.; Zacharias, N.; Schmithausen, R. M.; Engelhart, S.; Exner, M.; Parcina, M.; Schreiber, C.; Bierbaum, G. (2018): Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS microbiology ecology* 94 (5). DOI: 10.1093/femsec/fiy057.
- Muniesa, M.; Blanch, A. R.; Lucena, F.; Jofre, J. (2005): Bacteriophages may bias outcome of bacterial enrichment cultures. *Applied and environmental microbiology* 71 (8), S. 4269–4275. DOI: 10.1128/AEM.71.8.4269-4275.2005.
- Munita, J. M.; Arias, C. A. (2016): Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum* 4 (2), S. 1–37. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Muyzer, G.; Waal, E. C. de; Uitterlinden, A. G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding

for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 59 (3), S. 695–700. DOI: 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.

Naas, T.; Ergani, A.; Carrër, A.; Nordmann, P. (2011): Real-time PCR for detection of NDM-1 carbapenemase genes from spiked stool samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (9), S. 4038–4043. DOI: 10.1128/AAC.01734-10.

Nagler, M.; Insam, H.; Pietramellara, G.; Ascher-Jenuß, J. (2018): Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications. *Applied microbiology and biotechnology* 102 (15), S. 6343–6356. DOI: 10.1007/s00253-018-9120-4.

Naiemi, N. A.; Murk, J. L.; Savelkoul, P. H. M.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J.; Debets-Ossenkopp, Y. J. (2009): Extended-spectrum beta-lactamases screening agar with AmpC inhibition. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 28 (8), S. 989–990. DOI: 10.1007/s10096-009-0714-8.

Narciso-da-Rocha, C.; Manaia, C. M. (2016): Multidrug resistance phenotypes are widespread over different bacterial taxonomic groups thriving in surface water. *The Science of the total environment* 563-564, S. 1–9. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.062.

Nielsen, K. M.; Johnsen, P. J.; Bensasson, D.; Daffonchio, D. (2007): Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental biosafety research* 6 (1-2), S. 37–53. DOI: 10.1051/ebr:2007031.

Niestroj-Pahl, R.; Stelmaszyk, L.; ElSherbiny, I. M. A.; Abuelgasim, H.; Krug, M.; Staaks, C.; Birkholz, G.; Horn, H.; Li, T.; Dong, B.; Dähne, L.; Tiehm, A.; Panglisch, S. (2020): Performance of Layer-by-Layer-Modified Multibore® Ultrafiltration Capillary Membranes for Salt Retention and Removal of Antibiotic Resistance Genes. *Membranes* 10 (398). DOI: 10.3390/membranes10120398.

Nqombolo, A.; Mpupa, A.; Moutloali, R. M.; Nomngongo, P. N. (2018): Wastewater Treatment Using Membrane Technology. In: Taner Yonar (Hg.): *Wastewater and Water Quality: InTech*.

Odenthal, S.; Akineden, Ö.; Usleber, E. (2016): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in bulk tank milk from German dairy farms. *International journal of food microbiology* 238, S. 72–78. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.036.

Oh, H.; Lee, J.; Kim, K.; Kim, J.; Choung, Y.; Park, J. (2009): A novel laboratory cultivation method to examine antibiotic-resistance-related microbial risks in urban water environments. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* 59 (2), S. 347–352. DOI: 10.2166/wst.2009.857.

Oh, W. T.; Giri, S. S.; Yun, S.; Kim, H. J.; Kim, S. G.; Kim, S. W.; Kang, J. W.; Han, S. J.; Kwon, J.; Jun, J. W.; Park, S. C. (2019): *Janthinobacterium lividum* as an emerging pathogenic bacterium affecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fisheries in Korea. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 8 (3). DOI: 10.3390/pathogens8030146.

Oliveira, W. K.; Ávila, H. L.; Tadra, M. Z.; Cardoso, R. L.; Fadel-Pichet, C. M. T.; Souza, E. M. de; Oliveira Pedrosa, F. de; Faoro, H. (2021): High genomic identity between clinical and environmental strains of *Herbaspirillum frisingense* suggests pre-adaptation to different hosts and intrinsic resistance to multiple drugs. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 10 (11). DOI: 10.3390/antibiotics10111409.

Oliver, A.; Pérez-Vázquez, M.; Martínez-Ferrer, M.; Baquero, F.; Rafael, L. de; Cantón, R. (1999): Ampicillin-sulbactam and amoxicillin-clavulanate susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates with different beta-lactam resistance phenotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (4), S. 862–867. DOI: 10.1128/AAC.43.4.862.

O'Neill, J. (2014): Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance Chaired by Jim O'Neill. Online verfügbar unter [amr-review.org](http://amr-review.org), zuletzt geprüft am 19.10.2020.

Paltrinieri, L.; Remmen, K.; Müller, B.; Chu, L.; Köser, J.; Wintgens, T.; Wessling, M.; Smet, L. C.P.M. de; Sudhölter, E. J.R. (2019): Improved phosphoric acid recovery from sewage sludge ash using layer-by-layer modified membranes. *Journal of Membrane Science* 587, S. 117162. DOI: 10.1016/j.memsci.2019.06.002.

Pantosti, A.; Sanchini, A.; Monaco, M. (2007): Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future microbiology* 2 (3), S. 323–334. DOI: 10.2217/17460913.2.3.323.

Patton, W.; Bacon, V.; Duffield, A. M.; Halpern, B.; Hoyano, Y.; Pereira, W.; Lederberg, J. (1972): Chlorination studies. I. The reaction of aqueous hypochlorous acid with cytosine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 48 (4), S. 880–884. DOI: 10.1016/0006-291X(72)90690-0.

Pei, R.; Kim, S.-C.; Carlson, K. H.; Pruden, A. (2006): Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water research* 40 (12), S. 2427–2435. DOI: 10.1016/j.watres.2006.04.017.

Perron, G. G.; Whyte, L.; Turnbaugh, P. J.; Goordial, J.; Hanage, W. P.; Dantas, G.; Desai, M. M.; Brown, S. P. (2015): Functional Characterization of Bacteria Isolated from Ancient Arctic Soil Exposes Diverse Resistance Mechanisms to Modern Antibiotics. *PloS one* 10 (3), e0069533. DOI: 10.1371/journal.pone.0069533.

Pfizer (2021): Antimikrobielle Resistenzen: Die stille Pandemie. Unter Mitarbeit von John McGinley. Online verfügbar unter <https://www.pfizer.de/blog-overview/antimikrobielle-resistenzen-die-stille-pandemie>, zuletzt geprüft am 22.02.2022.

Piotrowska, M.; Rzeczycka, M.; Ostrowski, R.; Popowska, M. (2017): Diversity of antibiotic resistance among bacteria isolated from sediments and water of carp farms located in a Polish nature reserve. *Polish Journal of Environmental Studies* 26 (1), S. 239–252.

Pitout, J. D. D.; Laupland, K. B. (2008): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. An emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases* 8 (3), S. 159–166. DOI: 10.1016/S1473-3099(08)70041-0.

Pruden, A.; Pei, R.; Storteboom, H.; Carlson, K. H. (2006): Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants. Studies in Northern Colorado. *Environ. Sci. Technol.* 40 (23), S. 7445–7450. DOI: 10.1021/es060413l.

Pschyrembel, W.; Braun, R. N.; Engst, R. (2002): Pschyrembel klinisches Wörterbuch. 259., neu bearbeitete Auflage. Berlin: Walter de Gruyter.

Qin, B.; Li, W.; Zhu, G.; Zhang, Y.; Wu, T.; Gao, G. (2015): Cyanobacterial bloom management through integrated monitoring and forecasting in large shallow eutrophic Lake Taihu (China). *Journal of hazardous materials* 287, S. 356–363.

Qin, B.; Paerl, H. W.; Brookes, J. D.; Liu, J.; Jeppesen, E.; Zhu, G.; Zhang, Y.; Xu, H.; Shi, K.; Deng, J. (2019): Why Lake Taihu continues to be plagued with cyanobacterial blooms through 10 years (2007–2017) efforts. *Science Bulletin* 64 (6), S. 354–356. DOI: 10.1016/j.scib.2019.02.008.

Qin, B.; Xu, P.; Wu, Q.; Luo, L.; Zhang, Y. (2007): Environmental issues of Lake Taihu, China. *Hydrobiologia* 581 (1), S. 3–14. DOI: 10.1007/s10750-006-0521-5.

Qin, Y.; Wen, Q.; Ma, Y.; Yang, C.; Liu, Z. (2018): Antibiotics pollution in Gonghu Bay in the period of water diversion from Yangtze River to Taihu Lake. *Environmental Earth Sciences* 77 (11), S. 49. DOI: 10.1007/s12665-018-7558-4.

Quirós, P.; Colomer-Lluch, M.; Martínez-Castillo, A.; Miró, E.; Argente, M.; Jofre, J.; Navarro, F.; Muniesa, M. (2014): Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (1), S. 606–609. DOI: 10.1128/AAC.01684-13.

Rastogi, R. P.; Richa; Kumar, A.; Tyagi, M. B.; Sinha, R. P. (2010): Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of nucleic acids* 2010, S. 592980. DOI: 10.4061/2010/592980.

Reasoner, D. J.; Geldreich, E. E. (1985): A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology* 49 (1), S. 1–7.

Réglier-Poupet, H.; Naas, T.; Carrer, A.; Cady, A.; Adam, J.-M.; Fortineau, N.; Poyart, C.; Nordmann, P. (2008): Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of medical microbiology* 57 (Pt 3), S. 310–315. DOI: 10.1099/jmm.0.47625-0.

Reguera, J. A.; Baquero, F.; Pérez-Díaz, J. C.; Martínez, J. L. (1991): Factors determining resistance to beta-lactam combined with beta-lactamase inhibitors in Escherichia coli. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 27 (5), S. 569–575. DOI: 10.1093/jac/27.5.569.

Reich, F.; Atanassova, V.; Klein, G. (2013): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. *Emerging infectious diseases* 19 (8), S. 1253–1259. DOI: 10.3201/eid1908.120879.

Reif, D.; Slipko, K.; Krampe, J.; Kreuzinger, N. (2019): Nachgeschaltete Membranfiltration zur Entfernung antibiotikaresistenter Bakterien und Gene aus Kläranlagenabläufen. *Wiener Mitteilungen* 249, S. 245–258.

Remmen, K.; Müller, B.; Köser, J.; Wessling, M.; Wintgens, T. (2019): Phosphorus recovery in an acidic environment using layer-by-layer modified membranes. *Journal of Membrane Science* 582, S. 254–263. DOI: 10.1016/j.memsci.2019.03.023.

Robert Koch-Institut (2021): Kriterien und Erregerliste zur Einstufung eines neuen Antibiotikums als Reserveantibiotikum gemäß §35 a SGB V. Unter Mitarbeit von BfArM. Online verfügbar unter <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/Infomaterialien.html>, zuletzt geprüft am 24.02.2022.

Rosenberg, F. A.; Duquino, H. H. (1989): Antibiotic resistance of Pseudomonas from German mineral waters. *Environmental Toxicological Water Quality (Toxicity Assessment)* 4 (3), S. 281–294. DOI: 10.1002/tox.2540040305.

Rossolini, G. M.; Condemi, M. A.; Pantanella, F.; Docquier, J. D.; Amicosante, G.; Thaller, M. C. (2001): Metallo-beta-lactamase producers in environmental microbiota. New molecular class B enzyme in Janthinobacterium lividum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (3), S. 837–844. DOI: 10.1128/AAC.45.3.837-844.2001.

Rudi, K.; Hagen, I.; Johnsrud, B. C.; Skjefstad, G.; Tryland, I. (2010): Different length (DL) qPCR for quantification of cell killing by UV-induced DNA damage. *International journal of environmental research and public health* 7 (9), S. 3376–3381. DOI: 10.3390/ijerph7093376.

Rupp, M. E.; Fey, P. D. (2003): Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs* 63 (4), S. 353–365.

Sala-Comorera, L.; Blanch, A. R.; Vilaró, C.; Galofré, B.; García-Aljaro, C. (2016): Pseudomonas-related populations associated with reverse osmosis in drinking water treatment. *Journal of environmental management* 182, S. 335–341. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.07.089.

Sanders, C. C.; Bradford, P. A.; Ehrhardt, A. F.; Bush, K.; Young, K. D.; Henderson, T. A.; Sanders, W. E. (1997): Penicillin-binding proteins and induction of AmpC beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (9), S. 2013–2015. DOI: 10.1128/AAC.41.9.2013.

- Sanganyado, E.; Gwenzi, W. (2019): Antibiotic resistance in drinking water systems. Occurrence, removal, and human health risks. *The Science of the total environment* 669, S. 785–797. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.162.
- Schreiber, C.; Zacharias, N.; Essert, S. M.; Wasser, F.; Müller, H.; Sib, E.; Precht, T.; Parcina, M.; Bierbaum, G.; Schmithausen, R. M.; Kistemann, T.; Exner, M. (2021): Clinically relevant antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments - An optimized culture-based approach. *The Science of the total environment* 750, S. 142265. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142265.
- Schubert, S.; Wieser, A. (2011): Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik/Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiological routine diagnostics. *LaboratoriumsMedizin* 35 (4), S. 195–203. DOI: 10.1515/JLM.2011.031.
- Schwartz, T.; Kohnen, W.; Jansen, B.; Obst, U. (2003): Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS microbiology ecology* 43 (3), S. 325–335.
- Schwartz, T.; Schmithausen, R. (2020): Hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern. Synthese und Abschlussbericht. Unter Mitarbeit von M. Exner, Thomas U. Berendonk, J. Pinnekamp, C. Strobel, C. Stange, A. Tiehm et al. Bonn, Karlsruhe, Dresden, Aachen, Bad Elster.
- Shao, S.; Wang, Y.; Shi, D.; Zhang, X.; Tang, C. Y.; Liu, Z.; Li, J. (2018): Biofouling in ultrafiltration process for drinking water treatment and its control by chlorinated-water and pure water backwashing. *The Science of the total environment* 644, S. 306–314. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.220.
- Shao, Y.; Wang, Y.; Yuan, Y.; Xie, Y. (2021): A systematic review on antibiotics misuse in livestock and aquaculture and regulation implications in China. *The Science of the total environment* 798, S. 149205. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149205.
- Sharma, V. K.; Yu, X.; McDonald, T. J.; Jinadatha, C.; Dionysiou, D. D.; Feng, M. (2019): Elimination of antibiotic resistance genes and control of horizontal transfer risk by UV-based treatment of drinking water. A mini review. *Front. Environ. Sci. Eng.* 13 (3), S. 1143. DOI: 10.1007/s11783-019-1122-7.
- Sheng, C.; Nnanna, A. G. A.; Liu, Y.; Vargo, J. D. (2016): Removal of Trace Pharmaceuticals from Water using coagulation and powdered activated carbon as pretreatment to ultrafiltration membrane system. *The Science of the total environment* 550, S. 1075–1083. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.179.
- Sib, E. (2019): Vorkommen antibiotikaresistenter Bakterien und von Antibiotikarückständen in niedersächsischen Kläranlagen und Oberflächengewässern. Unter Mitarbeit von Universitätsklinikums Bonn. Hg. v. Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft. Online verfügbar unter [https://www.umwelt.niedersachsen.de/startseite/themen\\_im\\_fokus/multiresistente-bakterien-164411.html](https://www.umwelt.niedersachsen.de/startseite/themen_im_fokus/multiresistente-bakterien-164411.html), zuletzt aktualisiert am April 2019, zuletzt geprüft am 24.02.2022.
- Sidhu, J. P. S.; Gupta, V. V. S. R.; Stange, C.; Ho, J.; Harris, N.; Barry, K.; Gonzalez, D.; van Nostrand, J. D.; Zhou, J.; Page, D.; Tiehm, A.; Toze, S. (2020): Prevalence of antibiotic resistance and virulence genes in the biofilms from an aquifer recharged with stormwater. *Water research* 185, S. 116269. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116269.
- Siedlecka, A.; Wolf-Baca, M.; Piekarska, K. (2020): Spatiotemporal changes of antibiotic resistance and bacterial communities in drinking water distribution system in Wrocław, Poland. *Water* 12 (9), S. 2601. DOI: 10.3390/w12092601.

Silveira, M. C.; Catanho, M.; Miranda, A. B. d. (2018): Genomic analysis of bifunctional Class C-Class D  $\beta$ -lactamases in environmental bacteria. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 113 (8), e180098. DOI: 10.1590/0074-02760180098.

Silver, L. L. (2011): Challenges of antibacterial discovery. *Clinical microbiology reviews* 24 (1), S. 71–109. DOI: 10.1128/CMR.00030-10.

Singhal, N.; Kumar, M.; Kanaujia, P. K.; Viridi, J. S. (2015): MALDI-TOF mass spectrometry. An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology* 6, S. 791. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791.

Siroto, D.; Labia, R.; Pouedras, P.; Chanal-Claris, C.; Cerceau, C.; Siroto, J. (1998): Inhibitor-resistant OXY-2-derived beta-lactamase produced by *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (9), S. 2184–2187. DOI: 10.1128/AAC.42.9.2184.

Sivalingam, P.; Poté, J.; Prabakar, K. (2020): Extracellular DNA (eDNA). Neglected and potential sources of antibiotic resistant genes (ARGs) in the aquatic environments. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 9 (11). DOI: 10.3390/pathogens9110874.

Slipko, K.; Reif, D.; Wögerbauer, M.; Hufnagl, P.; Krampe, J.; Kreuzinger, N. (2019): Removal of extracellular free DNA and antibiotic resistance genes from water and wastewater by membranes ranging from microfiltration to reverse osmosis. *Water research* 164, S. 114916. DOI: 10.1016/j.watres.2019.114916.

Smalla, K.; Cook, K.; Djordjevic, S. P.; Klümper, U.; Gillings, M. (2018): Environmental dimensions of antibiotic resistance. Assessment of basic science gaps. *FEMS microbiology ecology* 94 (12), S. 1–6. DOI: 10.1093/femsec/fiy195.

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 (4), S. 768–777. DOI: 10.1038/ismej.2013.189.

Stange, C.; Sidhu, J. P. S.; Tiehm, A.; Toze, S. (2016): Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. *International journal of hygiene and environmental health* 219 (8), S. 823–831. DOI: 10.1016/j.ijheh.2016.07.015.

Stange, C.; Sidhu, J. P. S.; Toze, S.; Tiehm, A. (2019a): Comparative removal of antibiotic resistance genes during chlorination, ozonation, and UV treatment. *International journal of hygiene and environmental health*. DOI: 10.1016/j.ijheh.2019.02.002.

Stange, C.; Tiehm, A. (2016a): Verhalten von Antibiotika-Resistenzgenen bei der Trinkwasseraufbereitung – Ergebnisse einer DVGW-Studie. *energie | wasser-praxis* (11).

Stange, C.; Tiehm, A. (2016b): Verhalten von Antibiotika-Resistenzgenen bei der Trinkwasseraufbereitung: Eine vergleichende Risikobewertung für die Wasserversorgung. Abschlussbericht zum Projekt. Hg. v. Technologiezentrum Wasser (TZW). DVGW. TZW Bände (76).

Stange, C.; Tiehm, A. (2020): Occurrence of antibiotic resistance genes and microbial source tracking markers in the water of a karst spring in Germany. *The Science of the total environment* 742, S. 140529. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140529.

Stange, C.; Yin, D.; Xu, T.; Guo, X.; Schäfer, C.; Tiehm, A. (2019b): Distribution of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China. *The Science of the total environment* 655, S. 337–346. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.211.

Stoll, C.; Sidhu, J. P. S.; Tiehm, A.; Toze, S. (2012): Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environmental science & technology* 46 (17), S. 9716–9726. DOI: 10.1021/es302020s.

- Su, H.-C.; Liu, Y.-S.; Pan, C.-G.; Chen, J.; He, L.-Y.; Ying, G.-G. (2018): Persistence of antibiotic resistance genes and bacterial community changes in drinking water treatment system. From drinking water source to tap water. *The Science of the total environment* 616-617, S. 453–461. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.318.
- Sun, L.; Gao, C.; He, N.; Yang, B.; Duan, X.; Chen, T. (2019): The removal of antibiotic resistance genes in secondary effluent by the combined process of PAC-UF. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* 54 (11), S. 1075–1082. DOI: 10.1080/10934529.2019.1631090.
- Tacão, M.; Correia, A.; Henriques, I. (2012): Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems. Anthropogenic activities modulate the dissemination of bla(CTX-M)-like genes. *Applied and environmental microbiology* 78 (12), S. 4134–4140. DOI: 10.1128/AEM.00359-12.
- Tai, P.-y.; Ellis, L. (2008): Taihu: Green Wash or Green Clean? *China environmental health project research brief*.
- Tebbe, C. C.; Vahjen, W. (1993): Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and environmental microbiology* 59 (8), S. 2657–2665. DOI: 10.1128/aem.59.8.2657-2665.1993#.
- Thatcher, S. A. (2015): DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clinical chemistry* 61 (1), S. 89–99. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221374.
- Torti, A.; Lever, M. A.; Jørgensen, B. B. (2015): Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Marine genomics* 24 Pt 3, S. 185–196. DOI: 10.1016/j.margen.2015.08.007.
- Towner, K. (2006): The Genus *Acinetobacter*. *Prokaryotes* 6. DOI: 10.1007/0-387-30746-x\_25.
- TrinkwV (2001): Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016. *BGBI. I*, S. 459.
- Tsai, C. S. (2007): Biomacromolecules. Introduction to structure, function and informatics. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10307858>.
- Ullmann, I. F.; Nygaard, A. B.; Tunsjø, H. S.; Charnock, C. (2020): Whole genome sequencing and antibiotic diffusion assays, provide new insight on drug resistance in the genus *Pedobacter*. *FEMS microbiology ecology* 96 (6). DOI: 10.1093/femsec/fiaa088.
- Umweltbundesamt (2019): Trinkwasser. Online verfügbar unter <https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/trinkwasser>, zuletzt geprüft am 06.10.2021.
- Umweltbundesamt, B. f. G. (2021): Bericht des Bundesministeriums für Gesundheit und des Umweltbundesamtes an die Verbraucherinnen und Verbraucher über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch\* (Trinkwasser) in Deutschland (2017-2019). Hg. v. Umweltbundesamt (Umwelt & Gesundheit, 01). Online verfügbar unter <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/bericht-des-bundesministeriums-fuer-gesundheit-des-4>, zuletzt geprüft am 26.10.2021.
- Vartoukian, S. R.; Palmer, R. M.; Wade, W. G. (2010): Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS microbiology letters* 309 (1), S. 1–7. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x.
- Venkobachar, C.; Iyengar, L.; Prabhakara Rao, A.V.S. (1977): Mechanism of disinfection. Effect of chlorine on cell membrane functions. *Water research* 11 (8), S. 727–729. DOI: 10.1016/0043-1354(77)90114-2.

- Vikesland, P. J.; Pruden, A.; Alvarez, P. J. J.; Aga, D.; Bürgmann, H.; Li, X.-D.; Manaia, C. M.; Nambi, I.; Wigginton, K.; Zhang, T.; Zhu, Y.-G. (2017): Toward a comprehensive strategy to mitigate dissemination of environmental sources of antibiotic resistance. *Environmental science & technology* 51 (22), S. 13061–13069. DOI: 10.1021/acs.est.7b03623.
- Voigt, A. M.; Ciorba, P.; Döhla, M.; Exner, M.; Felder, C.; Lenz-Plet, F.; Sib, E.; Skutlarek, D.; Schmithausen, R. M.; Faerber, H. A. (2020a): The investigation of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and antibiotic-resistant organisms in a drinking water reservoir system in Germany. *International journal of hygiene and environmental health* 224, S. 113449. DOI: 10.1016/j.ijheh.2020.113449.
- Voigt, A. M.; Zacharias, N.; Timm, C.; Wasser, F.; Sib, E.; Skutlarek, D.; Parcina, M.; Schmithausen, R. M.; Schwartz, T.; Hembach, N.; Tiehm, A.; Stange, C.; Engelhart, S.; Bierbaum, G.; Kistemann, T.; Exner, M.; Faerber, H. A.; Schreiber, C. (2020b): Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater - An evaluation of clinical influences. *Chemosphere* 241, S. 125032. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125032.
- Volkman, H.; Schwartz, T.; Bischoff, P.; Kirchen, S.; Obst, U. (2004): Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of microbiological methods* 56 (2), S. 277–286. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.10.014.
- Vologodskii, A.; Frank-Kamenetskii, M. D. (2018): DNA melting and energetics of the double helix. *Physics of life reviews* 25, S. 1–21. DOI: 10.1016/j.plrev.2017.11.012.
- Walsh, T. R.; Wu, Y. (2016): China bans colistin as a feed additive for animals. *The Lancet Infectious Diseases* 16 (10), S. 1102–1103. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30329-2.
- Wambugu, P.; Kiiru, J.; Matiru, V. (2018): Escherichia coli harbouring resistance genes, virulence genes and integron 1 isolated from Athi River in Kenya. *Advances in Microbiology* 08 (11), S. 846–858. DOI: 10.4236/aim.2018.811056.
- Wang, D.-N.; Liu, L.; Qiu, Z.-G.; Shen, Z.-Q.; Guo, X.; Yang, D.; Li, J.; Liu, W.-L.; Jin, M.; Li, J.-W. (2016): A new adsorption-elution technique for the concentration of aquatic extracellular antibiotic resistance genes from large volumes of water. *Water research* 92, S. 188–198. DOI: 10.1016/j.watres.2016.01.035.
- Wang, R.-N.; Zhang, Y.; Cao, Z.-H.; Wang, X.-Y.; Ma, B.; Wu, W.-B.; Hu, N.; Huo, Z.-Y.; Yuan, Q.-B. (2019): Occurrence of super antibiotic resistance genes in the downstream of the Yangtze River in China. Prevalence and antibiotic resistance profiles. *The Science of the total environment* 651 (Pt 2), S. 1946–1957. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.111.
- Wang, W.; Gu, X.; Zhou, L.; Chen, H.; Zeng, Q.; Mao, Z. (2018): Antibiotics in Crab Ponds of Lake Guchenghu Basin, China. Occurrence, Temporal Variations, and Ecological Risks. *International journal of environmental research and public health* 15 (3). DOI: 10.3390/ijerph15030548.
- Westphal-Settele, K.; Konradi, S.; Balzer, F.; Schönfeld, J.; Schmithausen, R. (2018): Die Umwelt als Reservoir für Antibiotikaresistenzen. Ein wachsendes Problem für die öffentliche Gesundheit? *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 61 (5), S. 533–542. DOI: 10.1007/s00103-018-2729-8.
- Wintersdorff, C. J. H. von; Penders, J.; van Niekerk, J. M.; Mills, N. D.; Majumder, S.; van Alphen, L. B.; Savelkoul, P. H. M.; Wolfs, P. F. G. (2016): Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology* 7, S. 173. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00173.
- Witkin, E. M. (1976): Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli. *Bacteriological reviews* 40 (4), S. 869–907.

- World Health Organization (2004): Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking water. Unter Mitarbeit von Mark W. LeChevallier und Kwok-Keung Au. London, UK. Online verfügbar unter <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42796>, zuletzt geprüft am 09.11.2021.
- World Health Organization (2017): Global Priority List of Antibiotic-resistant bacteria. Unter Mitarbeit von Evelina Tacconelli. Hg. v. World Health Organization. Online verfügbar unter [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1), zuletzt geprüft am 24.02.20.
- World Health Organization (2019): No Time to Wait Securing the future from drug-resistant infections. REPORT TO THE SECRETARY-GENERAL OF THE UNITED NATIONS. Hg. v. World Health Organization. Online verfügbar unter [https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7\\_6](https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7_6).
- Wright, G. D. (2007): The antibiotic resistome. The nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews. Microbiology* 5 (3), S. 175–186. DOI: 10.1038/nrmicro1614.
- Wu, S.; Huang, J.; Zhang, F.; Wu, Q.; Zhang, J.; Pang, R.; Zeng, H.; Yang, X.; Chen, M.; Wang, J.; Dai, J.; Xue, L.; Lei, T.; Wei, X. (2019): Prevalence and Characterization of Food-Related Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in China. *Frontiers in microbiology* 10, S. 304. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00304.
- Xi, C.; Zhang, Y.; Marrs, C. F.; Ye, W.; Simon, C.; Foxman, B.; Nriagu, J. (2009): Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Applied and environmental microbiology* 75 (17), S. 5714–5718. DOI: 10.1128/AEM.00382-09.
- Xia, S.; Nan, J.; Liu, R.; Li, G. (2004): Study of drinking water treatment by ultrafiltration of surface water and its application to China. *Desalination* 170 (1), S. 41–47. DOI: 10.1016/j.desal.2004.03.014.
- Xu, D.; Bai, L.; Tang, X.; Niu, D.; Luo, X.; Zhu, X.; Li, G.; Liang, H. (2019): A comparison study of sand filtration and ultrafiltration in drinking water treatment. Removal of organic foulants and disinfection by-product formation. *The Science of the total environment* 691, S. 322–331. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.071.
- Yang, D.; Qiu, Z.; Shen, Z.; Zhao, H.; Jin, M.; Li, H.; Liu, W.; Li, J.-W. (2017): The occurrence of the colistin resistance gene *mcr-1* in the Haihe River (China). *International journal of environmental research and public health* 14 (6). DOI: 10.3390/ijerph14060576.
- Yang, H.; Paruch, L.; Chen, X.; van Eerde, A.; Skomedal, H.; Wang, Y.; Di Liu; Liu Clarke, J. (2019): Antibiotic Application and Resistance in Swine Production in China. Current Situation and Future Perspectives. *Frontiers in veterinary science* 6, S. 136. DOI: 10.3389/fvets.2019.00136.
- Yang, Y.; Shi, W.; Lu, S.-Y.; Liu, J.; Liang, H.; Yang, Y.; Duan, G.; Li, Y.; Wang, H.; Zhang, A. (2018): Prevalence of antibiotic resistance genes in bacteriophage DNA fraction from Funan River water in Sichuan, China. *The Science of the total environment* 626, S. 835–841. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.148.
- Yao, S.; Xue, B.; Tao, Y. (2013): Sedimentary lead pollution history. Lead isotope ratios and conservative elements at East Taihu Lake, Yangtze Delta, China. *Quaternary International* 304, S. 5–12. DOI: 10.1016/j.quaint.2012.10.058.
- Yasir, M. (2018): Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. *Brazilian journal of microbiology* 49 (2), S. 248–257. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.08.005.
- Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T. L. (2012): Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* 13, S. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

Yoon, Y.; Chung, H. J.; Wen Di, D. Y.; Dodd, M. C.; Hur, H.-G.; Lee, Y. (2017): Inactivation efficiency of plasmid-encoded antibiotic resistance genes during water treatment with chlorine, UV, and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Water research* 123, S. 783–793. DOI: 10.1016/j.watres.2017.06.056.

Zarei-Baygi, A.; Smith, A. L. (2021): Intracellular versus extracellular antibiotic resistance genes in the environment. Prevalence, horizontal transfer, and mitigation strategies. *Bioresource technology* 319, S. 124181. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124181.

Zarfel, G.; Lipp, M.; Gürtl, E.; Folli, B.; Baumert, R.; Kittinger, C. (2017): Troubled water under the bridge. Screening of River Mur water reveals dominance of CTX-M harboring *Escherichia coli* and for the first time an environmental VIM-1 producer in Austria. *Science of The Total Environment* 593-594 (595), S. 399–405. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.138.

ZDF (2019): Antibiotika im Wasser. Gefährliche Keime, steigende Kosten. Unter Mitarbeit von Jörg Göbl, Andreas Halbach und Felix Klauser. Online verfügbar unter <https://www.zdf.de/politik/frontal/antibiotika-im-wasser-100.html>.

Zengler, K.; Toledo, G.; Rappe, M.; Elkins, J.; Mathur, E. J.; Short, J. M.; Keller, M. (2002): Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24), S. 15681–15686. DOI: 10.1073/pnas.252630999.

Zhang, M.; Cai, Z.; Zhang, G.; Zhang, Y.; Xue, N.; Zhang, D.; Pan, X. (2021): Effectively reducing antibiotic contamination and resistance in fishery by efficient gastrointestinal-blood delivering dietary millispheres. *Journal of hazardous materials* 409, S. 125012. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.125012.

Zhang, M.; Chen, S.; Gnegy, M.; Ye, C.; Lin, W.; Lin, H.; Yu, X. (2018a): Environmental strains potentially contribute to the proliferation and maintenance of antibiotic resistance in drinking water: A case study of *Cupriavidus metallidurans*. *The Science of the total environment* 643, S. 819–826. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.013.

Zhang, M.; Chen, S.; Yu, X.; Vikesland, P.; Pruden, A. (2019a): Degradation of extracellular genomic, plasmid DNA and specific antibiotic resistance genes by chlorination. *Front. Environ. Sci. Eng.* 13 (3), S. 7573. DOI: 10.1007/s11783-019-1124-5.

Zhang, P.-Y.; Xu, P.-P.; Xia, Z.-J.; Wang, J.; Xiong, J.; Li, Y.-Z. (2013): Combined treatment with the antibiotics kanamycin and streptomycin promotes the conjugation of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* 348 (2), S. 149–156. DOI: 10.1111/1574-6968.12282.

Zhang, S.; Lin, W.; Yu, X. (2016): Effects of full-scale advanced water treatment on antibiotic resistance genes in the Yangtze Delta area in China. *FEMS microbiology ecology* 92 (5), fiw065. DOI: 10.1093/femsec/fiw065.

Zhang, T.; Hu, Y.; Jiang, L.; Yao, S.; Lin, K.; Zhou, Y.; Cui, C. (2019b): Removal of antibiotic resistance genes and control of horizontal transfer risk by UV, chlorination and UV/chlorination treatments of drinking water. *Chemical Engineering Journal* 358, S. 589–597. DOI: 10.1016/j.cej.2018.09.218.

Zhang, Y.; Li, A.; Dai, T.; Li, F.; Xie, H.; Chen, L.; Wen, D. (2018b): Cell-free DNA: A neglected source for antibiotic resistance genes spreading from WWTPs. *Environmental science & technology* 52 (1), S. 248–257. DOI: 10.1021/acs.est.7b04283.

Zhang, Y.; Marrs, C. F.; Simon, C.; Xi, C. (2009): Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *The Science of the total environment* 407 (12), S. 3702–3706. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.02.013.

Zhang, Y.; Niu, Z.; Zhang, Y.; Zhang, K. (2018c): Occurrence of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in coastal areas of Bohai Bay (China) and the factors affecting them. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 236, S. 126–136. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.01.033.

Zhang, Y.; Zhuang, Y.; Geng, J.; Ren, H.; Zhang, Y.; Ding, L.; Xu, K. (2015): Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by chlorination and sequential UV/chlorination disinfection. *The Science of the total environment* 512-513, S. 125–132. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.01.028.

Zhao, W.; Wang, B.; Yu, G. (2018): Antibiotic resistance genes in China. Occurrence, risk, and correlation among different parameters. *Environmental science and pollution research international* 25 (22), S. 21467–21482. DOI: 10.1007/s11356-018-2507-z.

Zhou, S.; Shao, Y.; Gao, N.; Li, L.; Deng, J.; Tan, C.; Zhu, M. (2014): Influence of hydrophobic/hydrophilic fractions of extracellular organic matters of *Microcystis aeruginosa* on ultrafiltration membrane fouling. *The Science of the total environment* 470-471, S. 201–207. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.09.052.

## 8 ANHANG

### 8.1 Materialien-, Medien- & Chemikalien-Listen

Tabelle 8-1 Materialliste.

Bezeichnung	Hersteller
Autoklavierband ComplyTM	VWR
Autoklavierbeutel, 10 L	Carl Roth
Autoklavierbeutel, 30 L	Carl Roth
Belüftungsfiter Acro 37 TF, 0,2 µm PTFE-Membran	Pall
Kryoröhrchen	Mast Diagnostica
Einmal-Impfösen	VWR
Filterspitzen 0,5-10 µL	VWR
Filterspitzen 100-1000 µL	VWR
Filterspitzen 10-100 µL	Brand bzw. VWR
Filtrationstrichter Microfil®, 100 mL	Merck Millipore
Gefäße 120 mL, Anti-Foam	IDEXX
Lyse-Matrix E, 2 mL	MP Biomedicals
Membranfilter EZ-Pak®, 0,45 µm	Merck Millipore
Isopore Membranfilter PC 5 µm, hydrophil, 47 mm	Merck Millipore
Isopore Membranfilter PC 1,2 µm, hydrophil, 47 mm	Merck Millipore
Membranfilter Supor®-200 0,45 µm 47 mm	Pall
Membranfilter Supor®-200 0,2 µm 47 mm	Pall
Ultrafiltration Discs, 5 kDa NMWL, Biomax polyethersulfone, 76 mm	Merck Millipore
Nitrilhandschuhe	Carl Roth
PCR-Gefäße, 0,1 mL TW 4er Tube / Cap-Strip	Biozym
PCR-Gefäße, 0,1 mL	Biozym
PCR-Gefäße, 0,2 mL, 12er-Steifen	Biozym
PCR-Gefäße, 0,2 mL, 8er-Streifen	Biozym
Petrischalen 60 x 15 mm	Greiner Bio-One
Petrischalen 94 x 16 mm	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen, 0,5 µL-10 µL	Brand bzw. VWR
Pipettenspitzen, 10 µL-100 µL	VWR
Pipettenspitzen, 100 µL-1000 µL	Brand
Plastikflaschen, steril (1 L)	VWR
QuantiTray 2000	IDEXX
Reaktionsgefäße 2 mL mit Schraubdeckel	VWR
Reaktionsgefäße 3810X, 1,5 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 5 mL	Biozym
Reaktionsgefäße, QX coloured 0,2 mL, 12er Streifen	Brand
Resazurin-Anaerob-Indikator	Oxoid
Zentrifugenröhrchen, 15 mL, PP, mit Schraubdeckel, ohne Standring, steril	VWR
Zentrifugenröhrchen, 50 mL, PP, mit Schraubdeckel, ohne Standring, steril	Brand

Tabelle 8-2 Chemikalienliste.

Einsatzbereich	Bezeichnung	Hersteller
Herstellung DNA-Standards	Ampicillin	Carl Roth
	Apa I Restriktionsendonuklease	Roche Diagnostics
	<i>E. coli</i> K12 JM109	Promega
	High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics
	IPTG	Carl Roth
	pGEM®-T Vector System	Promega
	Qiagen® Plasmid Midi Kit	Qiagen
	QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
	Qubit™ ds DNA BR Assay Kit	Life Technology

Einsatzbereich	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Extraktion	x-Gal	Carl Roth
	2-Propanol	Carl Roth
	Bacterial Xpress	Merck Millipore
	Ethanol	Merck
	FastDNA™ Spin Kit for Soil	MP Biomedicals
PCR	High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics
	innuPREP Virus DNA/RNA Kit	Analytik Jena
	dNTPs	Carl Roth
	Nukleasefreies Ultrareines Wasser (UltraPure™)	Invitrogen
	MyTaq™ DNA Polymerase	Bioline
Gelelektrophorese	Sso Fast™ EvaGreen® Supermix	Bio-Rad
	Sso Advanced Universal SYBR Green® Supermix	Bio-Rad
	QIAxcel DNA Screening Kit	Qiagen
Kulturverfahren	QX DNA Alignment Marker 15 bp/3 kb	Qiagen
	R2A Agar	Carl Roth
	Agar-Agar	Carl Roth
	CHROMagar™	Mast Diagnostica
	Columbia-Blutagar mit Schafblut	Oxoid
	D(+)-Glucose	Merck
	PrestoBlue™ Cell Viability Reagent	Thermo Scientific™
	Hefeextrakt	Merck
	Kaliumchlorid (KCl)	Merck
	Magnesiumchlorid (MgCl)	Merck
	McFarland BSS 0,5	Carl Roth
	Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
	Ceftazidime hydrate ≥90.0%	Sigma Aldrich
	Cefotaxime sodium salt, potency: 916-964 µg per mg	Sigma Aldrich
	Cefpodoxime VETRANAL™, analytical standard	Thermo Scientific™
	Meropenem Trihydrat 50 mg	Sigma Aldrich
	MALDI-TOF-MS	Ameisensäure >98 %
	Bruker Bacterial Test Standard (BTS)	Bruker Daltonik GmbH
	Bruker Matrix α-Cyano-4-hydroxizimtsäure (HCCA)	Bruker Daltonik GmbH
	Bruker Standard Solvent	Bruker Daltonik GmbH

Tabelle 8-3 Geräteliste.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Aquarienpumpe	Alize	RENA
Autoklav	3850EL	Tuttnauer
Autoklav	Laboklav 55-195	SHP Steriltechnik
DNA-Extraktionsgerät	InnuPure C16 touch	Analytik Jena
Durchflusszytometer	BIO-Rad S3 Cell Sorter	Bio-Rad
Filterapparat	Nutsche SM16201 mit Saugflasche	Sartorius
Filtrationsleiste	EZ-Fit™ Basisleiste	Millipore
Fluorometer	Qubit	Life Technologies
Geldokumentationsystem	GeneFlash	Syngene
Homogenisator	FastPrep-24	MP Biomedicals
Inkubator	IN260, IPP260, INE500, BE500	Memmert
Kapillarelektrophorese	QIAxcel Advanced System	Qiagen
MALDI-TOF-MS	Microflex LT	Bruker Daltonik GmbH
Magnetrührer	MAG REO, KMO2 electronic	IKA Labortechnik
PCR-Bank	DNA/RNA UV-cleaner box	BioSan
PCR-Cycler	Tpersonal	Biometra
Photometer	NanoPhotometer Classic 1120	Implen
pH-Sonde	SenTix 41 Sonde	WTW
Real-time PCR-Cycler	Realplex	Eppendorf
Real-time PCR-Cycler	Rotor-Gene 6000	Corbett Life Science
Real-time PCR-Cycler	Rotor-Gene Q	Qiagen
Real-time PCR-Cycler	iQ-5	Bio-Rad

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Redoxpotenzial-Sonde	Sensolyt Platinelektrode	WTW
Sauerstoff-Sonde	OxiCal-S	WTW
Sauerstoff-Sonde	CellOx 325 Elektrode	WTW
Schüttelinkubator	KS15A / TH15	Edmund-Bühler GmbH
Sterilbank	TecnoFlow 3F120-II-GS	Integra Bioscience
Thermoblock mit Schüttelfunktion	MB-102	Bioer Technology
UV-Auszählgerät	UV Viewing Cabinet	IDEXX
Versiegelungsgerät	Quanti-Tray Sealer	IDEXX
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	L 610-D	Sartorius AG
Wasserbad	WNB	Memmert
Zellaufschluss-Kugelmühle	MP FastPrep®-24	MP Biomedicals
Zentrifuge	Heracus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 8-4 Flüssigmedien.

Medium	Komponenten	Konzentration [g/L]
R2A (pH 7,4 ±1)	Hefeextrakt	0,5
	Pepton aus Fleisch	0,5
	Caseinhydrolysat	0,5
	Glucose	0,5
	lösliche Stärke	0,5
	Natrium-Pyruvat	0,3
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	0,4
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,05
LB (pH 7)	Trypton	10
	Hefeextrakt	5
	NaCl	10
	<b>Variante LB/Amp:</b>	
	Ampicillin	0,02
	<b>Variante LAXI-Platten:</b>	
	Agar agar	7,5
	Ampicillin	0,1
	IPTG	0,12
	X-Galactose	0,16
SOC (pH 7)	Trypton	20
	Hefeextrakt	5
	NaCl	0,584
	KCl	0,186
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,02
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,025
	Glucose	0,036

Tabelle 8-5 Fertigmedien.

Fertigmedien	Hersteller
DEV-Agar	Merck Millipore
Chom®agar ESBL	bioMérieux
R2A-Agar	Merck Millipore

## 8.2 Rohdaten der qPCR für das Monitoring von Resistenzgenen in der aquatischen Umwelt

### 8.2.1 Daten des Tai See Resistenzgen-Monitorings

Die Messdaten der qPCR wurden bereits hochgerechnet auf Genkopien/mL. Die Bestimmungsgrenze (BG) wurde dabei individuell in jedem Lauf festgelegt und liegt in der Regel bei 10 Genkopien pro Reaktion, während pro Reaktion 1 µL Template eingesetzt wird. Es wurden nur Werte die in den jeweiligen Reaktionen über der BG lagen mit den Konzentrations-/Verdünnungsfaktoren multipliziert. Die GC/mL können somit zwischen 1 und 10 GC/mL liegen, da für die Analyse von Genen in Wasserproben meist eine Membranfiltration und anschließende DNA-Extraktion eine starke Aufkonzentrierung der DNA mit sich bringt.

Tabelle 8-6 qPCR-Ergebnisse des Tai See ARG-Monitorings. \*Anzahl der Tage nach der ersten Beprobung während der Kampagne. Alle Werte in GC/mL.

Kampagne	Tag*	Datum	Abkürzung	Genkopien/mL								
				16 S	int1	sul1	sul2	blaTEM	blaCTX-M-32	blaNDM-1	mecA	mcr-1
Nov 18	0	25.11.2018	NJ0 A	7,8E+06	1,0E+03	2,4E+04	1,7E+04	1,6E+01	< BG	< BG	< BG	< BG
			NJ0 B	5,5E+06	1,8E+03	3,3E+04	8,5E+04	3,1E+01	9,9E+00	< BG	< BG	< BG
			NJ0 C	2,1E+06	3,8E+03	7,2E+04	8,1E+03	< BG	< BG	1,3E+01	< BG	< BG
	1	26.11.2018	NJ1 A	9,3E+05	1,9E+03	6,8E+04	4,4E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
			NJ1 B	2,1E+05	1,8E+03	3,0E+05	1,2E+02	< BG	< BG	2,9E+02	< BG	< BG
			NJ1 C	4,3E+06	2,5E+04	5,1E+05	2,8E+03	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Mrz 19	0	27.03.2019	NJ0 A	7,6E+06	2,8E+03	4,9E+03	9,2E+04	6,4E+02	< BG	< BG	1,3E+02	< BG
			NJ0 B	9,8E+06	3,3E+03	7,8E+03	5,0E+03	2,9E+02	< BG	< BG	1,1E+02	< BG
			NJ0 C	5,5E+06	3,8E+03	1,1E+04	7,8E+03	2,4E+02	1,2E+02	< BG	8,4E+01	< BG
Aug 19	0	20.08.2019	NJ0 A	3,8E+06	1,9E+04	2,2E+04	9,3E+02	< BG	9,4E+02	n.a.	4,9E+04	< BG
			NJ0 B	1,8E+06	9,6E+03	6,7E+03	1,0E+03	< BG	9,3E+02	n.a.	5,9E+04	< BG
			NJ0 C	2,4E+06	4,4E+03	8,6E+03	7,9E+02	< BG	1,0E+03	n.a.	7,2E+04	< BG
	1	21.08.2019	NJ1 A	4,9E+06	1,8E+04	2,1E+04	2,5E+03	< BG	8,0E+02	n.a.	6,7E+04	< BG
			NJ1 B	5,0E+06	2,7E+04	1,5E+04	2,5E+03	7,9E+01	8,2E+02	n.a.	7,0E+04	< BG
			NJ1 C	4,4E+06	4,4E+04	1,9E+04	3,3E+03	< BG	8,4E+02	n.a.	9,5E+04	< BG
	2	22.08.2019	NJ2 A	4,4E+06	2,3E+04	2,4E+04	2,1E+03	< BG	8,8E+02	n.a.	8,2E+04	< BG
			NJ2 B	1,4E+06	5,1E+03	5,1E+03	4,1E+02	< BG	1,1E+03	n.a.	5,9E+04	< BG
			NJ2 C	6,5E+06	3,1E+04	2,3E+04	2,6E+03	< BG	1,1E+03	n.a.	6,4E+04	< BG
	5	25.08.2019	NJ5 A	4,9E+06	3,0E+04	2,7E+04	1,3E+03	< BG	1,1E+03	n.a.	9,8E+04	< BG
			NJ5 B	2,6E+06	1,3E+04	2,6E+05	5,6E+02	< BG	1,2E+03	n.a.	1,1E+05	< BG
			NJ5 C	2,5E+06	1,6E+04	1,4E+05	1,9E+02	< BG	5,8E+02	n.a.	7,5E+04	< BG
	6	26.08.2019	NJ6 A	9,0E+06	1,1E+05	2,5E+04	9,2E+03	< BG	< BG	n.a.	3,0E+04	< BG
			NJ6 B	4,3E+06	2,9E+03	5,1E+03	1,8E+03	< BG	< BG	n.a.	2,2E+04	< BG
			NJ6 C	2,6E+06	8,6E+03	5,0E+03	1,5E+03	< BG	< BG	n.a.	2,4E+04	1,2E+02
	8	28.08.2019	NJ8 A	1,3E+07	8,5E+00	1,6E+05	4,0E+03	< BG	< BG	2,7E+01	< BG	< BG
			NJ8 B	8,1E+06	4,9E+04	5,4E+04	1,2E+03	< BG	< BG	2,5E+02	< BG	1,4E+02
			NJ8 C	7,4E+06	7,1E+03	5,4E+04	5,6E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	8,2E+01

Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 10 GC pro qPCR Reaktion

n.a. = nicht analysiert

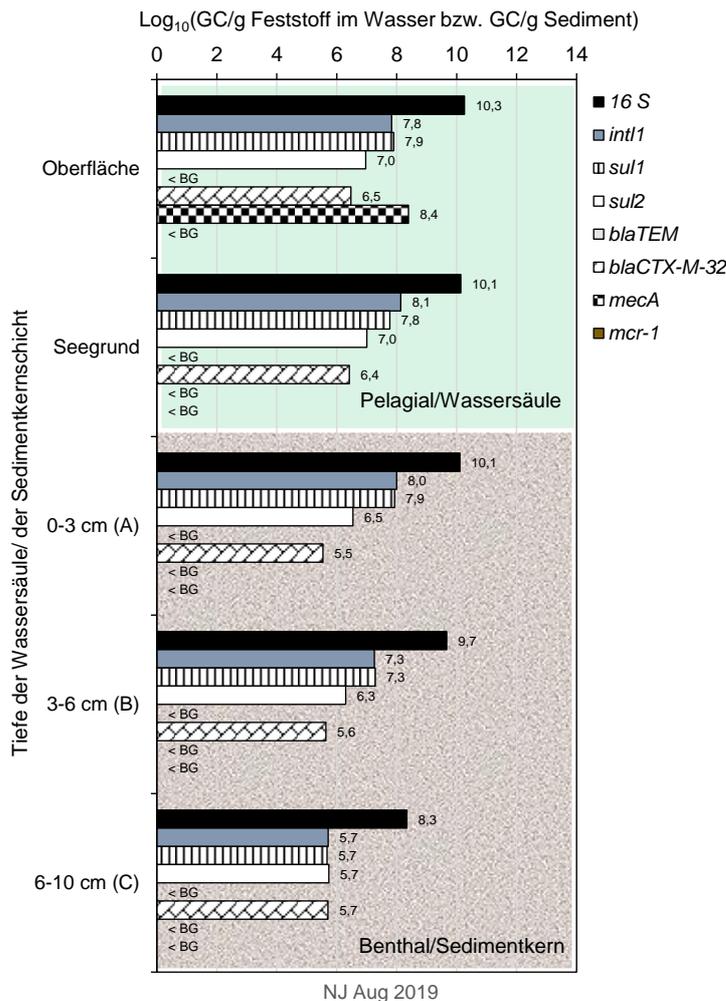


Abbildung 8-1 Genkopien in der Tai See NJ Wasser/Sediment-Säule pro Gramm des Feststoffs in der Wasserphase/ bzw. pro Gramm Sediment. Sedimentkern des Bereichs an der NIGLAS Jetty Station (August 2019) und darüber liegende Wasserproben von Oberfläche und über dem Seegrund.

Tabelle 8-7 qPCR-Ergebnisse des ARG-Monitorings der Sedimente und zugehörigen Wasserproben der Crabfarm (CF), der Wujiang Wasserwerks Intake Area (Wul) und an der NIGLAS Jetty Station (NJ). \*Anzahl der Tage nach der ersten Beprobung während der Kampagne. Alle Werte in GC/mL.

Kampagne	Datum	Probenart	Abkürzung	FS [mg/L]	Genkopien/mL (Wasser) bzw. Genkopien/g (Sediment)								
					16 S	intl1	sul1	sul2	blaTEM	blaCTX-M-32	blaNDM-1	mecA	mcr-1
Mrz 19	21.03.2019	W	CFI A	14,0	1,0E+07	4,2E+03	3,9E+03	1,5E+04	1,0E+02	< BG	< BG	< BG	< BG
		W	CFI C	74,5	1,8E+07	1,1E+04	4,3E+03	1,8E+05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	21.03.2019	S	CF A	-	2,5E+09	8,2E+05	8,2E+06	1,1E+06	2,5E+05	< BG	< BG	< BG	< BG
		S	CF B	-	2,1E+09	4,0E+05	2,3E+06	3,2E+06	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
		S	CF C	-	6,7E+08	8,2E+04	5,6E+05	3,2E+05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
		S	CF D	-	2,7E+08	2,8E+04	5,7E+04	5,5E+05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
		S	CF E	-	1,8E+08	2,4E+04	3,0E+04	1,0E+06	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
		S	CF F	-	1,4E+08	1,3E+04	3,9E+04	5,3E+05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	W	Wul A	44,2	8,0E+06	1,3E+03	8,2E+02	3,0E+04	7,9E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	
	W	Wul C	95,8	1,1E+07	8,4E+03	4,1E+03	3,9E+05	2,1E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	
S	Wul A	-	1,3E+09	5,1E+05	2,8E+06	8,7E+05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG		
S	Wul B	-	1,8E+08	4,3E+04	1,4E+05	5,0E+05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG		
S	Wul C	-	5,4E+07	1,8E+04	3,6E+04	1,4E+05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG		
Aug 19	21.08.2019	S	NJ A	-	4,9E+06	1,8E+04	2,1E+04	2,5E+03	< BG	8,0E+02	n.a	6,7E+04	< BG
		S	NJ B	-	5,0E+06	2,7E+04	1,5E+04	2,5E+03	7,9E+01	8,2E+02	n.a	7,0E+04	< BG

Kampagne	Datum	Probenart	Abkürzung	FS [mg/L]	Genkopien/mL (Wasser) bzw. Genkopien/g (Sediment)								
					16 S	int1	sul1	sul2	blaTEM	blaCTX-M-32	blaNDM-1	mecA	mcr-1
		S	NJ C	-	4,4E+06	4,4E+04	1,9E+04	3,3E+03	< BG	8,4E+02	n.a	9,5E+04	< BG
		W	NJ1 A	26,9	1,3E+10	9,9E+07	8,5E+07	3,5E+06	< BG	3,5E+05	n.a	< BG	< BG
		W	NJ1 B	n.e.	4,7E+09	1,8E+07	1,9E+07	2,0E+06	< BG	4,3E+05	n.a	< BG	< BG
		W	NJ1 C	32,2	2,2E+08	5,2E+05	4,8E+05	5,4E+05	< BG	5,1E+05	n.a	< BG	< BG

Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 10 GC pro qPCR Reaktion

n.a. = nicht analysiert

## 8.2.2 Daten des Monitorings von deutschen Oberflächenwässern

Tabelle 8-8 qPCR-Ergebnisse des ARG-Monitorings der Oberflächenwässer aus Deutschland von den Wasserversorgern WWU und ZV LWV. Alle Werte in GC/mL.

Datum	ProbenID	Bezeichnung	GC/mL									
			16S	int1	blaCMY-2	blaTEM	blaCTXM-32	blaSHV	blaNDM-1	blaOXA-48	blaKPC-3	blaVIM-2
08.10.2019	Ruhr	OW1	2,3E+06	4,7E+04	6,3E+01	< BG	< BG	< BG	1,1E+02	< BG	< BG	< BG
08.10.2019	Steuer	OW2	2,3E+06	5,7E+04	6,5E+01	< BG	< BG	< BG	8,9E+01	< BG	< BG	< BG
15.11.2019	Ruhr	OW3	5,7E+04	3,2E+02	5,3E+00	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
15.11.2019	Steuer	OW4	4,2E+05	1,0E+03	1,6E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	3,1E+00
02.12.2019	Ruhr	OW5	2,4E+06	2,0E+04	5,0E+02	5,9E+01	< BG	5,3E+01	3,6E+01	< BG	< BG	4,7E+01
02.12.2019	Steuer	OW6	2,7E+06	2,3E+04	2,5E+02	< BG	< BG	6,6E+01	3,2E+01	< BG	< BG	2,9E+01
08.01.2020	Ruhr	OW7	2,0E+06	1,9E+04	5,1E+02	7,3E+01	< BG	< BG	4,6E+01	< BG	< BG	2,4E+01
08.01.2020	Steuer	OW8	2,7E+06	2,5E+04	3,7E+02	2,3E+02	< BG	2,6E+01	7,5E+01	< BG	< BG	5,0E+00
05.02.2020	Ruhr	OW9	3,0E+06	4,3E+04	5,1E+02	1,2E+02	2,4E+01	5,7E+01	4,7E+01	< BG	< BG	< BG
05.02.2020	Steuer	OW10	2,8E+06	2,4E+04	5,1E+02	5,0E+01	< BG	2,1E+01	5,0E+01	< BG	< BG	2,6E+01
07.04.2020	Ruhr	OW11	2,5E+06	6,7E+04	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.
07.04.2020	Steuer	OW12	6,1E+06	5,3E+04	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.
05.05.2020	Ruhr	OW13	3,5E+06	6,5E+04	3,8E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.
05.05.2020	Steuer	OW14	8,0E+06	7,0E+04	5,1E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.
09.06.2020	Ruhr	OW15	1,4E+05	2,5E+03	2,4E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.
09.06.2020	Steuer	OW16	4,4E+05	3,5E+03	5,9E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.
04.02.2020	Ruhr	OW17	1,2E+07	9,7E+04	1,7E+02	1,1E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.
04.02.2020	Steuer	OW18	2,9E+07	5,0E+04	1,8E+02	9,9E+00	< BG	< BG	< BG	< BG	8,2E+01	n.a.
02.12.2019	Rhein	OW19	1,2E+06	6,9E+03	1,7E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
27.01.2020	Rhein	OW20	4,1E+05	9,9E+02	5,6E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
10.08.2020	Rhein	OW21	2,0E+06	6,6E+03	4,3E+01	5,9E+00	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.
18.01.2021	Rhein	OW22	1,5E+07	1,0E+04	1,7E+02	2,8E+01	4,3E+01	< BG	< BG	1,8E+03	< BG	< BG
17.02.2020	Donau	OW23	1,2E+06	1,5E+04	2,8E+02	< BG	< BG	8,8E+01	6,0E+01	< BG	< BG	< BG
07.04.2020	Donau	OW24	2,1E+06	1,2E+04	1,1E+02	< BG	< BG	1,9E+02	< BG	< BG	< BG	n.a.
16.06.2020	Donau	OW25	1,1E+06	8,3E+03	1,3E+02	8,9E+00	< BG	2,0E+01	5,8E+00	< BG	< BG	n.a.
25.08.2020	Donau	OW26	1,3E+06	1,1E+04	4,1E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.
20.10.2020	Donau	OW27	1,5E+07	8,1E+03	3,5E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
01.12.2020	Donau	OW28	8,3E+06	6,4E+03	7,2E+01	< BG	< BG	3,1E+01	< BG	< BG	2,6E+01	< BG

Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 10 GC pro qPCR Reaktion

n.a. = nicht analysiert

### 8.3 Zusatzmaterial zur Fraktionierung von Wasserproben

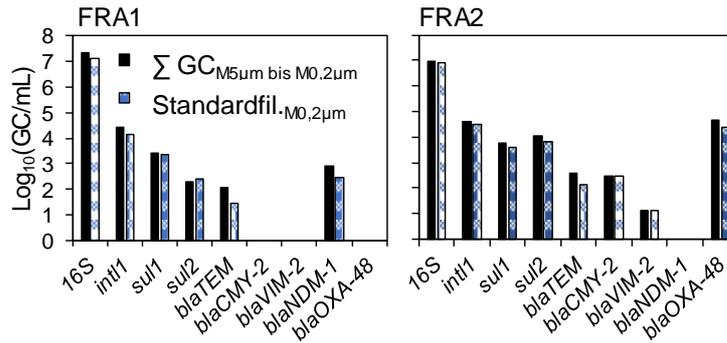


Abbildung 8-2 Summe der Genkopien (GC/ml) auf allen Filtern (5 µm, 1,2 µm, 0,45 µm und 0,2 µm, schwarze Säulen) im Vergleich zu den Genkopien, die mit der Standardfiltrationsmethode (blau/weiß karierte Säulen) unter Verwendung einer 0,2 µm PES-Membran für die beiden Oberflächenwasserproben FRA1 (Mai 2021) und FRA2 (August 2021) erhalten wurden. Es werden nur nachweisbare ARGs gezeigt. Andere untersuchte ARGs wie *vanA*, *blaCTX-M-32*, *blaSHV*, *mecA* und *mcr-1* lagen unter der BG (1 GC/mL).

### 8.4 Rohdaten der Kulturverfahren

#### 8.4.1 Vorversuche zur Etablierung von Kulturverfahren für den Nachweis resistenter Umweltbakterien

##### 8.4.1.1 Ausplattierung vs. Membranfiltration und Inkubation auf R2A-Medien

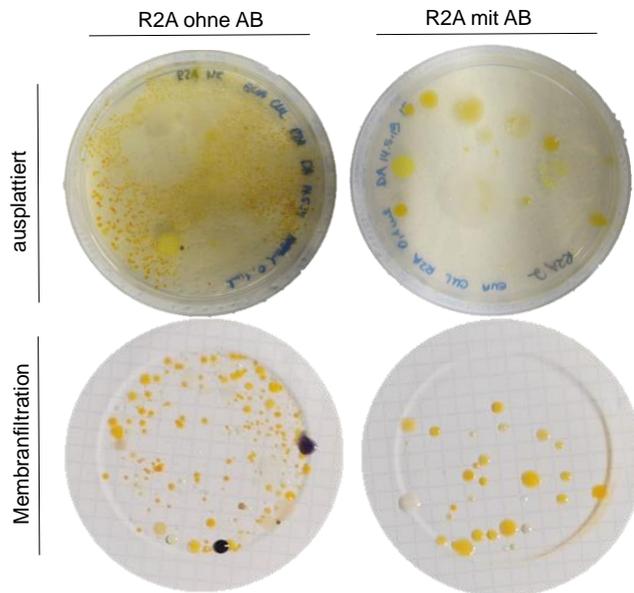


Abbildung 8-3 Vergleich der Kolonien nach Ausplattierung einer Wasserprobe und Membranfiltration. Es wurden je 0,1 mL einer Oberflächenwasserprobe verwendet und 2 Tage bei 21 °C inkubiert.

8.4.1.2 Wachstum von Umweltisolaten auf nährstoffreichem Medium

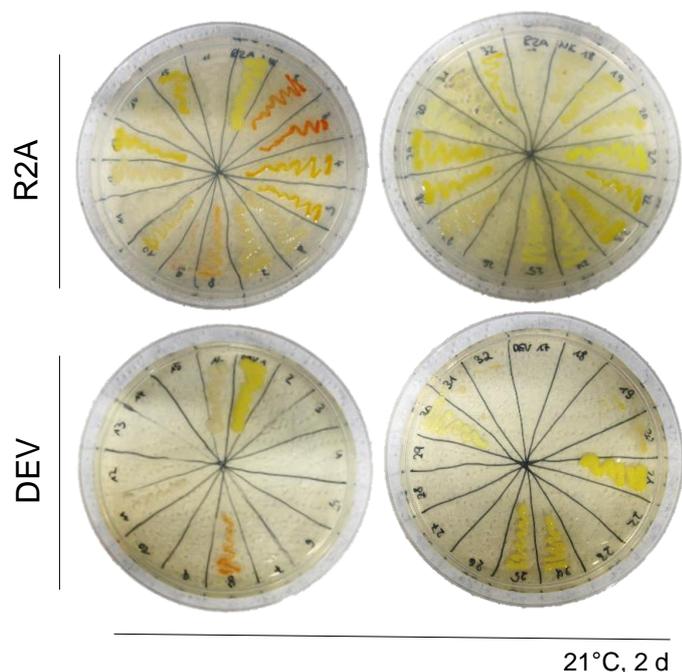


Abbildung 8-4 Parallele Inkubation von auf R2A-Platten isolierten Kulturen auf R2A und DEV Medium (20 g/L organisches Substrat) bei 21 °C für 2 Tage. Wachstum von nur 9 von 32 Isolaten auf DEV. Hierbei handelt es sich um ein exemplarisches Bild.

Tabelle 8-9 KBE pro 0,1 mL Filtrationsvolumen der Vorversuche zur Etablierung von Kulturverfahren zur Isolation  $\beta$ -Laktam-resistenter oligotropher Bakterien aus der aquatischen Umwelt (oben) und KBE auf dem chromogenen ESBL Medium (unten) bei verschiedenen Temperaturen.

	OW	21°C		12°C	
		R2A	1/2 R2A	R2A	1/2 R2A
ohne AB	1	36	34	34	33
	2	46	23	84	52
	3	57	61	89	60
BL1	1	20	25	22	20
	2	39	24	54	51
	3	48	67	70	58
BL2	1	3	7	8	5
	2	20	13	18	13
	3	35	40	58	38

alle Werte in KBE/0,1 mL

OW	ESBL Chrom	
	41°C	21°C
1	15	9
2	61	38
3	90	60

KBE/100 mL    KBE/0,1 mL

Tabelle 8-10 Von MALDI-TOF-MS identifizierte Isolate während der Vorversuche mit den OW Rhein, Ruhr und Stever vom Dezember 2019. Die Identifikation auf Art-Ebene ist zum Teil mit geringen Sicherheiten angegeben, weshalb der Fokus für Auswertungen hauptsächlich auf den Gattungen liegt.

Isolate ohne hygienische Relevanz*		
Gattungen	Arten	Wo detektiert?
<i>Aeromonas</i>	<i>encheleia</i>	R2A ohne AB
	<i>media</i>	ChromESBL
	<i>popoffii</i>	R2A ohne AB
<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	R2A ohne AB
	<i>pittii</i>	ChromESBL
<i>Arthrobacter</i>	<i>n.b.</i>	R2A ohne AB
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	R2A ohne AB
<i>Brevundimonas</i>	<i>intermedia</i>	R2A ohne AB
<i>Comamonas</i>	<i>n.b.</i>	R2A ohne AB, BL1/2
<i>Erwinia</i>	<i>n.b.</i>	R2A ohne AB
<i>Ewingella</i>	<i>n.b.</i>	R2A ohne AB
<i>Duganella</i>	<i>sacchari</i>	BL1/2
	<i>zoogloide</i>	BL1/2
<i>Exiguobacterium</i>	<i>n.b.</i>	R2A ohne AB
<i>Flavobacterium</i>	<i>aquidurensis</i>	R2A ohne AB, BL1/2
	<i>frigidarium</i>	BL1/2
	<i>hibernum</i>	R2A ohne AB, BL1/2
	<i>oncorhynchi</i>	R2A ohne AB
	<i>pectinovorum</i>	BL1/2
	<i>piscis</i>	BL1/2
	<i>saccharophilum</i>	BL1/2
<i>Janthinobacterium</i>	<i>lividum</i>	R2A ohne AB, BL1/2
<i>Massilia</i>	<i>dura</i>	BL1/2
<i>Pedobacter</i>	<i>kyonggii</i>	BL1/2
	<i>roseus</i>	BL1/2
<i>Pseudoduganella</i>	<i>danionis</i>	BL1/2
<i>Pseudomonas</i>	<i>antarctica</i>	BL1/2
	<i>cedrina</i>	BL1/2
	<i>extremorientalis</i>	BL1/2
	<i>fluorescens</i>	R2A ohne AB
	<i>frederiksbergensis</i>	BL1/2
	<i>jessenii</i>	BL1/2
	<i>libanensis</i>	ChromESBL
	<i>putida</i>	ChromESBL
	<i>savastanoi</i>	ChromESBL
	<i>fragi</i>	R2A ohne AB, BL1/2
	<i>citronellolis</i>	ChromESBL
<i>graminis</i>	BL1/2	
<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>	ChromESBL
<i>Ralstonia</i>	<i>mannitolilytica</i>	ChromESBL
<i>Shewanella</i>	<i>baltica</i>	R2A ohne AB
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	ChromESBL
Isolate mit hygienischer Relevanz*		
Gattungen	Arten	Wo detektiert?
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	ChromESBL
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	ChromESBL
<i>Escherischia</i>	<i>coli</i>	ChromESBL
<i>Enterobacter</i>	<i>cloaccae</i>	ChromESBL
	<i>kobei</i>	R2A ohne AB
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	R2A ohne AB
<i>Serratia</i>	<i>fonticola</i>	ChromESBL

\*resistente Pathogene und Fäkalindikatoren (lt. WHO 2017)

## 8.4.2 Zusatzmaterial zur Anwendung der etablierten Kulturverfahren auf Umweltproben

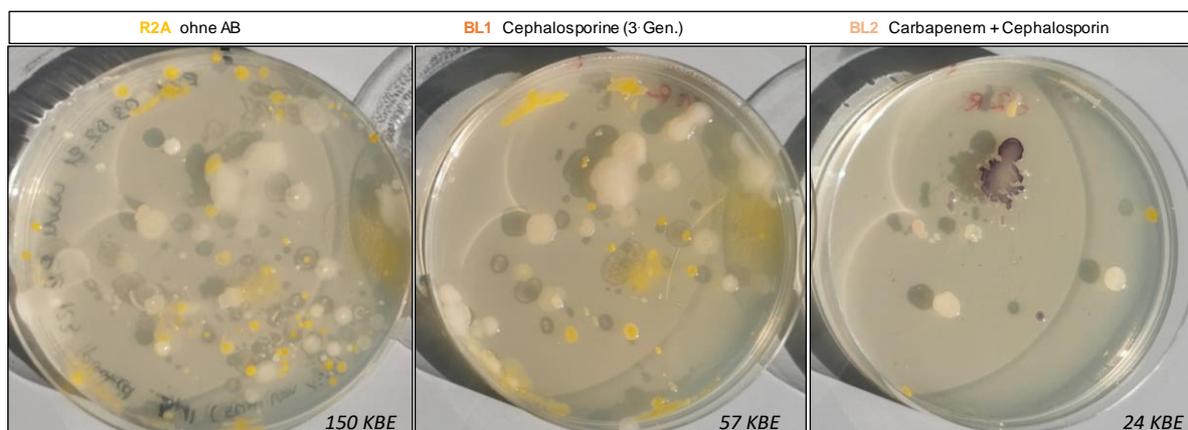


Abbildung 8-5 KBE, die auf den R2A-basierten Agarplatten mit der Stempel-Technik gewachsen sind. Eine 20-fache Verdünnung der ursprünglichen Probe (OW3-Ruhr) wurde auf die ursprüngliche R2A-Platte ohne AB-Zusätze ausplattiert.

Tabelle 8-11 Ergebnisse der Kulturverfahren aller Oberflächenwässer (OW1-28) in KBE/mL., CHROM ESBL = ChromESBL Agar, R2A = Antibiotika-freies R2A-Medium, BL1 = Cephalosporin-haltiges R2A-Medium, BL2 = Carbapenem-haltiges R2A-Medium.

Datum	ProbenID	Bezeichnung	KBE/mL			
			CHROM ESBL	R2A	BL1	BL2
08.10.2019	Ruhr	OW1	0,1	n.u.	138,0	n.d.
08.10.2019	Steuer	OW2	0,3	n.d.	96,4	n.d.
15.11.2019	Ruhr	OW3	0,1	40,0	45,5	n.d.
15.11.2019	Steuer	OW4	0,0	58,2	35,5	n.u.
02.12.2019	Ruhr	OW5	n.d.	460,0	390,0	200,0
02.12.2019	Steuer	OW6	n.d.	160,9	104,5	105,5
08.01.2020	Ruhr	OW7	0,4	846,7	266,7	n.d.
08.01.2020	Steuer	OW8	0,8	606,3	468,8	n.u.
05.02.2020	Ruhr	OW9	1,0	81,8	31,0	28,0
05.02.2020	Steuer	OW10	0,3	101,8	38,2	30,9
07.04.2020	Ruhr	OW11	1,2	1200,0	920,0	220,0
07.04.2020	Steuer	OW12	0,6	2580,0	300,0	30,0
05.05.2020	Ruhr	OW13	0,0	640,0	140,0	40,0
05.05.2020	Steuer	OW14	0,6	1680,0	500,0	120,0
09.06.2020	Ruhr	OW15	0,0	640,0	140,0	20,0
09.06.2020	Steuer	OW16	0,0	860,0	280,0	40,0
04.02.2020	Ruhr	OW17	0,4	2824,7	1444,3	342,9
04.02.2020	Steuer	OW18	0,5	7593,3	5466,7	2020,0
02.12.2019	Rhein	OW19	0,2	360,0	200,0	30,0
27.01.2020	Rhein	OW20	0,7	140,0	40,0	n.d.
10.08.2020	Rhein	OW21	n.d.	116,3	24,4	24,4
18.01.2021	Rhein	OW22	1,7	3810,0	3000,0	1240,0
17.02.2020	Donau	OW23	0,8	660,0	310,0	390,0
07.04.2020	Donau	OW24	n.d.	580,0	74,0	17,0
16.06.2020	Donau	OW25	1,4	980,0	746,7	786,7
25.08.2020	Donau	OW26	0,1	276,7	61,7	20,0
20.10.2020	Donau	OW27	0,4	613,8	221,9	20,6
01.12.2020	Donau	OW28	0,0	196,7	103,3	10,0

Tabelle 8-12 Rohdaten der Kulturverfahren Auswertungen aller Oberflächenwässer (OW) und Trinkwasseraufbereitungs-Proben (TWA) mit KBE/mL der Isolate und entsprechender Identifizierungs-Ergebnisse des MALDI-TOF-MS. CE = ChromESBL, R2A = Antibiotika-freies R2A-Medium, BL1 = Cephalosporin-haltiges R2A-Medium, BL2 = Carbapenem-haltiges R2A-Medium.

Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen <sup>markiert</sup> [ml]	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
CE	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	100	C	7	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
CE	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	100	C			<i>Pseudomonas</i>		O
CE	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	100	C			<i>Acinetobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	100	R	8	3	<i>Escherichia coli</i>	3	H
CE	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	100	G	41	4	<i>Stenotrophomonas</i>	4	O
CE	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	100	G			<i>Stenotrophomonas</i>		O
CE	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	100	G			<i>Stenotrophomonas</i>		O
CE	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	100	G	24	4	<i>Ralstonia</i>	4	O
CE	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	100	O			<i>Ralstonia</i>		O
CE	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	100	O			<i>Ralstonia</i>		O
CE	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	100	O			<i>Ralstonia</i>		O
CE	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	100	R	1	1	<i>Escherichia coli</i>	1	H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	C	3	3	<i>Acinetobacter</i>	1	H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	C			no ID		n.b.
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	C			no ID		n.b.
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	C	3	3	<i>Acinetobacter</i>	1	H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	C			no ID		n.b.
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	R	4	4	<i>Echerichia coli</i>	4	H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	R			<i>Klebsiella</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	R	4	4	<i>Klebsiella</i>	4	H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	T	1	1	no ID	0	n.b.
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	10	T	1	1	no ID	0	n.b.
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	B	6	3	<i>Acinetobacter</i>	3	H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	B			<i>Enterobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	B			<i>Klebsiella</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	B	6	3	<i>Acinetobacter</i>	3	H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	B			<i>Enterobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	B			<i>Klebsiella</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	C	40	5	<i>Acinetobacter</i>	5	H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	C			<i>Acinetobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	C			<i>Acinetobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	C			<i>Acinetobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	C			<i>Acinetobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	C			<i>Acinetobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	C			<i>Acinetobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	C			<i>Acinetobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	C			<i>Acinetobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	C			<i>Acinetobacter</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	R	40	5	<i>Escherichia coli</i>	5	H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	R			<i>Echerichia coli</i>		H
CE	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	100	R			<i>Echerichia coli</i>		H
R2A	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	0,1	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
R2A	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	0,1	C	30	3	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	0,1	C			no ID		n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	0,1	G	5	3	<i>Aeromonas</i>	3	O
R2A	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	0,1	G			<i>Exiguobacterium</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	02.12.2019	0,1	G			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	0,1	C	7	2	<i>Acinetobacter</i>	2	O
R2A	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	0,1	C			<i>Acinetobacter</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	0,1	G	5	2	no ID	0	n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	0,1	O	1	1	<i>Shewanella</i>	1	O
R2A	TZW	OW	Rhein	27.01.2020	0,1	W	1	1	<i>Bacillus</i>	1	O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,1	B	1	1	no ID	0	n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,1	C	12	2	<i>Bacillus</i>	2	O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,1	C			<i>Bacillus</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,1	C	22	2	<i>Aeromonas</i>	1	O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,1	C			no ID		n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,1	O	1	1	<i>Lelliottia</i>	1	O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,1	T	2	2	<i>Enterobacter</i>	2	H
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,1	T			<i>Enterobacter</i>		H
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,5	B	2	2	<i>Serratia</i>	1	H
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,5	B			no ID		n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,5	G	4	2	<i>Chryseobacterium</i>	2	O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,5	G			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,5	T	46	4	<i>Raoultella</i>	4	O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,5	T			<i>Raoultella</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,5	T			<i>Enterobacter</i>		H
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	0,5	T			<i>Enterobacter</i>		H
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	G	6	3	<i>Chryseobacterium</i>	1	O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	G			no Peak		n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	G			no ID		n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	R	1	1	no ID	0	n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	T	89	10	<i>Enterobacter</i>	9	H
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	T			<i>Enterobacter</i>		H
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	T			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	T			<i>Acinetobacter</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	T			<i>Acinetobacter</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	T			<i>Serratia</i>		H
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	T			<i>Serratia</i>		H
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	10.08.2020	1	T			no ID		n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	B	11	5	<i>Janthinobacterium</i>	4	O
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	B			no ID		n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	C	> 200	3	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	C			no ID		n.b.
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	O	164	6	<i>Flavobacterium</i>	4	O
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	O			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	O			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	O			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	TZW	OW	Rhein	18.01.2021	0,1	O			no ID		n.b.





Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen [ml]	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
CE	WWU	OW	Steuer	04.03.2020	10	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	WWU	OW	Ruhr	04.03.2020	100	B	10	2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	O
CE	WWU	OW	Ruhr	04.03.2020	100	B			<i>Klebsiella oxytoca</i>		O
CE	WWU	OW	Steuer	04.03.2020	100	B	8	2	<i>Klebsiella</i>	2	O
CE	WWU	OW	Steuer	04.03.2020	100	B			<i>Klebsiella</i>		O
CE	WWU	OW	Ruhr	04.03.2020	100	C	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
CE	WWU	OW	Ruhr	04.03.2020	100	C	39	2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	H
CE	WWU	OW	Ruhr	04.03.2020	100	C			<i>Acinetobacter</i>		O
CE	WWU	OW	Steuer	04.03.2020	100	C	5	2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	H
CE	WWU	OW	Steuer	04.03.2020	100	C			no ID		n.b.
CE	WWU	OW	Steuer	04.03.2020	100	O	36	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
CE	WWU	OW	Steuer	04.03.2020	100	O			<i>Pseudomonas</i>		O
CE	WWU	OW	Ruhr	04.03.2020	100	R	55	2	<i>Escherichia coli</i>	2	H
CE	WWU	OW	Ruhr	04.03.2020	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	WWU	OW	Steuer	04.03.2020	100	R	11	2	<i>Escherichia coli</i>	2	H
CE	WWU	OW	Steuer	04.03.2020	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	10	C	1	1	<i>Achromobacter</i>	1	O
CE	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	10	-	0	-	-	-	-
CE	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	100	B	1	1	<i>Escherichia coli</i>	1	H
CE	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	100	C	4	4	<i>Pseudomonas</i>	2	O
CE	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	100	C			<i>Pseudomonas</i>		O
CE	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	100	C			no ID		n.b.
CE	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	100	C			no ID		n.b.
CE	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	100	C	200	3	no ID	0	n.b.
CE	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	100	C			no ID		n.b.
CE	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	100	C			no ID		n.b.
CE	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	100	C	2	2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	H
CE	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	100	C			<i>Acinetobacter</i>		O
CE	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	10	-	0	-	-	-	-
CE	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	10	-	0	-	-	-	-
CE	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	100	B	1	1	<i>Escherichia coli</i>	1	H
CE	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	100	-	0	-	-	-	-
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	10	B	2	2	<i>Enterobacter</i>	2	H
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	10	B			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		H
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	10	B	1	1	<i>Klebsiella</i>	1	H
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	10	C	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	10	T	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	100	B	3	3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	H
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	100	B			<i>Enterobacter</i>		H
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	100	B			<i>Citrobacter</i>		H
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	100	B	2	2	<i>Klebsiella</i>	2	H
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	100	B			<i>Enterobacter</i>		H
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	100	C	15	3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	H
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	100	C			<i>Acinetobacter baumannii</i>		H
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	100	C			no ID		n.b.
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	100	C	50	3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	H
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	100	C			<i>Acinetobacter baumannii</i>		H
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	100	C			no ID		n.b.
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	100	R	26	3	<i>Escherichia coli</i>	3	H
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	100	R	5	5	<i>Escherichia coli</i>	5	H
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	100	R			<i>Citrobacter</i>		H
CE	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	100	R			<i>Pantoea</i>		O
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	0,1	C	5	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	0,1	G	4	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	0,1	G			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	0,1	T	7	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	0,1	T			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	1	C	30	2	<i>Serratia plymutica</i>	1	H
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	1	C			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	G	10	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	G			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	R	2	2	<i>Lelliottia</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	R			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	1	R	6	2	<i>Serratia liquefaciens</i>	2	H
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	1	R			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	T	20	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	T			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	1	T	12	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Steuer	12.11.2019	1	T			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	B	3	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	10.12.2019	0,1	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	G	22	2	<i>Pseudomonas</i>	2	n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	G			<i>Pseudomonas</i>		n.b.
R2A	WWU	OW	Steuer	10.12.2019	0,1	G	22	2	no ID	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	T	32	2	<i>Enterobacter kobei</i>	2	H
R2A	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	T			<i>Enterobacter kobei</i>		H
R2A	WWU	OW	Steuer	10.12.2019	0,1	T	23	2	<i>Ewingella</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	10.12.2019	0,1	T			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,01	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,01	C	2	1	<i>Aeromonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,01	G	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,01	G	8	1	no ID	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,01	T	4	1	no ID	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,01	T	17	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,05	B	2	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,05	C	9	1	no ID	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,05	G	5	1	<i>Flavobacterium</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,05	G	6	1	no ID	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,05	R	1	1	<i>Aeromonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,05	T	9	1	<i>Escherichia coli</i>	1	H
R2A	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,05	T	24	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,1	C	13	1	<i>Acinetobacter</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,1	C	3	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,1	G	7	1	no ID	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,1	T	14	1	<i>Erwinia</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,1	T	35	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	0,1	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	0,1	C	12	1	<i>Acinetobacter</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	0,1	C	4	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	0,1	G	3	1	<i>Acinetobacter</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	0,1	T	6	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	0,1	T	13	1	no ID	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	1	B	9	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	1	B			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	C	60	2	<i>Aeromonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	C			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	1	C	60	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	T	12	2	<i>Acinetobacter</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	T			<i>Raoultella</i>		O
R2A	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	1	T	22	1	no ID	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,05	B	3	3	<i>Shewanella</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,05	B			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	C			<i>Acinetobacter</i>		O

Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen [ml]	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	C			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	C	20	4	<i>Pseudomonas</i>	4	O
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	C			<i>Shewanella</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	C			<i>Shewanella</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	G		2	no peak	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	C			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	O	56	4	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	O			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	O			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	O			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	O	4	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	O			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	O	100	5	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	O			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	O			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	O			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,05	O			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	R	4	3	<i>Yersinia</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	R			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,05	R			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	C	30	6	<i>Aeromonas</i>	5	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	C	58	5	<i>Acinetobacter</i>	4	O
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	C			<i>Acinetobacter</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	C			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	O	2	1	no ID	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	O	21	5	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	O			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	O			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	O			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	O			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	R	5	3	no ID	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	C	21	3	<i>Acinetobacter</i>	3	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	C	30	4	<i>Pseudomonas</i>	4	O
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	C			<i>Serratia fonticola</i>		H
R2A	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	G	4	2	no ID	1	n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	G			<i>Pseudoescherischia</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	G	2	2	<i>Serratia fonticola</i>	1	H
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	G			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	L	1	1	<i>Acinetobacter</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	O	4	2	<i>Flavobacterium</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	O			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	T	6	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	T			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	T	5	2	nicht gewachsen	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	T			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	W	2	2	<i>Klebsiella</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	W			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	B	3	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	B			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	B	17	3	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	B			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	C	51	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	C	200	2	no peak	0	n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	C			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G	64	4	<i>Pseudomonas</i>	3	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	G	200	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	G			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	B	5	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	B	22	5	<i>Janthinobacterium</i>	5	O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	B			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	B			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	C	200	3	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	C			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	C	200	2	<i>Rhanelia</i>	2	O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	G	200	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	G			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	G			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	G	200	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	G			no ID		n.b.
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	R	1	1	<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	B		3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	C	200	0			O
R2A	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	G	200	0			O
BL1	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	0,1	C	2	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	0,1	G	4	2	<i>Flavobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	0,1	G			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	0,1	T	15	2	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	0,1	T			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	0,1	T	8	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	0,1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	0,1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	B	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	1	G	8	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	1	G			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	O	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	R	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	1	R	11	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	1	R			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	T	30	3	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	12.11.2019	1	T			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	1	T	8	2	<i>Acinetobacter</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Stever	12.11.2019	1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	B	6	3	<i>Janthinobacterium</i>	3	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Stever	10.12.2019	0,1	C	7	2	<i>Pseudomonas</i>	2	n.b.

Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen [ml]	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
BL1	WWU	OW	Steuer	10.12.2019	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	G	26	2	<i>Pseudomonas</i>	2	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	G			<i>Pseudomonas</i>		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	10.12.2019	0,1	G	25	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Steuer	10.12.2019	0,1	G			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	R	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	10.12.2019	0,1	T	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	T	15	2	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	T			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	10.12.2019	0,1	T	6	2	<i>Pseudomonas</i>	2	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	10.12.2019	0,1	T			<i>Pseudomonas</i>		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,01	C	3	1	<i>Acinetobacter</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,01	G	4	1	<i>Flavobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,01	T	4	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,05	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,05	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,05	C	8	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,05	C	6	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,05	G	9	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,05	R	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,05	T	5	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,1	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,1	B	2	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,1	C	11	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,1	C	8	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,1	G	9	1	<i>Flavobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,1	R	25	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	08.01.2020	0,1	R	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	08.01.2020	0,1	T	5	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	0,1	B	3	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	0,1	C	8	1	<i>Comamonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	0,1	G	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	0,1	G	3	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	0,1	T	2	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	0,1	T	8	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	1	B	5	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	C	20	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	G	5	1	<i>Flavobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	1	G	5	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	1	G			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	R	3	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	1	T	18	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.02.2020	1	T			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	W	3	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	C	6	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,1	C	2	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,1	C			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,1	L	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	O	70	5	<i>Flavobacterium</i>	4	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	O			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	O			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,1	O	25	4	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,1	O			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,1	O			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	R	13	3	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	R			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	R			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,1	T	2	2	<i>Paenobacillus</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	07.04.2020	0,1	T			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	W	2	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	W			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	C	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	C	9	4	<i>Pseudomonas</i>	4	O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	G	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	O	5	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	O	10	3	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	O			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	R	3	3	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	T	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,05	W	2	2	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,1	C	9	4	<i>Pseudomonas</i>	4	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,1	C	4	2	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,1	O	5	3	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,1	O			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,1	O			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,1	O	2	2	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	05.05.2020	0,1	R	10	5	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	C	3	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	C			<i>Achromobacter</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	0,05	C	6	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	C	3	2	<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	G			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	0,05	G	6	2	<i>Flavobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	0,05	G			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	L	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	0,05	O	2	2	<i>Flavobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	0,05	O			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	C	12	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	C			nicht gewachsen		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	C	25	4	<i>Pseudomonas</i>	4	O
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	G	2	2	<i>Flavobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	G			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	G	28	4	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	G			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	O	36	4	<i>Flavobacterium</i>	3	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	O			no ID		n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	O	11	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	O			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	R	5	2	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	R			no ID		n.b.

Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen <sup>Flaschen</sup> [ml]	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	T	11	2	no ID	1	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	T			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	09.06.2020	1	T	7	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Stever	09.06.2020	1	T			no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	W	2	2	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	W			no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Stever	09.06.2020	1	W	4	2	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Stever	09.06.2020	1	W			no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	B	2	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	B			<i>Flavobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	B	19	5	<i>Janthinobacterium</i>	5	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	C	44	4	<i>Pseudomonas</i>	4	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	C	200	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	C			no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G	45	4	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G			no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G			no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G			no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	G	200	4	<i>Pseudomonas</i>	4	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	G			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	G			<i>Flavobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,05	G			<i>Flavobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	B	3	3	<i>Janthinobacterium</i>	3	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	C	100	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	C	200	2	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	G	100	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	G			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	G	200	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,1	G			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	B	18	3	<i>Janthinobacterium</i>	3	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,5	B	29	3	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,5	B			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,5	B			no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	C	200	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	C			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,5	C	200	0	no ID	0	-
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	G	200	2	no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	G			no ID	0	n.b.
BL1	WWU	OW	Stever	03.02.2021	0,5	G	200	0	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	B	9	3	<i>Janthinobacterium</i>	3	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	10.12.2019	0,1	B	3	3	<i>Janthinobacterium</i>	3	O
BL2	WWU	OW	Stever	10.12.2019	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	10.12.2019	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	C	20	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	C			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	10.12.2019	0,1	C	15	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Stever	10.12.2019	0,1	C			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	G	2	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	G			no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	10.12.2019	0,1	T	4	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	10.12.2019	0,1	T	2	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Stever	10.12.2019	0,1	T			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.02.2020	0,1	B	2	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.02.2020	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.02.2020	0,1	C	8	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.02.2020	0,1	C			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	0,1	T	1	1	<i>Candida lambica</i>	1	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	B	5	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.02.2020	1	B	5	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.02.2020	1	B			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	C	22	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	05.02.2020	1	C	19	3	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.02.2020	1	C			<i>Janthinobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.02.2020	1	C			no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	05.02.2020	1	W	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	C	7	2	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	C			no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	C			no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,1	C	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	G	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	O	4	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	O			no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	R	2	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	R			no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	R	6	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	07.04.2020	0,1	R			no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,1	T	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	07.04.2020	0,1	W	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	C	2	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	G	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,05	R	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	R	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	T	3	3	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	T			no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,05	-	0				
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	C	16	4	<i>Pseudomonas</i>	4	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	G	4	4	<i>Pseudomonas</i>	3	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	G			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	G			<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	G			nicht gewachsen	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	O	26	4	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	O			<i>Flavobacterium</i>	0	O
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	O			no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	05.05.2020	0,1	R	6	3	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	05.05.2020	0,1	T	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	0,05	G	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	T	1	1	<i>Glutamicibacter</i>	1	O
BL2	WWU	OW	Stever	09.06.2020	0,05	W	1	1	<i>Pseudothrobacter</i>	1	O
BL2	WWU	OW	Stever	09.06.2020	1	C	7	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL2	WWU	OW	Stever	09.06.2020	1	C			no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	G	3	1	no ID	0	n.b.

Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen <sub>filtriert</sub> [ml]	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
BL2	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	G	3	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	O	5	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	O	30	4	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	O			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	O			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	O			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	R	3	1	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	T	2	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	T			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	T	4	2	<i>Pseudorhizobacter</i>	1	O
BL2	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	T			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	W	9	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	09.06.2020	1	W			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	09.06.2020	1	W	4	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	B	3	3	<i>Janthinobacterium</i>	3	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B	26	10	<i>Janthinobacterium</i>	10	O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	C	6	3	<i>Janthinobacterium</i>	3	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C	13	10	<i>Janthinobacterium</i>	8	O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			no peak		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	C			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G	13	3	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G	81	15	<i>Janthinobacterium</i>	5	O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	L	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	R	2	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	R			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	R	2	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,05	R			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	R	2	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	WK	2	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,05	WK			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	B	7	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,1	B	41	3	<i>Janthinobacterium</i>	3	O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,1	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	C	19	3	<i>Janthinobacterium</i>	3	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,1	C	23	3	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,1	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,1	C			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	G	11	3	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,1	G	117	4	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,1	G			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,1	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Steuer	03.02.2021	0,1	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	R	2	2	no ID	0	n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,1	R			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	B	33	3	<i>Janthinobacterium</i>	3	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	B			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	C	49	3	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	C			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	C			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	G	97	4	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	G			<i>Janthinobacterium</i>		O
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	G			no ID		n.b.
BL2	WWU	OW	Ruhr	03.02.2021	0,5	R	1	1	no ID	0	n.b.
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	10	B	1	1	<i>Enterobacter</i>	1	H
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	10	C	13	3	<i>Achromobacter</i>	1	O
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	10	C			no ID		n.b.
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	10	C			no ID		n.b.
CE	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	10	C			<i>Pseudomonas</i>	1	O
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	10	R	2	2	<i>Escherichia coli</i>	2	H
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	10	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	10	R	1	1	<i>Escherichia coli</i>	1	H
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	10	T	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	100	B	5	3	<i>Enterobacter</i>	3	H
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	100	B			<i>Enterobacter</i>		H
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	100	B			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		H
CE	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	100	B	1	1	no ID	0	n.b.
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	100	C	43	3	<i>Acinetobacter pittii</i>	3	O
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	100	C			<i>Acinetobacter pittii</i>		O
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	100	C			<i>Acinetobacter</i>		O
CE	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	100	C	30	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
CE	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	100	C			<i>Pandoraea</i>		O
CE	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	100	C			<i>Pandoraea</i>		O
CE	ZV LWV	TWA	O3	18.02.2020	100	-	0	-	-	-	-
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	100	R	23	3	<i>Shigella</i>	3	H
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H
CE	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	100	R	2	2	<i>Escherichia coli</i>	2	H
CE	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	100	R			<i>Escherichia coli</i>		H



Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen [ml]	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	1	T	60	nicht verwendbar	-	-	-
R2A	ZV LWV	GW	GW	25.02.2020	0,1	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	GW	GW	25.02.2020	0,1	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	GW	GW	25.02.2020	1	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	GW	GW	25.02.2020	1	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	0,1	B	1	1	<i>Janthinobacterium lividum</i>	1	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	C	4	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	0,1	C	4	2	<i>Aeromonas</i>	1	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	0,1	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	GW	GW	07.04.2020	0,1	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	TWA	O3	07.04.2020	0,1	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	O	13	3	<i>Flavobacterium nicht gewachsen</i>	1	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	O			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	O			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	0,1	O	2	1	<i>Flavobacterium</i>	1	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	T	25	5	<i>Aeromonas</i>	3	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	T			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	T			<i>Yersinia</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	T			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	T			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	W	16	4	<i>Aeromonas</i>	4	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	W			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	W			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	0,1	W			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	0,1	W	3	3	<i>Acineobacter</i>	1	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	0,1	W			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	0,1	W			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	0,1	W	2	2	<i>Bacillus cereus</i>	2	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	0,1	W			<i>Bacillus cereus</i>		O
R2A	ZV LWV	GW	GW	07.04.2020	1	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	B	1	1	<i>Pantoea ananatis</i>	1	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	G	1	1	<i>Rhanelia</i>	1	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	G	16	3	<i>Pantoea agglomerans</i>	1	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	G			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	G			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	G			<i>Erwinia</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	L	3	3	<i>Acineobacter</i>	3	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	L			<i>Acineobacter</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	L			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	ZV LWV	GW	GW	16.06.2020	0,05	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	TWA	O3	16.06.2020	0,05	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	O	3	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	O			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	O			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	T	85	3	<i>Acinetobacter</i>	3	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	T			<i>Rhanelia</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	T			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	T	28	3	<i>Pantoea</i>	1	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	T			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	T			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	C	10	3	<i>Rahnelia</i>	2	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	C	23	3	<i>no ID</i>	2	n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	G	8	3	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	G			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	G			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	T	140	3	<i>Aeromonas</i>	3	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	T			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	T			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	B	1	1	<i>no ID</i>	0	n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	B	1	1	<i>no ID</i>	0	n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	C	140	3	<i>Raultella</i>	3	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	C	112	4	<i>Aeromonas</i>	2	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	C	7	3	<i>Chryseobacterium</i>	1	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	O			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	O			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	O	5	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	O			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	1	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	1	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	10	C	1	1	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	10	T	5	3	<i>no ID</i>	0	n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	10	T			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	10	T			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	10	W	2	2	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	C	14	4	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,05	C	21	3	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,05	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,05	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	O	11	3	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	O			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	O			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,05	O	3	3	<i>Flavobacterium</i>	3	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,05	O			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,05	O			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	R	2	1	<i>no ID</i>	0	n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	W	23	4	<i>Citrobacter</i>	1	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	W			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	W			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,05	W			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	C	37	4	<i>Aeromonas</i>	2	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	C			<i>Serratia</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	C	45	4	<i>no ID</i>	0	n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	C			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	O	14	3	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	O			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	O			<i>no ID</i>		n.b.
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	O	8	2	<i>Flavobacterium</i>	1	O
R2A	ZV LWV	TWA	VorR	20.1							

Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen <sup>Flaschen</sup> (ml)	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
R2A	ZV LWW	OW	Donau	20.10.2020	0,5	B	4	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	20.10.2020	0,5	B			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	B	1	1	no ID	0	n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	20.10.2020	0,5	C	200	3	<i>Erwinia</i>	2	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	20.10.2020	0,5	C			<i>Aeromonas</i>		O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C	130	4	no ID	0	n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	20.10.2020	0,5	O	64	3	<i>Flavobacterium</i>	1	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	20.10.2020	0,5	O			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	20.10.2020	0,5	O			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	O	45	3	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	O			<i>Chryseobacterium</i>		O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	O			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	20.10.2020	0,5	R	4	0	no ID		
R2A	ZV LWW	TWA	O3	20.10.2020	1	-	nicht auswertbar	-	-	-	-
R2A	ZV LWW	GW	GW	20.10.2020	1	-	0	-	-	-	-
R2A	ZV LWW	TWA	O3	20.10.2020	10	-	nicht auswertbar	-	-	-	-
R2A	ZV LWW	GW	GW	20.10.2020	10	O	2	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	ZV LWW	GW	GW	20.10.2020	10	O			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	ZV LWW	GW	GW	20.10.2020	100	C	6	3	no ID	0	n.b.
R2A	ZV LWW	GW	GW	20.10.2020	100	C			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	GW	GW	20.10.2020	100	C			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	GW	GW	20.10.2020	100	O	1	1	no ID	0	n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	O3	20.10.2020	100	T	70	4	<i>Paraburkholderia</i>	1	O
R2A	ZV LWW	TWA	O3	20.10.2020	100	T			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	O3	20.10.2020	100	T			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	O3	20.10.2020	100	T			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,1	C	11	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,1	C	8	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,1	C			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,1	G	4	2	<i>Flavobacterium</i>	1	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,1	G			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,1	O	4	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,1	O	8	2	<i>Flavobacterium</i>	1	O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,1	O			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,1	T	6	2	no ID	0	n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,1	T			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,1	T	9	2	<i>Carnobacterium</i>	1	O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,1	T			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,1	W	2	2	no ID	0	n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,1	W			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,1	W	3	1	<i>Erwinia</i>	1	O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,1	WK	2	2	<i>Bacillus</i>	1	O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,1	WK			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	C	10	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	C	39	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	C			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	C			<i>Lellotia</i>		O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	G	9	2	<i>Flavobacterium</i>	1	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	G			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	O	27	3	<i>Flavobacterium</i>	2	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	O			<i>Pseudomonas</i>		O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	O			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	O	20	3	<i>Flavobacterium</i>	3	O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	O			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	O			<i>Flavobacterium</i>		O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	T	33	3	<i>Pseudomonas</i>	1	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	T			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	T			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	T	49	3	<i>Rheinheimera</i>	1	O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	T			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	T			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	WK	12	2	<i>Bacillus</i>	1	O
R2A	ZV LWW	OW	Donau	01.12.2020	0,5	WK			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	WK	7	2	<i>Aromonas</i>	1	O
R2A	ZV LWW	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	WK			no ID		n.b.
R2A	ZV LWW	TWA	O3	01.12.2020	10	C	1	1	<i>Paraburkholderia</i>	1	O
R2A	ZV LWW	TWA	O3	01.12.2020	10	C	1	1	<i>Paraburkholderia</i>	1	O
R2A	ZV LWW	TWA	O3	01.12.2020	10	WK	5	2	<i>Paraburkholderia</i>	2	O
R2A	ZV LWW	TWA	O3	01.12.2020	10	WK			<i>Paraburkholderia</i>		O
R2A	ZV LWW	GW	GW	01.12.2020	100	-	0	-	-	-	-
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	C	4	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	18.02.2020	0,1	G	16	3	<i>Flavobacterium</i>	0	O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	18.02.2020	0,1	G			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	18.02.2020	0,1	G			no ID		n.b.
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	G	13	2	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	G			no ID		n.b.
BL1	ZV LWW	TWA	O3	18.02.2020	0,1	-	0	-	-	-	-
BL1	ZV LWW	OW	Donau	18.02.2020	0,1	T	15	3	<i>Pseudomonas</i>	0	O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	18.02.2020	0,1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	18.02.2020	0,1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	T	4	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	T			no ID		n.b.
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	1	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	1	G	60	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	1	G			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	ZV LWW	TWA	O3	18.02.2020	1	-	0	-	-	-	-
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	1	T	9	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	18.02.2020	1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWW	GW	GW	25.02.2020	0,1	-	0	-	-	-	-
BL1	ZV LWW	GW	GW	25.02.2020	0,1	-	0	-	-	-	-
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	C	6	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	C	16	4	<i>Pseudomonas</i>	3	O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	C			no peak		n.b.
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	07.04.2020	1	C	8	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	07.04.2020	1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWW	GW	GW	07.04.2020	1	-	0	-	-	-	-
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	07.04.2020	1	-	0	-	-	-	-
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	O	24	4	<i>Flavobacterium</i>	3	O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	ZV LWW	OW	Donau	07.04.2020	1	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	07.04.2020	1	O	11	3	<i>Flavobacterium</i>	3	O
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	07.04.2020	1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	07.04.2020	1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	ZV LWW	TWA	O3	07.04.2020	1	T	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	07.04.2020	1	T	4	2	<i>Pseudomonas synxantha</i>	1	O
BL1	ZV LWW	TWA	VorR	07.04.2020	1	T			no ID		n.b.

Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen <sub>filtriert</sub> [ml]	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
BL1	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	1	W	28	5	<i>Bacillus cereus</i>	4	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	1	W			<i>Bacillus cereus</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	1	W			<i>Bacillus cereus</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	1	W			<i>Bacillus cereus</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	1	W			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	1	W	3	3	<i>Bacillus cereus</i>	2	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	1	W			<i>Bacillus cereus</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	B	1	1	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	G	19	3	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	G			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	G			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	G	8	3	<i>Chryseobacterium</i>	2	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	G			<i>Chryseobacterium</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	G			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	L	3	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	L			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	L			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	T	23	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	T	15	3	<i>Pseudomonas</i>	3	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	W	2	2	<i>Janthinobacterium</i>	2	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	W			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	G	20	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	G			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	G	14	3	<i>Chryseobacterium</i>	3	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	G			<i>Chryseobacterium</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	G			<i>Chryseobacterium</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	L	2	2	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	L			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	R	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	T	42	4	<i>Pseudomonas</i>	4	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	T	5	3	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	T			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	T			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	W	5	2	<i>Rhanelle/Ewingella</i>	2	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	W			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	GW	GW	16.06.2020	?	-	0	-	-	-	-
BL1	ZV LWV	TWA	O3	16.06.2020	?	-	0	-	-	-	-
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	C	1	1	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	G	2	2	<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	G			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	G	1	1	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	O	1	1	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	T	3	3	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	T			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	T			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	T			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	W	1	1	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	W	1	1	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	W	1	1	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	B	1	1	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	G	8	3	<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	G			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	G			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	G			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	G	3	3	<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	G			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	G			nicht gewachsen		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	O	4	2	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	O	1	1	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	W	6	2	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	W	10	3	<i>Bacillus</i>		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	W	8	3	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	W	4	4	<i>Acinetobacter</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	W			<i>Bacillus</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	10	C	1	1	<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	10	-	0	-	-	-	-
BL1	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	10	T	2	2	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	10	T			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	10	W	2	2	<i>Bacillus</i>		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	10	W			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	100	C	5	3	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	100	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	100	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	G	1	1	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	100	O	3	3	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	100	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	100	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	T	19	3	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	T			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	W	7	2	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	W			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	C	18	2	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	C	7	2	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	O	12	3	<i>Flavobacterium</i>	3	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	O	7	2	<i>Flavobacterium</i>	2	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	R	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	R	2	2	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	R			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	B	2	2	<i>Janthinobacterium</i>	1	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	B			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	C	44	4	<i>Pseudomonas</i>	2	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	C			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C	23	4	<i>Pseudomonas</i>	1	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	O	53	4	<i>Flavobacterium</i>	3	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	O			<i>Bacillus</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	O			<i>Pseudomonas</i>		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	O	30	4	<i>Flavobacterium</i>	3	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	O			<i>Flavobacterium</i>		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	O			<i>Flavobacterium</i>		O

Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen [ml]	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	R	2	2	no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	R			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	R	6	2	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	R			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	B	1	1	Janthinobacterium	1	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	C	60	4	Pseudomonas	4	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	C			Pseudomonas		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	C			Pseudomonas		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	C			Bacillus		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	C	33	3	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	O	160	4	Flavobacterium	4	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	O			Flavobacterium		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	O			Flavobacterium		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	O			Chryseobacterium		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	O	41	3	Flavobacterium	1	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	R	2	2	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	R			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	R	8	2	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	R			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	O3	20.10.2020	10	C	6	2	Paraburkholderia	2	O
BL1	ZV LWV	TWA	O3	20.10.2020	10	C			Bacillus		O
BL1	ZV LWV	GW	GW	20.10.2020	100	C	1	1	Pseudomonas	1	O
BL1	ZV LWV	TWA	O3	20.10.2020	100	C	4	4	Paraburkholderia	3	O
BL1	ZV LWV	TWA	O3	20.10.2020	100	C			Paraburkholderia		O
BL1	ZV LWV	TWA	O3	20.10.2020	100	C			Bacillus		O
BL1	ZV LWV	TWA	O3	20.10.2020	100	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,1	C	3	2	Pseudomonas	2	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,1	C			Pseudomonas		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,1	O	6	2	Flavobacterium	1	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,1	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,1	T	2	1	Bacillus	1	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,1	WK	3	2	Pseudomonas	2	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,1	WK			Bacillus		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	C	2	2	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	C	9	2	Pseudomonas	2	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	C			Pseudomonas		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	L	1	1	Stenotrophomonas	1	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	O	19	3	Flavobacterium	2	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	O			Flavobacterium		O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	O	29	3	Flavobacterium	2	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	O			Flavobacterium		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	O			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	R	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	T	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	T	18	2	Pseudomonas	1	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	T			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	T	11	2	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	T			no ID		n.b.
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	W	1	1	no ID	0	n.b.
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	WK	6	2	Pseudomonas	2	O
BL1	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	WK			Pseudomonas		O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	WK	4	2	Flavobacterium	2	O
BL1	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	WK			Bacillus		O
BL1	ZV LWV	GW	GW	01.12.2020	100	-	0	-	-	-	O
BL1	ZV LWV	TWA	O3	01.12.2020	100	WK	45	2	Pseudomonas	1	O
BL1	ZV LWV	TWA	O3	01.12.2020	100	WK			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	0,1	B	8	2	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	0,1	B			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	B	3	3	Janthinobacterium	3	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	B			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	B			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	0,1	C	30	2	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	0,1	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	0,1	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	C	9	2	no ID	1	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	C			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	TWA	O3	18.02.2020	0,1	-	0	-	-	-	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	0,1	R	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	0,1	R	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	T	8	2	Janthinobacterium	2	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	0,1	T			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	1	B	27	3	Janthinobacterium	3	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	1	B			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	1	B			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	1	B	8	2	Janthinobacterium	2	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	1	B			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	1	C	60	3	Janthinobacterium	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	1	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	18.02.2020	1	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	1	C	25	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	1	G	1	1	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	TWA	O3	18.02.2020	1	-	0	-	-	-	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	1	R	1	1	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	18.02.2020	1	T	20	1	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	GW	GW	25.02.2020	0,1	-	0	-	-	-	O
BL2	ZV LWV	GW	GW	25.02.2020	1	-	0	-	-	-	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	1	B	1	1	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	1	C	2	2	Janthinobacterium	2	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	1	C			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	1	G	5	3	Pseudomonas	2	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	1	G			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	1	T	5	3	Pseudomonas	2	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	07.04.2020	1	T			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	1	T	4	2	Janthinobacterium	2	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	07.04.2020	1	T			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	GW	GW	07.04.2020	?	-	0	-	-	-	O
BL2	ZV LWV	TWA	O3	07.04.2020	?	-	0	-	-	-	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	B	11	2	Janthinobacterium	2	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	B			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	G	12	2	Flavobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	G			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	L	11	2	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	T	23	2	Acinetobacterium	2	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,05	T			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	T	17	2	Janthinobacterium	2	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,05	T			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	B	8	3	Janthinobacterium	3	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	B			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	B			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	G	16	3	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	G			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	G	2	2	Pseudomonas	1	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	G			no ID		n.b.

Medium	Zuordnung	Typ	Probe	Datum	Volumen [ml]	Phänotyp	Isolate/Filter	MALDI-TOF	Name	Identifiziert	Einordnung
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	L	12	3	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	L			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	L			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	L	12	3	no ID	1	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	L			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	L			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	T	25	3	Acinetobacter	3	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	T			Acinetobacter		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	16.06.2020	0,1	T			Sphingobacterium		O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	T	16	3	Pseudomonas	2	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	T			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	16.06.2020	0,1	T			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	GW	GW	16.06.2020	?	-	0	-	-	-	-
BL2	ZV LWV	TWA	O3	16.06.2020	?	-	0	-	-	-	-
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	G	1	1	no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	O	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	W	6	2	Bacillus	1	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,1	W			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,1	W	1	1	no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	B	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	G	4	2	Pseudomonas	1	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	G			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	O	4	2	Flavobacterium	2	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	O	2	2	Flavobacterium	2	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	O			Flavobacterium		O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	R	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	W	2	2	Bacillus	1	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	W	7	3	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	W	3	2	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	W	10	2	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	25.08.2020	0,5	W			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	10	O	3	3	no ID	2	n.b.
BL2	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	10	O			Flavobacterium		O
BL2	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	10	O			Flavobacterium		O
BL2	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	10	W	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	C	1	1	Bacillus	1	O
BL2	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	100	G	1	1	Pseudomonas	1	O
BL2	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	100	O	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	T	10	3	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	T			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	T			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	GW	GW	25.08.2020	100	W	1	1	Pseudomonas	1	O
BL2	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	W	4	2	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	O3	25.08.2020	100	W			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	C	2	2	no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,1	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,1	C	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	C	11	3	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C	14	3	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	0,5	R	3	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	0,5	R	1	0	no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	B	2	2	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	B			Janthinobacterium		O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	C	11	3	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	C	7	2	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	R	3	2	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	R			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	20.10.2020	1	R	10	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	20.10.2020	1	W	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	GW	GW	20.10.2020	10	B	1	1	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	TWA	O3	20.10.2020	100	C	1	1	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	C	2	2	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	C	2	2	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	C			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	R	3	3	no ID	0	n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	R			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	OW	Donau	01.12.2020	0,5	R			no ID		n.b.
BL2	ZV LWV	TWA	VorR	01.12.2020	0,5	T	1	1	Janthinobacterium	1	O
BL2	ZV LWV	GW	GW	01.12.2020	100	-	0	-	-	-	-
BL2	ZV LWV	TWA	O3	01.12.2020	100	-	0	-	-	-	-

Phänotypen lt. Abbildung 4-12

H= hygienisch relevant  
O= oligotroph  
n.b.= nicht bestimmbar

## 8.5 Rohdaten zur Long-Amplikon qPCR

### 8.5.1 Gensequenzen für das Primer-Design

Tabelle 8-13 Gensequenzen für das Design der LA Primer.

Gen	<i>intl1</i>
Gen Sequenz Template	ATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGCTACTTGCATTACAGCTTACCAACCGAACAGGCTTATGTCCACTGGGTTGCGCTTCA TCCGTTTTCCACGGTGTGCGTCAACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTGCT GGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCTTGTGTTT TTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTC GCGGGCGCTTGCCTGTGGTGTGACCCCGGATGAAGTGTTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGGC AGCATCGTTTGTTCGCCAGCTTCTGTATGGAACGGGCATGCGGATCAGTGAGGTTTGAACCTGC GGGTCAAGGATCTGGATTTTCGATCACGGCAGATCATCGTGCAGGAGGGCAAGGGCTCCAAGGATC GGGCCTTGATGTTACCCGAGAGCTTGGCACCCAGCCTGCGCGAGCAGCTGTCGCTGTCACGGGCA TGGTGGCTGAAGGACCAGGCGGAGGGCCGACGCGGCTTGGCTTCCCGACGCCCTTGGAGCGGA AGTATCCGCGCGCCGGGCACTTCCGCGCTGTTCTGGGTTTTTGGCGACACACGATTTCGACC GATCCACGGAGCGGTGTGCTGCGTGCATCACATGTATGACCAGACCTTTCAGCGCGCCTTCAA ACGTGCCTGAGAACAAGCAGGCATCACGAAGCCGCCACCCGACACCCCTCCGCCACTCGTTCCG GACGGCCTTGCCTCGCAGCGGTTACGACATTGAAACCGTGCAGGATCTGCTCGGCCATTCCGACG TCTCTACGACGATGATTTACACGCATGTGCTGAAAGTTGGCGGTGCCGGAGTGCCTCACCGCTTG ATGCGCTGCCGCCCTCACTAGTGAGAGGTA
Forward Primer (5'-3')	ATGAATACCGCCACTGCG
Reverse Primer (5'-3')	CTACCTCTCACTAGTGAGGAGC
Länge des Gens [bp]	1014
Länge des Amplikons [bp]	1014
In-Silico Annealing-Temperatur [°C]	58,5
CARD Link	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP078040.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP078040.1</a>

Gen	<i>blaTEM</i>
Gen Sequenz Template	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTC ACCCAGAAACGCTGGTGAAGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCAT TTTGCCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATAAGTTGGGT GCACGAGTGGGTTACATCGAGCTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCCGAAG AACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGGCGGATTTATCCCGTGTGACGCCG GGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCA GAAAAGCATCTTACGGATGCGATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAA CACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACA TGGGGGATCATGTAACCCGCTTGTGCTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGA GCGTGACACCAGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTA CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGGACCACTTCTGCG CTGCGCCCTTCCGGTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGATCTCGCGGT ATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGAAGCCCTCCCGTATCGTATGTTATCTACACGACGGGGAGTC AGGCAACTATGGATGAACGAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA
Forward Primer (5'-3')	ATGAGTATTCAACATTTCCG
Reverse Primer (5'-3')	TTACCAATGCTTAATCAG
Länge des Gens [bp]	861
Länge des Amplikons [bp]	861
In-Silico Annealing-Temperatur [°C]	47,5
CARD Link	<a href="https://card.mcmaster.ca/ontology/37254">https://card.mcmaster.ca/ontology/37254</a>

Gen	<i>sul1</i>
Gen Sequenz Template	ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTGAATCTCACCGAGGACTCCTTCTCGATGAGAGCCGGCGGCTAGACC CCGCCGGCGCTGTCAACCGCGGCGATCGAAATGCTGCGAGTCGGATCAGACGTCGTGGATGTCCGACCCG CCGCCAGCCATCCGGACGCGAGCCTGTATCGCCGGCCGATGAGATCAGACGATTTGCGCCGCTTTAG ACGCCCTGTCCGATCAGATGCACCGTGTTCATCGACAGCTTCCAACCGGAAACCCAGCGCTATGCGCT CAAGCGCGGCGTGGGCTACCTGAACGATATCCAAGGATTTCCGTGACCCCTGCGCTATCCCGATATTGCT GAGCGGACTGCAGGCTGGTGGTTATGCACTACGCGCAGCGGGATGGCATCGCCACCCGACCCGGTCC CTTGACCCGAAGACGCGCTCGACGAGATTGTGCGGTTCTTCGAGGCGCGGGTTTTCCGCTTGGACGG AGCGGGGTGCTGCCGACCGGCTCATCCTCGATCCGGGGATGGGATTTTTCTTGAAGCCCGCACCGGAA ACATCGCTGCACGTGCTGTCAACCTTCAAAGCTGAAGTCGGCGTTGGGGCTTCCGCTATTGGTCTCGG TGTCGGGAAATCCTTCTGGCGCCACCGTTGGCCTTCTGTAAGGATCTGGGTCCAGCGAGCCTTGC GCGGAACTTACCGGATCGGCAATGGCGCTGACTACGTCGCCACCCACGCGCTGGAGATCTGCGAAG CGCAATACCTTCTCGGAAACCTCGCGAAATTTGCGAGTCGCGACGCCAGAGACCGAGGGTTAGATCAT GCCTAG
Forward Primer (5'-3')	ATGGTGACGGTGTTCAGCAT
Reverse Primer (5'-3')	CTAGGCATGATCAACCCTCG
Länge des Gens [bp]	840
Länge des Amplikons [bp]	840
In-Silico Annealing-Temperatur [°C]	58,5
CARD Link	<a href="https://card.mcmaster.ca/ontology/36549">https://card.mcmaster.ca/ontology/36549</a>

Gen	<i>tetA</i>
Gen Sequenz Template	ATGAATAGTTCGACAAAAGATCGCATTGGTAATTACGTTACTCGATGCCATGGGGATTGCCCTTATCATG CCAGTCTTGCCAAACGTTATTACGTGAATTTATTGCTTCGGAAGATATCGCTAACCACTTTGGCGTATTG CTTGCACTTTATGCGTTAATGCAGGTTATCTTTGCTCCTTGGCTTGGAAAAATGCTGACCGATTGGT CGGCACCCAGTGTGTTGTTGTCATTAATAGGCGCATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTCAAGT GCGCTTTGGATGCTGTATTTAGGCCGTTTGTCTTCAGGGATCACAGGAGCTACTGGGGCTGTCGCGG CATCGGTCAATGCCGATACCACCTCAGCTTCTCAACGCGTGAAGTGGTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGT TTTGGCTTGGTTAATAGCGGGGCTATTATTGGTGGTTTGCAGGAGAGATTTACCGCATAGTCC CTTTTTATCGCTGCGTTGCTAAATATTGCTCCTTGTGGTTATGTTTTGGTTCCGTGAAACCAAA AATACACGTGATAATACAGATACCGAAGTAGGGGTTGAGACGCAATTGCAATTCGGTATACATCACTTTA TTAAAACGATGCCATTTTGTGATTATTTATTTTTCAGCGCAATTGATAGCCAAATCCCGCAACGG TGTGGGTGCTATTTACCGAAAATCGTTTTGGATGGAATAGCATGATGGTTGGCTTTTACATTAGCGGGT TTGGCTTTTACACTAGTATTCCAAGCCTTTGTGGCAGGAAGATAGCCACTAAATGGGGCAAAAAA CGGCAGTACTGCTCGATTATTGCAGATAGTAGTGCATTTGCCTTTTACGCTTTATATCTGAAGTTG GTTAGTTTTCCCTGTTTTAATTTTATTGGCTGGTGGTGGGATCGCTTACCTACATTACAGGGATGAT GTCTATCCAAACAAGAGTCATCAGCAAGGTGCTTACAGGGATTATTGGTGAAGCCTTACCAATGCAA CCGGTGTATTGGCCACTACTGTTGCTGTTATTTATAATCATTACTACCAATTTGGGATGGCTGGAT TTGATTATTGGTTTAGCGTTTTACTGTATTATTATCCTGCTATCGATGACCTTATGTTAAACCCCTCAA GCTCAGGGGAGTAAACAGGAGACAAGTCTTAG
Forward Primer (5'-3')	ATGAATAGTTCGACAAAAGATCGC
Reverse Primer (5'-3')	TAAGCACTTGTCTCCTGTTGAC
Länge des Gens [bp]	1206
Länge des Amplikons [bp]	1205
In-Silico Annealing- Temperatur [°C]	57,5
CARD Link	<a href="#">über Primer BLAST wieder gefunden LC521844.1</a>

Gen	<i>blaNDM-1</i>
Gen Sequenz Template	ATGGAATTGCCAATATTATGCACCCGGTCCGGAAGCTGAGCACCGCATTAGCCGCTGCATTGATGCT GAGCGGGTGCATGCCCGGTGAAATCCGCCCGACGATTGGCCAGCAAATGGAAGTGGCGACCAACG GTTTGGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCGAATGTCTGGCAGCACACTTCTATCTCGACATGC CGGGTTTCGGGGCAGTCGCTTCCAACGGTTTGTATCGTCAAGGATGGCGGCCGCTGCTGGTGGTGA TACCGCCTGGACCGATGACCAGACCGCCAGATCCTCAACTGGATCAAGCAGGAGATCAACCTGCCG GTCGCGCTGGCGGTGGTACTCACGCGCATCAGGACAAGATGGCGGTATGGACGCGCTGCATGCG GCGGGGATTGCGACTTATGCCAATGCGTTGTCGAACCAAGCTTGCCTGCAAGAGGGGATGGTTGCGG CGCAACACAGCCTGACTTTGCGCGCAATGGCTGGGTCGAACCAAGCAGCAGCCCAACTTTGGCCC GCTCAAGGTATTTACCCCGCCCGGCCACACCAAGTGAACAATCACCGTTGGGATCGACGGCACC GACATCGCTTTTGGTGGCTGCCTGATCAAGGACAGCAAGGCCAAGTCCGCTCGGCAATCTCGGTGATG CCGACACTGAGCACTACGCCGCTCAGCGCGCGCTTTGGTGCAGCGTTCCCAAGGCCAGCATGAT CGTATGAGCCATTCGCCCCCGATAGCCGCGCCGAATCACTCATACGGCCCGCATGGCCGACAAAG CTGCGCTGA
Forward Primer (5'-3')	TTGCCAGTATTATGCACGC
Reverse Primer (5'-3')	TCAGCGCAGCTTGTCCGC
Länge des Gens [bp]	813
Länge des Amplikons [bp]	803
In-Silico Annealing- Temperatur [°C]	61,5
CARD Link	<a href="https://card.mcmaster.ca/ontology/36728">https://card.mcmaster.ca/ontology/36728</a>

Gen	<i>blaCTX-M-32</i>
Gen Sequenz Template	ATGGTTAAAAAATCACTCGCTCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTACCGCTGTTGTTAGGAAGT GTGCCGCTGTATGCGCAAACGCGGACGTAACAGCAAAAACTTGCCGAATTAGAGCGGACGTCGGGAG GAAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCCGAAATACTTTATCGTGTGATGAGCGCTT TGCGATGTGCAGCACCAAGTAAAGTATGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAGCGAACCGA ATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCA CGTCGATGGGACGATGCTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCG ATGAATAAGCTGATTTCTCACGTTGGCGCCCGGCTAGCGTCACCGCTTCGCCCGACAGCTGGGAGA CGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCGGGGCGATCCGCGTGATA CCACTTCACTCGGGCAATGGCGCAAATCTGCGTAATCTGACGCTGGGTAAGCATTGGGTGACAGC CAACGGGCGCAGCTGGTACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGACGAGCATTACGGCTGGAC TGCTGCTTCCGTGGTTGTGGGGGATAAAACCGCGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCG GTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTACCCAGCCTCAACCTAAGGCA GAAAGCCGTCGCGATGATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTACCAACGGTTGTAA
Forward Primer (5'-3')	ATGGTTAAAGAATCACTGC
Reverse Primer (5'-3')	TTACAAACCGTTGGTGAC
Länge des Gens [bp]	876
Länge des Amplikons [bp]	876
In-Silico Annealing- Temperatur [°C]	52
CARD Link	<a href="https://card.mcmaster.ca/ontology/38294">https://card.mcmaster.ca/ontology/38294</a>

Gen	<i>blaOXA-48</i>
Gen Sequenz Template	ATGCGTGTATTAGCCTTATCGGCTGTGTTTTGGTGGCATCGATTATCGGAATGCCTGCGGTAGCAAA GGAATGGCAAGAAAACAAAAGTTGGAATGCTCACTTTACTGAACATAAAATCACAGGGCGTAGTTGTGCT CTGGAATGAGAATAAGCAGCAAGGATTTACCAATAATCTTAAACGGGCGAACAAGCATTTTACCCGC ATCTACCTTTAAATCCCAATAGCTTGATCGCCCTCGATTTGGGCGTGGTTAAGGATGAACACCAAGT CTTTAAGTGGGATGGACAGACGCGCGATATCGCCACTTGGAAATCGCGATCATAATCTAATCACCGCGA TGAAATATTGAGTTGTGCCTGTTTATCAAGAAATTTGCCCGCCAAATTTGGCGAGGCACGTATGAGCAAGA TGCTACATGCTTTGATTATGTAATGAGGACATTTCCGGCAATGTAGACAGTTTCTGGCTCGACGGT GGTATTGCAATTTCCGGCCACGGAGCAAATCAGCTTTTAAAGAAAAGCTGTATCACAATAAGTTACACGTA TCGGAGCGCAGCCAGCGTATTGTCAAACAAGCCATGCTGACCCGAAGCCAATGGTGACTATATTATTG GGCTAAAACCTGGATACTCGACTAGAATCGAACCTAAGATTGGCTGGTGGGTCGGTTGGGTTGAACCTG ATGATAATGTGGTGTGTTTTGGCGATGAATATGGATATGCCACATCGGATGGTTTAGGGCTGCGCCAA GCCATCACAAAAGAAGTGCTCAAACAGGAAAAAATTATCCCTAG
Forward Primer (5'-3')	ATGCGTGTATTAGCCTTATCGGC
Reverse Primer (5'-3')	GGAATAATTGTTTCTGTTTGAGCAC
Länge des Gens [bp]	798
Länge des Amplikons [bp]	795
In-Silico Annealing- Temperatur [°C]	56
CARD Link	<a href="https://card.mcmaster.ca/ontology/38182">https://card.mcmaster.ca/ontology/38182</a>

Gen	<i>blaVIM-2</i>
Gen Sequenz Template	ATGTTCAAACTTTTGAGTAAGTTATTGGTCTATTTGACCGCGTCTATCATGGCTATTGCGAGTCCGCTCGCT TTTTCCGTAGATTCTAGCGGTGAGTATCCGACAGTCAGCGAAATTCGGGTCCGGGAGGTCCGGCTTACCA GATTGCCGATGGTGTGGTGCATATCGCAACGACGTCGTTTGGTGGCGCAGTCTACCCGTCGAATGGTCT TCATTGTCCGTGATGGTATGAGTTGCTTTTATTGATACAGCGTGGGGTGCAGAAAACACAGCGGCACTT CTCGCGGAGATTGAGAAGCAAATGGACTTCTGTAAACGCGTGCAGTCTCCACGCACTTTCATGACGACCG CGTCCGGCGGCTTGTATGTCCTTCCGGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATCACCGTCGACACGCCGGT AGCCGAGGTAGAGGGGAACGAGATTCCACGCACTCTCTAGAAGGACTCTCATCGAGCGGGGACGCACT GCGTTCGCTCCAGTAGAAGTCTTCTATCCTGGTGTGCGCATTGACCGACAACCTAGTTGTGTACGTCC CGTCTGCGAGTGTGCTCTATGGTGGTGTGCGGATTTATGAGTTGTACGCGACGCTCTGCGGGGAACGTGGC CGATGCCGATCTGGCTGAATGGCCACCTCATTGAGCGGATTCAACAACACTACCCGGAAGCACAGTTT GTCAATCCGGGGCACGGCCTGCCGGCGGTCTAGACTTGTCAAGCACACAACGAATGTTGTAAGGCGC ACACAAATCGCTCAGTCTGAGTAG
Forward Primer (5'-3')	ATGTTCAAACTTTTGAGTAAGTT
Reverse Primer (5'-3')	CTACTCAACGACTGAGCGACTTG
Länge des Gens [bp]	801
Länge des Amplikons [bp]	801
In-Silico Annealing- Temperatur [°C]	52,5
CARD Link	<a href="https://card.mcmaster.ca/ontology/38672">https://card.mcmaster.ca/ontology/38672</a>

Gen	<i>blaCMY-2</i>
Gen Sequenz Template	ATGATGAAAAATCGTTATGCTGCGCTCTGCTGCTGACAGCCTTTTCTCCACATTTGCTGCCGCAAAAACA GAACAACAGATTGCCGATATCGTTAATCGCACCATCACCCCGTTGATGCAGGAGCAGGCTATTCCGGGTAT GGCCGTTGCCGTTATCTACCAGGGAAAACCTATTATTTACAGCTGGGGTAAAGCCGATATCGCCAATAACC ACCCAGTCACGCAGCAAACGCTGTTGAGCTAGGATCGGTTAGTAAGACGTTTAAACGGCGTGTGGGCGG CGATGCTATCGCCCGCGGGCAAAATTAAGCTCAGCGATCCGGTACGAAATACTGGCCAGAAGTGCAGGCG AAACAGTGGCAGGGTATCCGCTGCTGCACTTAGCCACCTATACGGCAGGCGGCCATCCGCTGCAGATCC CCGATGAGTTAGGGATAAAGCCGCACTTACTGCAATTTTATCAAACCTGGCAGCCGAATGGACTCCGGGC GCTAAGCGACTTACGCTAACTCCAGCATTGGTCTGTTTGGCGCGTGGCGGTGAAACCCCTCAGGAATGA GTTACGAAAGAGGCAATGACCAGACGCGCTCCTGCAACCATTAACCTGGCGCATACCTGGATTACGTTCC GCAGAACGAACAAAAGATTATGCCTGGGGCTATCGCGAAGGGAAGCCGTACACGTTTCTCCGGGACAA CTTGACGCCGAAGCCTATGGCGTGAATCCAGCGTTATTGATATGGCCCGTGGGTTACAGCCAAACATGG ATGCCAGCCACGTTACAGGAGAAAACGCTCCAGCAGGGCATTGCGCTTGCAGCTCTCGCTACTGGCGTAT TGCGGATATGTACCAGGGATTAGGCTGGGAGATGCTGAACTGGCCGCTGAAAGCTGATTGCATCATCAAC GGCAGCGACAGCAAAGTGGCATTGGCAGCGCTTCCCGCGTTGAGGTAACCCGCCCCGCCCGCCGAGTG AAAGCCTCATGGGTGCATAAAAACGGGCTCCACTGGTGGATTTGCGAGCTACGTAGCCTTCGTTCCAGAAAA AAACCTTGGCATCGTATGCTGGCAAACAAAAGCTATCCTAACCTGTCCGTGTCGAGGCGGCTGGCGC ATTCTTGAAAAGCTGCAATAA
Forward Primer (5'-3')	ATGATGAAAGAATCGTTATGCTGCG
Reverse Primer (5'-3')	TTATTGACGCTTCTCAAGAATG
Länge des Gens [bp]	1146
Länge des Amplikons [bp]	1146
In-Silico Annealing- Temperatur [°C]	52,5
CARD Link	<a href="https://card.mcmaster.ca/ontology/38413">https://card.mcmaster.ca/ontology/38413</a>

Gen	<i>mecA</i>
Gen Sequenz Template	ATGAAAAAGATAAAAAATTGTTCCACTTATTTTAAATGTTGTAGTTGTCGGGTTTGGTATATATTTTTATGCTTCAAAAAGATAAAGAAATTAATAACTATTGATGCAATTGAAGATAAAAAATTTCAAACAAGTTTATAAAGATAGCAGTTATATTTCTAAAAGCGATAATGGTGAAGTAGAAATGACTGAACGTCGGATAAAAAATATAATAGTTTAGGCGTTAAAGATAAAAACATTCAGGATCGTAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAAATAAAAATTAACAACACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTAATTTGTTAAAGAAGATGGTATGTGGAAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCTATTATTCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCATACATATTGAAAAATTAAAAATCAGAACGTGGTAAAAATTTAGACCGAAAACAATGTGGAATTTGGCCAATACAGGAACAGCATATGAGATAGGCATCGTTCCAAAGAATGTATCTAAAAAAGATTATAAAGCAATCGCTAAAGAATAAGTATTTCTGAAGACTATATCAAACAACAATGGATCAAAAATTTGGGTACAAGATGATACCTTCGTTCCACTTAAAAACCGTTAAAAAATGAGATGAATTTAAGTGATTTTCGCAAAAAAATTTTCATCTTACAACATAAGTAAACAAAAAGTCGTAACATATCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTATTAGTTATGTTGGTCCCATTAACCTGGAAGAATTAACAACAAAAAGAATATAAAGGGCTATAAAGATGATGCAAGTTATTTGGTAAAAAGGGACTCGAAAAACTTTACGATAAAAAAGCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTCAACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATCGCACATACATTAATAGAGAAAGAAAAAAGATGGCAAGATATTCACACTAATGATGCTAAAGTTCAAAGACTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAGGTAAGTACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTTAGCACTTGTAAAGCACACCTTCATATGACGCTATCCATTTATGTATGGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAAATTAACCGAAGATAAAAAAAGAACCTCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACAACCTCACCAGTTCAACTCAAAAAATTAACAGCAATGATTGGTTAAATAACAACAACATTAGACGATAAAAAAAGTTATAAAAAATCGATGGTAAAGTTGGCAAAAAAGATAAACTTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATGAAGTGGTAAATGGTAATATCGACTTAAAAACAAGCAATAGAATCATCAGATAACATTTTCTTTGCTAGAGTAGCACTCGAATTAGGCAGTAAGAATTTGAAAAAGGCATGAAAAACTAGGTGTTGGTGAAGATATACCAAGTGATTATCCATTTTAATGCTCAAATTTCAAACAAAAAATTTAGATAATGAAATATTATAGCTGATTACAGTTACGGACAAGGTGAAATACTGATTAAACCCAGTACAGATCCCTTTCAATCTATAGCGCATTAGAAAAATGGCAATTAACGCACCTCACTTATTAAGACACGAAAAACAAGTTTGGAAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAAATCAATCTATTAACCTGATGGTATGCAACAAGTCGTAATAAAACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAAATCCGGTACTGCAGAACTCAAATGAAAACAAGGAGAACTGGCAGACAATTTGGTGGTTTATATCATATGATAAAGATAATCCAACATGATGATGGCTATTAATGTTAAAGATGTACAAGATAAAGGAATGGCTAGCTACAATGCCAAAATCTCAGGTAAGGTGATGATGAGCTATATGAGAACGGTAATAAAAAATACGATATAGATGAATAA
Forward Primer (5'-3')	ATGAACAAGATAAGAATTGTTCC
Reverse Primer (5'-3')	TCTATATCGTATTTGTTATTACCG
Länge des Gens [bp]	2007
Länge des Amplikons [bp]	2000
In-Silico Annealing-Temperatur [°C]	52,5

CARD Link

<https://card.mcmaster.ca/ontology/36911>

### 8.5.2 Rohdaten der Behandlungsexperimente zum Vergleich von LA und konventioneller qPCR

Tabelle 8-14 Chlor-Messwerte, Kulturverfahren und PCR Long und Short Amplikon Ergebnisse der Chlorbehandlung eines Modellwassers mit *E. coli* und freier DNA.

Nr.	Freies Chlor <sub>gem.</sub>	CCA <i>E. Coli</i>	<i>blaTEM</i> LA (iDNA)	<i>blaTEM</i> SA (iDNA)	<i>sul1</i> LA (eDNA)	<i>sul1</i> SA (eDNA)	
	[mg/L]	[KBE/10 mL]	[GC/mL]	[GC/mL]	[GC/mL]	[GC/mL]	
Ansatz I	6	1,38	< 1	< BG	3,27E+02	2,05E+04	2,25E+04
	5	1,00	< 1	< BG	1,93E+02	2,15E+04	4,04E+05
	4	0,82	< 1	< BG	3,42E+02	2,11E+04	3,03E+06
	3	0,58	< 1	< BG	4,52E+02	4,72E+04	1,03E+07
	2	0,22	< 1	2,99E+02	1,84E+02	3,00E+06	1,32E+08
	1	0,08	< 1	3,30E+02	3,55E+02	1,26E+09	1,00E+09
	0	0,00	430000	6,54E+02	4,59E+02	1,82E+09	1,15E+09
	H	0,00	-	1,02E+03	4,11E+02	1,31E+09	5,80E+08
	Ansatz II	6	1,37	< 1	< BG	4,94E+02	8,85E+03
5		0,98	< 1	< BG	1,89E+02	2,00E+04	6,00E+05
4		0,82	< 1	< BG	1,85E+02	1,45E+04	2,16E+06
3		0,60	< 1	< BG	4,70E+02	3,64E+04	8,85E+06
2		0,22	< 1	8,46E+01	3,04E+02	8,57E+05	1,04E+08
1		0,03	< 1	1,24E+02	5,86E+02	1,39E+09	6,36E+08
0		0,00	530000	1,26E+03	6,05E+02	1,89E+09	9,02E+08
H		0,00	-	4,13E+02	7,40E+02	1,41E+09	5,45E+08
Mittelwert				[KBE/mL]		[Log <sub>10</sub> (GC/mL)]	
	6	1,38	0	< BG	2,6	4,2	4,1
	5	0,99	0	< BG	2,3	4,3	5,7
	4	0,82	0	< BG	2,4	4,3	6,4
	3	0,59	0	< BG	2,7	4,6	7,0
	2	0,22	0	2,3	2,4	6,3	8,1
	1	0,05	0	2,4	2,7	9,1	8,9
	0	0,00	48000	3,0	2,7	9,3	9,0
	H	0,00	-	2,9	2,8	9,1	8,8
STABW	6	0,01	0	0,00	0,13	0,26	0,48
	5	0,01	0	0,00	0,01	0,02	0,12
	4	0,00	0	0,00	0,19	0,12	0,10
	3	0,01	0	0,00	0,01	0,08	0,05
	2	0,00	0	0,39	0,15	0,38	0,07
	1	0,00	0	0,30	0,15	0,03	0,14
	0	0,04	7071	0,20	0,08	0,01	0,07
	H	0,00	-	0,28	0,18	0,02	0,02

Tabelle 8-15 Kulturverfahren und PCR Long und Short Amplikon (LA und SA) Ergebnisse der UV-Behandlung eines Modellwassers mit *E. coli* und freier DNA.

Nr.	UV-Dosis	CCA <i>E. Coli</i>	<i>blaTEM</i> LA (iDNA)	<i>blaTEM</i> SA (iDNA)	<i>sul1</i> LA (eDNA)	<i>sul1</i> SA (eDNA)	
	[J/m <sup>2</sup> ]	[KBE/10 mL]	[GC/mL]	[GC/mL]	[GC/mL]	[GC/mL]	
Ansatz I	1	0	6000	2,77E+04	4,24E+03	4,31E+08	2,56E+08
	2	25	37	3,56E+03	1,07E+03	4,68E+08	3,06E+08
	3	50	22	9,17E+03	4,02E+02	3,77E+08	3,31E+08
	4	75	13	3,19E+03	6,59E+02	3,87E+08	3,14E+08
	5	100	1	1,36E+03	4,85E+02	2,71E+08	3,22E+08
	6	150	9	4,08E+03	5,46E+02	1,60E+08	2,49E+08
	7	200	6	6,28E+03	3,56E+03	1,71E+08	2,90E+08
	8	300	0	3,02E+03	1,72E+03	9,85E+07	2,28E+08
	9	400	1	< BG	3,23E+02	6,06E+07	2,10E+08
	10	600	1	< BG	3,45E+02	1,75E+07	1,54E+08
	11	800	0	< BG	2,69E+02	1,02E+07	1,50E+08
	H	0	-	1,95E+03	6,25E+02	7,37E+08	3,19E+08
Ansatz II	1	0	37000	1,07E+04	2,25E+03	5,24E+08	3,23E+08
	2	25	58	2,70E+03	8,44E+02	3,28E+08	2,85E+08
	3	50	21	8,61E+03	2,41E+03	3,55E+08	2,91E+08
	4	75	23	1,22E+03	9,06E+02	2,84E+08	3,51E+08
	5	100	12	4,39E+03	1,43E+03	2,48E+08	2,93E+08
	6	150	5	1,70E+03	1,52E+03	1,75E+08	3,25E+08
	7	200	3	5,18E+03	1,92E+03	1,26E+08	2,35E+08
	8	300	2	4,22E+02	1,26E+03	7,91E+07	2,49E+08
	9	400	2	4,72E+02	1,46E+03	5,11E+07	1,96E+08
	10	600	3	< BG	2,01E+03	2,99E+07	1,63E+08
	11	800	1	< BG	2,56E+03	1,22E+07	1,30E+08
	H	0	-	-	-	-	-
Mittelwert			[KBE/mL]	[Log <sub>10</sub> (GC/mL)]			
	1	0	21500	4,28	3,51	8,68	8,46
	2	25	4,8	3,50	2,98	8,60	8,47
	3	50	2,2	3,95	3,15	8,56	8,49
	4	75	1,8	3,34	2,89	8,53	8,52
	5	100	0,7	3,46	2,98	8,41	8,49
	6	150	0,7	3,46	3,01	8,22	8,46
	7	200	0,5	3,50	3,44	8,17	8,42
	8	300	0,1	3,24	3,17	7,95	8,38
	9	400	0,2	0,00	2,95	7,75	8,31
	10	600	0,2	0,00	3,07	7,37	8,20
	11	800	0,1	0,00	3,18	7,11	8,19
H	0	-	3,29	2,80	8,87	8,50	
STABW	1	0	2192	0,29	0,20	0,06	0,07
	2	25	1,48	0,09	0,07	0,11	0,02
	3	50	0,07	0,02	0,55	0,02	0,04
	4	75	0,71	0,29	0,10	0,10	0,03
	5	100	0,78	0,36	0,33	0,03	0,03
	6	150	0,28	0,00	0,31	0,03	0,08
	7	200	0,21	0,06	0,19	0,09	0,06
	8	300	0,14	0,60	0,10	0,07	0,03
	9	400	0,07	0,00	0,46	0,05	0,02
	10	600	0,14	0,00	0,54	0,16	0,02
	11	800	0,07	0,00	0,52	0,11	0,07
	H	0	-	-	-	-	-

Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 10 GC pro qPCR Reaktion

## 8.6 Rohdaten zur Elimination von Antibiotikaresistenzgenen

### 8.6.1 qPCR Rohdaten zur Trinkwasseraufbereitung am Tai See

Tabelle 8-16 Rohdaten der Wasserwerks-Proben aus China. LA= Long Amplikon.

Kampagne	Datum	Probenart	Abkürzung	Behandlung	Genkopien/mL										
					16 S	<i>int1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaCTX-M-32</i>	<i>blaNDM-1</i>	<i>mecA</i>	<i>mcr-1</i>	<i>sul1 LA</i>	
Nov 18	23.11.2018	TWA	Wu A	Z	1,1E+06	1,9E+03	1,1E+04	3,8E+03	1,3E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.	
			Wu C	K	8,8E+05	1,7E+03	1,4E+04	2,4E+03	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.	
			Wu D	Sed	1,9E+05	7,9E+02	3,2E+03	2,5E+03	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.	
			Wu E	SF	1,1E+05	7,5E+01	1,1E+04	9,5E+02	2,1E+01	< BG	3,5E+01	< BG	< BG	n.a.	
			Wu F	Post-O3/GAC	5,1E+03	3,5E+00	2,1E+03	6,9E+00	8,8E+00	< BG	5,1E+01	< BG	< BG	n.a.	
			Wu G	Cl/FW	9,7E+01	1,8E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.	
Mrz 19	21.03.2019	TWA	Wu A	Z	6,2E+06	2,3E+03	3,0E+03	2,1E+03	2,1E+03	< BG	< BG	1,3E+02	< BG	5,9E+02	
			Wu C	K	1,9E+06	2,3E+03	3,4E+03	2,2E+03	1,7E+03	< BG	< BG	< BG	< BG	1,9E+03	
			Wu D	Sed	1,7E+05	2,1E+02	8,0E+02	9,4E+01	9,9E+02	< BG	< BG	5,3E+01	< BG	1,1E+02	
			Wu E	SF	1,2E+05	2,1E+02	8,1E+02	5,4E+01	1,1E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	9,9E+02	
			Wu F	Post-O3/GAC	1,3E+04	2,4E+02	6,7E+02	< BG	5,2E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	1,4E+03
			Wu G	Cl/FW	4,3E+02	2,2E+01	6,4E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
25.03.2019	TWA	SC A	Z	3,4E+06	8,4E+03	1,6E+04	6,0E+03	1,9E+02	1,0E+02	< BG	< BG	< BG	1,1E+04		

			SC B	Pre-O3	2,3E+06	6,4E+03	1,1E+04	5,0E+03	1,5E+01	8,0E+01	< BG	5,5E+01	< BG	4,0E+03
			SC C	K	2,2E+06	4,9E+03	8,7E+03	4,1E+03	1,5E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	3,5E+03
			SC D	Sed	9,7E+05	6,3E+03	1,2E+04	4,6E+03	2,7E+02	4,1E+01	< BG	< BG	< BG	4,5E+03
			SC E	SF	6,7E+05	8,1E+02	2,3E+03	1,1E+03	1,1E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	5,8E+02
			SC F	Post-O3	2,5E+04	1,0E+01	5,9E+01	4,9E+01	1,3E+02	3,9E+01	< BG	< BG	< BG	< BG
			SC G	BAC	2,5E+05	2,6E+01	1,4E+02	3,0E+02	1,1E+02	4,7E+01	< BG	< BG	< BG	4,2E+01
			SC H	Cl/FW	7,0E+02	< BG	< BG	< BG	2,1E+01	3,8E+00	< BG	< BG	< BG	< BG
29.03.2019	TWA		SIP A	Z	1,2E+07	4,2E+03	4,9E+03	8,7E+03	6,1E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	3,3E+03
			SIP B	Pre-O3	1,2E+07	6,1E+03	6,2E+03	1,4E+04	< BG	6,6E+01	< BG	< BG	< BG	2,2E+04
			SIP D	Sed	3,3E+05	6,6E+02	2,2E+03	3,9E+02	4,2E+01	7,4E+02	< BG	< BG	< BG	1,3E+02
			SIP F	Post-O3	4,0E+05	2,6E+03	1,8E+03	2,1E+03	4,4E+01	2,5E+02	< BG	< BG	< BG	4,8E+03
			SIP G	BAC	2,8E+05	3,0E+02	5,3E+02	9,9E+02	4,7E+00	1,4E+02	< BG	< BG	< BG	2,4E+02
			SIP H	Cl/FW	3,5E+05	3,3E+02	6,3E+02	1,0E+03	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Aug 19	23.08.2019	TWA	SC A	Z	2,3E+06	5,2E+03	4,6E+03	5,1E+03	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	6,7E+03
			SC B	Pre-O3	2,4E+06	1,1E+04	5,4E+03	7,0E+03	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	1,2E+04
			SC C	K	3,3E+06	2,2E+04	1,1E+04	1,1E+04	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	2,4E+04
			SC D	Sed	2,6E+06	1,3E+04	1,1E+04	8,3E+03	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	2,1E+04
			SC E	SF	1,1E+06	4,4E+03	3,7E+03	2,8E+03	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	3,0E+04
			SC F	Post-O3	3,4E+05	1,5E+02	1,6E+02	5,9E+03	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	2,3E+02
			SC G	BAC	3,0E+05	4,0E+02	9,5E+02	1,7E+03	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	2,0E+02
			SC H	Cl/FW	8,6E+02	3,8E+01	< BG	6,0E+00	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	< BG
29.08.2019	TWA		SIP A	Z	6,2E+06	3,7E+03	1,9E+04	7,1E+03	1,4E+02	3,4E+02	n.a.	< BG	5,7E+01	5,1E+03
			SIP B	Pre-O3	5,0E+06	1,8E+04	4,8E+04	2,7E+04	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	1,7E+04
			SIP C	K	1,5E+06	7,1E+02	7,1E+03	9,6E+02	< BG	6,8E+01	n.a.	< BG	< BG	4,6E+02
			SIP D	Sed	2,1E+05	9,2E+02	2,8E+03	8,1E+01	< BG	< BG	n.a.	< BG	1,7E+01	8,8E+02
			SIP E	SF	6,3E+05	7,6E+02	3,3E+03	5,1E+03	8,6E+01	7,5E+01	n.a.	< BG	4,9E+00	1,8E+03
			SIP F	Post-O3	1,5E+06	8,3E+02	1,4E+04	3,7E+03	4,0E+01	4,0E+01	n.a.	< BG	< BG	4,5E+03
			SIP G	BAC	3,9E+04	5,5E+01	2,4E+02	2,8E+01	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	1,4E+02
			SIP H	Cl/FW	1,7E+04	1,1E+01	1,3E+02	< BG	3,4E+01	6,8E+01	n.a.	< BG	< BG	< BG
			SIP I	V	6,8E+03	8,5E+00	1,2E+02	< BG	9,7E+01	3,0E+01	n.a.	< BG	< BG	1,6E+02

Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 10 GC pro qPCR Reaktion

n.a. = nicht analysiert

## 8.6.2 qPCR Rohdaten zur Trinkwasseraufbereitung in Deutschland

Tabelle 8-17 Rohdaten der Trinkwasseraufbereitungs-Proben aus Deutschland. LA= Long Amplikon.

Probenart	Datum	ProbenID	Bezeichnung	GC/mL												
				16S	int1	su1	su2	blaTEM	blaCTX-M-32	blaNDM-1	blaCMY-2	blaVIM-2	mcr-1	mecA	blaTEM LA	
GWA	16.10.2019	20	OW	5,9E+04	5,1E+04	5,6E+02	1,5E+02	< BG	< BG	9,5E+01	2,8E+02	4,4E+02	< BG	2,2E+01	n.a.	
		23	OGW	1,4E+03	3,5E+00	3,7E+00	2,6E+00	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.	
		29	GW	3,7E+02	< BG	< BG	5,2E+00	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	1,1E+01	n.a.
		24	TWA	1,8E+03	5,2E+00	< BG	1,0E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.
TWA	17.02.2020	Donau	OW	1,2E+06	1,5E+04	3,1E+03	6,8E+02	1,5E+02	< BG	6,0E+01	2,8E+02	< BG	< BG	< BG	1,1E+02	
		nach VorR	Floc./Sed	1,8E+06	1,8E+04	5,9E+03	6,0E+02	9,3E+01	< BG	< BG	< BG	3,3E+00	< BG	< BG	8,4E+01	
		nach O3	O3	1,7E+04	1,5E+01	1,5E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	2,8E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	
		GW	GW	< BG	< BG	n.a.	n.a.	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
07.04.2020		Donau	OW	2,1E+06	1,2E+04	3,1E+02	3,4E+02	6,1E+01	< BG	< BG	1,1E+02	n.a.	< BG	6,0E+01	< BG	
		nach VorR	Floc./Sed	2,2E+06	1,0E+04	2,8E+02	2,0E+02	1,2E+02	< BG	< BG	5,8E+01	n.a.	< BG	4,0E+01	3,0E+01	
		nach O3	O3	6,3E+03	9,0E+01	3,0E+00	1,4E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.	< BG	2,4E+01	< BG	
		GW	GW	< BG	< BG	n.a.	n.a.	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.			n.a.	
16.06.2020		Donau	OW	1,1E+06	8,3E+03	1,2E+03	5,8E+02	2,2E+02	< BG	5,8E+00	1,3E+02	n.a.	< BG	1,3E+01	< BG	
		nach VorR	Floc./Sed	1,2E+05	1,2E+03	2,9E+02	7,3E+01	9,0E+01	< BG	< BG	2,7E+01	n.a.	< BG	8,7E+00	2,7E+02	

	nach O3	O3	5,9E+03	1,9E+01	1,3E+01	3,9E+00	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.	< BG	3,1E+01	< BG
	GW	GW	1,3E+02	3,1E+00	n.a.	n.a.	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.			n.a.
25.08.2020	Donau	OW	1,3E+06	1,1E+04	1,4E+03	2,4E+02	1,2E+02	< BG	< BG	4,1E+01	n.a.	< BG	< BG	1,5E+01
	nach VorR	Floc./Sed	1,2E+06	1,1E+04	2,2E+03	1,5E+02	1,5E+02	< BG	< BG	4,3E+01	n.a.	< BG	< BG	3,9E+01
	nach O3	O3	1,1E+04	2,6E+03	1,6E+03	2,7E+00	5,4E+01	< BG	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	< BG
	GW	GW	3,7E+01	3,8E+00	n.a.	n.a.	< BG	< BG	< BG	2,1E+01	n.a.			n.a.
20.10.2020	Donau	OW	1,5E+07	8,1E+03	4,9E+02	2,2E+02	9,7E+01	< BG	< BG	3,5E+02	< BG	< BG	3,5E+01	< BG
	nach VorR	Floc./Sed	1,2E+07	7,1E+03	8,5E+02	1,5E+02	5,4E+02	3,8E+00	< BG	2,5E+02	< BG	< BG	1,5E+01	5,9E+01
	nach O3	O3	1,0E+05	< BG	4,1E+00	1,4E+00	3,5E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	9,7E+00	< BG
	GW	GW	2,3E+02	< BG	n.a.	n.a.	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG			n.a.
01.12.2020	Donau	OW	8,3E+06	6,4E+03	2,1E+03	2,5E+02	< BG	< BG	< BG	7,2E+01	< BG	< BG	9,1E+01	n.a.
	nach VorR	Floc./Sed	1,1E+07	1,2E+04	3,3E+03	3,0E+02	< BG	< BG	< BG	1,2E+02	< BG	< BG	1,2E+02	n.a.
	nach O3	O3	1,6E+05	< BG	9,5E+01	2,7E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	5,9E+01	n.a.
	GW	GW	6,9E+02	< BG	n.a.	n.a.	< BG	< BG	< BG	3,7E+01	< BG			n.a.
24.08.2021	Donau	OW	3,2E+06	2,9E+04	2,2E+03	9,8E+01	4,3E+01	< BG	< BG	1,4E+02	< BG	< BG	n.a.	4,7E+01
	nach VorR	Floc./Sed	1,1E+06	9,6E+03	1,7E+03	2,8E+01	5,1E+01	< BG	< BG	1,6E+02	< BG	< BG	n.a.	2,1E+01
	nach O3	O3	3,8E+04	8,6E+01	8,9E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	3,2E+00	< BG	< BG	n.a.	< BG

Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 10 GC pro qPCR Reaktion

### 8.6.3 Rohdaten der Labor-Experimente zum Antibiotikaresistenzgenen-Rückhalt durch Ultrafiltration und Dichte-Ultrafiltration

Tabelle 8-18 qPCR Messdaten des Filtrationsexperiments zur Untersuchung des Rückhalts unterschiedlich großer Genfragmente durch die unbeschichtete Ultrafiltrations-Membranpore.

	Feed	Filtrationsvolumen [mL]				
		133	265	398	521	654
<b>16S (1500 nt)</b>	8,9E+04	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
<b>vanA (1030 nt)</b>	8,0E+03	2,1E+01	1,6E+02	3,1E+01	< BG	< BG
<b>sul2 (722 nt)</b>	3,6E+05	1,7E+03	1,9E+04	2,7E+03	1,1E+03	1,9E+02
<b>ermB (405 nt)</b>	1,8E+05	5,5E+03	2,4E+04	4,0E+03	3,2E+03	6,3E+02
<b>int1 (196 nt)</b>	2,0E+05	2,9E+04	9,4E+04	1,2E+04	2,2E+04	4,7E+03
<b>mecA (91 nt)</b>	2,7E+05	9,0E+04	2,2E+05	5,4E+04	8,3E+04	2,6E+04

alle Werte in GC/µL

Tabelle 8-19 Ergebnisse der Retentions-Berechnungen und des Siebkoeffizienten. Die Werte für die Genkopien im Permeat wurden dabei aus einer gepoolten Misch-Permeat-Probe der unbeschichteten Membran ermittelt.

Fragmentgröße [bp]	dsDNA MW [kDa]	Retention, 1-c <sub>p</sub> /c <sub>i</sub>	Retention [%]	Siebkoeffizient S <sub>0</sub>
1500	941,4	1,00	100,00	0,008
1030	640,6	1,00	99,94	0,001
722	445,6	0,96	95,91	0,006
405	263,2	0,92	92,01	0,028
196	121,2	0,72	71,99	0,109
91	56,4	0,67	67,27	0,263

Tabelle 8-20 Vergleich der Summe aller Genkopien (absolut) in Feed, Retentat und Permeat der drei Membranen.

	Summe aller Genkopien		
	Feed	Retentat	Permeat
<b>unbeschichtet</b>	1,7E+11	9,6E+10	2,8E+09
<b>4DL</b>	3,2E+11	9,9E+06	< BG
<b>4,5DL</b>	8,3E+10	5,2E+08	< BG

Tabelle 8-21 Genkopien nach Inkubationsexperiment und Analyse der verschiedenen Fraktionen Membran-assoziierte ARG, im Überstand detektierte ARG und abgebaute ARG. DL= Doublelayer.

	Start	unbeschichtet			4DL			4,5DL		
		Membran-ass.	Überstand	Abgebaut*	Membran-ass.	Überstand	Abgebaut*	Membran-ass.	Überstand	Abgebaut*
16S (1500 nt)	2,2E+10	< BG	0,0E+00	1,9E+10	7,5E+08	0,0E+00	1,9E+10	3,1E+06	0,0E+00	1,9E+10
vanA (1030 nt)	1,1E+10	0,0E+00	4,9E+09	7,6E+09	4,9E+09	1,6E+08	7,6E+09	2,4E+07	2,6E+09	7,6E+09
sul2 (722 nt)	3,7E+10	1,6E+04	1,4E+10	2,3E+10	1,0E+10	8,1E+08	2,3E+10	6,7E+07	1,1E+10	2,3E+10
ermB (405 nt)	4,9E+10	4,2E+04	3,0E+10	1,6E+10	2,1E+10	1,9E+09	1,6E+10	1,2E+08	1,7E+10	1,6E+10
int1 (196 nt)	1,1E+11	1,6E+05	7,6E+10	4,0E+10	5,2E+10	1,6E+09	4,0E+10	4,0E+08	7,3E+10	4,0E+10
mecA (91 nt)	2,7E+11	2,5E+05	2,9E+11	1,4E+10	1,2E+11	6,5E+10	1,4E+10	1,4E+09	1,4E+11	1,4E+10

\*berechnet durch nachgewiesene Reduktion der Genfragmente in Negativkontrolle ohne Membran

### 8.6.4 qPCR Rohdaten der Pilot-Kampagnen zum Rückhalt von Antibiotikaresistenzgenen mittels Dichte-Ultrafiltration

Tabelle 8-22 Rohdaten der Pilot-Kampagnen zum Rückhalt von ARG mittels Dichte-Ultrafiltration.

		GC/mL												
		16S	int1	sul1	sul2	blaCMY-2	blaTEM	blaCTX-M-32	blaSHV	blaNDM-1	blaOXA-48	blaKPC-3	blaVIM-2	mcr-1
Wujiang Nov 18	Z	1,1E+06	1,9E+03	1,1E+04	3,8E+03	n.a.	1,3E+02	< BG	n.a.	< BG	n.a.	n.a.	n.a.	< BG
	LINIE-1	< BG	< BG	< BG	< BG	n.a.	< BG	< BG	n.a.	< BG	n.a.	n.a.	n.a.	< BG
	LINIE-2 UF	1,1E+01	< BG	< BG	< BG	n.a.	2,2E+01	< BG	n.a.	1,2E+02	n.a.	n.a.	n.a.	< BG
	LINIE-2 NF	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Wujiang Mrz 19	Z	1,2E+07	7,5E+02	2,1E+03	4,7E+03	n.a.	1,7E+02	< BG	n.a.	< BG	n.a.	n.a.	n.a.	< BG
	LINIE-1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	LINIE-2 UF	2,8E+04	2,4E+02	6,6E+01	< BG	n.a.	< BG	< BG	n.a.	< BG	n.a.	n.a.	n.a.	< BG
	LINIE-2 NF	1,3E+03	5,3E+00	5,3E+00	< BG	n.a.	< BG	< BG	n.a.	< BG	n.a.	n.a.	n.a.	< BG
Ruhr Sep 20	Z	1,6E+07	1,4E+05	5,2E+04	2,7E+02	< BG	2,1E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	UF	2,8E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	DUF	2,2E+02	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Alz Aug 21	Z	3,1E+06	1,4E+04	2,9E+03	3,1E+02	2,4E+02	5,8E+01	< BG	< BG	< BG	2,6E+04	< BG	< BG	< BG
	UF	8,5E+01	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
	DUF	9,8E+01	< BG	2,2E+00	< BG	2,0E+00	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG

Bestimmungsgrenze (BG) liegt bei 10 GC pro qPCR Reaktion

n.a. = nicht analysiert  
n.b. = nicht beprobt

Tabelle 8-23 Identifikation der gewachsenen Isolate vor und nach Membranfiltration (Pilot-Kampagne an der Alz, August 2021)

Probe	Medium	KBE/mL	Gattungen	Arten*	hyg. Relevanz?*
Z	ChromESBL	1,4	Acinetobacter	pittii	nein
			Acinetobacter	baumanii	ja
			Acinetobacter	dijkshoorniae	nein
			Citrobacter	freundii	pot
			Enterobacter	cloacae	ja
			Escherichia	coli	ja
			Klebsiella	oxytoca	pot
			Pseudomonas	otitidis	nein
			Acinetobacter	johnsonii	nein
			Acinetobacter	towneri	nein
			Acinetobacter	kookii	nein
			Acinetobacter	dispersus	nein
			Aeromonas	hydrophila	nein
			Aeromonas	media	nein
			Chryseobacterium		nein
			Citrobacter	freundii	pot
			Pseudomonas		nein
Pseudomonas	cichorii	nein			
UF	ChromESBL	2,4	Flavobacterium		nein
			Pseudomonas		nein
			Pseudomonas	putida	nein
			Pseudomonas	putida	nein
			Herbaspirillum		nein
R2A	ChromESBL	222,7	Pseudomonas		nein
			Acidovorax	temerans	nein
			Pseudomonas	putida	nein
			Pseudomonas	putida	nein
			Herbaspirillum		nein
BL1	ChromESBL	200,0	Pseudomonas		nein
			Pseudomonas		nein
			Pseudomonas		nein
BL2	ChromESBL	21,1	Pseudomonas		nein
			Pseudomonas		nein
DUF	ChromESBL	0,0	-		nein
			Acidovorax	delafeldii	nein
			Acinetobacter	johnsonii	nein
R2A	ChromESBL	24,4	Delftia	acidovoans	nein
			Acinetobacter	johnsonii	nein

Probe	Medium	KBE/mL	Gattungen	Arten*	hyg. Relevanz?*
			<i>Delftia</i>	<i>lacustris</i>	nein
			<i>Flavobacterium</i>	<i>frigoris</i>	nein
			<i>Herbaspirillum</i>		nein
	BL1	10,3	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	nein
			<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	nein
	BL2	25,0	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	nein
			<i>Herbaspirillum</i>		nein

pot= potentiell pathogen, da Zugehörigkeit zu KEC

\*nur angegeben bei Score Value >2

\*\*lt WHO 2017

## 9 BISHERIGE VERÖFFENTLICHUNGEN

### Beiträge in wissenschaftlichen Zeitschriften

Niestroj-Pahl, R.; **Stelmaszyk, L.**; ElSherbiny, I.M.A.; Abuelgasim, H.; Krug, M.; Staaks, C.; Birkholz, G.; Horn, H.; Li, T.; Dong, B.; et al. (2020) Performance of Layer-by-Layer-Modified Multibore® Ultrafiltration Capillary Membranes for Salt Retention and Removal of Antibiotic Resistance Genes. *Membranes*, 10:398. doi:10.3390/membranes10120398.

Nischwitz, V.; **Stelmaszyk, L.**; Piel, S. und Tiehm, A. (2022) Cascade Filtration With PCR Detection and Field-Flow-Fractionation Online With ICP-MS for the Characterization of DNA Interaction With Suspended Particulate Matter. *Frontiers in Chemistry* 10:919442. doi:10.3389/fchem.2022.919442.

### Konferenzbeiträge

Stange, C.; **Stelmaszyk, L.**; Tiehm, A.: Antibiotikaresistenzen in der aquatischen Umwelt, Vortrag auf der 17. Trinkwasserfachtagung der Hygieneinspektoren, 11. März 2020.

**Stelmaszyk, L.**; Stange, C.; Tiehm, A.: Nachweis und MALDI-TOF-gestützte Identifikation von resistenten Krankheitserregern und Umweltbakterien. Posterbeitrag Online-Konferenz SUK 21 (Spurenstoffe und Krankheitserreger im Wasserkreislauf). 19. April 2021.

**Stelmaszyk, L.**, Stange, C., Sidhu, J., Tiehm, A.: Detection of  $\beta$ -lactamase producing oligotrophic (environmental) bacteria in German surface waters with adapted culturing methods and subsequent Micronaut-S assay. Vortrag auf der Konferenz EDAR6 (6<sup>th</sup> International Symposium on the Environmental Dimension of Antibiotic Resistance, Gothenburg, Sweden), 22.-27. September 2022.

