



HyReKA

Synthese- und Abschlussbericht

Hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

FONA
Forschung für Nachhaltigkeit

Das diesem Bericht zugrundeliegende Verbundvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung im Rahmen der Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf (RiSKWa)“ unter dem Förderkennzeichen 02WRS1377A-K gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Gesamtlaufzeit:

1.2.2016 - 30.06.2021

Bonn, Karlsruhe, Dresden, Aachen, Bad Elster,

den 27. Juni 2022

Verbundpartner

Projektleitung

Prof. emeritus Dr. med. Dr. h.c. Martin Exner, Universität Bonn /
Universitätsklinikum Bonn

Projekt- koordination

- Prof. Dr. rer. nat. Thomas Schwartz, Karlsruher Institut für
Technologie,

Telefon: +49 721 608 26802; Fax: +49 721 608 26858

thomas.schwartz@kit.edu

- Dr. med. Dr. agr. Ricarda Schmithausen, vormals Universität
Bonn / Universitätsklinikum Bonn

ricarda.schmithausen@ukbonn.de

Forschungspartner



Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Hermann-von Helmholtz Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen

Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)

Abteilung Mikrobiologie / Molekularbiologie

Ansprechpartner:

- Prof. Dr. Thomas Schwartz

Telefon: +49 721-608-26802; Fax: +49 721-608-26858

thomas.schwartz@kit.edu

Institut für Mikrosystemtechnik (IMT)

jetzt: Universität Freiburg,

Institut für Mikrosystem Technik (IMTEK)

Ansprechpartner:

- Prof. Dr. Bastian E. Rapp

Tel.: +49 761 203 7351; bastian.rapp@imtek.uni-freiburg.de



Institut für Hygiene und öffentliche Gesundheit (IHPH)

Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn

Ansprechpartner:

- Prof. emeritus Dr. med. Dr. h.c. Martin Exner

Tel: +49 228287-10455; Fax 49 228287-16545

martin.exner@ukbonn.de

Tel: +49 228 287-16862 bzw. -14885; Fax:+49 228 287-19516

- Dr. Christiane Schreiber

Vormals Hygiene-Institut Bonn, AG Med Geo

Tel: +49 2102 70 64 86, info@christiane-schreiber.de





- Prof. Dr. Thomas Kistemann
Tel: +49 228 28714885; Fax: +49 228287-19516
Thomas.Kistemann@ukbonn.de (AG Med Geo)
- Dr. Harald Färber
Tel: +49 228 2871-6864, Fax: +49 228 2871 -1144
Harald.Faerber@ukbonn.de (Wasserchemie)
- Prof. Dr. med. Steffen Engelhart
Tel.: +49 228 2871-4434, Fax. + 48 228 2871-5645
Steffen.Engelhart@ukbonn.de (Abt. Krankenhaushygiene)



Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP)

Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn

Ansprechpartner:

- Prof. Dr. Gabriele Bierbaum
Tel. 228-2871 9103; Fax 228-2871 4808, g.bierbaum@uni-bonn.de
- Dr. Mario Parcina
Tel.: +49 228 2871 5952, parcina@uni-bonn.de



**International FoodNetCenter (FNC),
Fokusgruppe „Food Waste“**

Vormals Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften (IEL), Lebensmittelverfahrenstechnik

Katzenburgweg 7-9, 53115 Bonn

Ansprechpartner:

- Prof. Dr. Judith Kreyenschmidt,
Tel.: +49 6722 502452,
Judith.Kreyenschmidt@hs-gm.de

Fokusgruppe „One Health“

Vormals Institut für Tierwissenschaften (ITW), Präventives Gesundheitsmanagement

Katzenburgweg 7-9, 53115 Bonn

Ansprechpartner:

- Prof. emeritus Dr. Brigitte Petersen
b.petersen@eqasce.de
- Dr. Julia Steinhoff-Wagner
Tel.: +49 8161 71 5403, jsw@tum.de



**TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DRESDEN**

Technische Universität Dresden

Institut für Hydrobiologie

Drudebau, Zellescher Weg 40, 01062 Dresden

Ansprechpartner:

- Prof. Dr. Thomas U. Berendonk

Tel. +49 351 463 4 2379; Fax: +49 351463 3 7108

Thomas.Berendonk@TU-Dresden.de



RWTH Aachen

Institut für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen

Mies-van-der-Rohe-Straße 1, 52074 Aachen

Ansprechpartner:

- Prof. Dr.-Ing. Johannes Pinnekamp

Telefon: +49 241 8025207, isa@isa.rwth-aachen.de



Umweltbundesamt Bad Elster

Heinrich-Heine-Straße 12, 08645 Bad Elster

Ansprechpartner:

- Dr. Claudia Strobel

Claudia.strobel@uba.de

Technologiezentrum
Wasser



TZW Karlsruhe

DVGW-Technologiezentrum Wasser

Umweltbiotechnologie und Altlasten

Karlsruher Straße 84, 76139 Karlsruhe

Ansprechpartner:

- Prof. Dr. Andreas Tiehm, Dipl. Ing. Claudia Stange

Tel: +49 721 9678-137; Fax: +49 721 9678-101

andreas.tiehm@tzw.de; claudia.stange@tzw.de



Erftverband Bergheim

Am Erftverband 6, 50126 Bergheim

Ansprechpartner:

- Dr. Christian Gattke

Tel: +49 2271 88 1245 , Fax: +49 2271 88 1261

christian.gattke@erftverband.de



Oldenburgisch-Ostfriesischer Wasserverband (OOWV)

Hauptverwaltung Brake, Georgstraße 4, 26919 Brake

Ansprechpartner:

- Frau Ulrike Biebert-Petermann, Herr Jürgen Wachtendorf, Frau Silke Bücken,

Tel: +49 441 40837-601; Fax: +49 441 40837-623

buecker@oowv.de; wachtendorf@oowv.de



Zweckverband Klärwerk Steinhäule

Reinzstr. 1, 89233 Neu-Ulm

Ansprechpartner:

- Herr Christian Hiller,

Tel.: +49 731 97972137; Fax.: +49 731 97972 43

c.hiller@klaerwerk-steinhaeule.de



Xylem Services GmbH

Boschstr. 4 – 14, 32051 Herford

Ansprechpartner:

- Arne Wieland

Tel: +49 5221 930-129; Fax: +49 5221 930-108

Arne.Wieland@xylem-inc.com

Inhalt

Inhalt	V
Abkürzungen	VIII
Zusammenfassung	X
Einleitung	1
1 Teilprojekt: Kliniken und andere medizinische Einrichtungen	11
1.1 Teilbereich: Klinikabwässer.....	13
1.1.1 Ergebnisse im Teilbereich: Klinikabwässer	14
1.1.2 Schlussfolgerung für das Teilprojekt Klinikabwässer.....	15
1.2 Veröffentlichungen im Teilprojekt Klinikabwässer und andere medizinische Einrichtungen.....	17
2 Teilprojekt: Kommunale Kläranlagen, Eliminationsverfahren	19
2.1 Teilbereich: Kommunale Kläranlagen und Schlachthöfe	20
2.1.1 Ergebnisse aus: Kommunale Kläranlagen und Schlachthöfe	20
2.2 Teilbereich: Erweiterte Abwasserbehandlungsverfahren.....	21
2.2.1 Ergebnisse aus: Erweiterte Abwasserbehandlungsverfahren.....	22
2.3 Nachweis von fakultativ-pathogenen Bakterien im Vorfluter	22
2.4 Schlussfolgerung das Teilprojekt: Kommunale Kläranlagen, Elimination.....	23
2.5 Veröffentlichungen im Teilprojekt: Kommunale Kläranlagen, Eliminationsverfahren	24
3 Teilprojekt: Hot Spots in der Wertschöpfungskette Fleisch	25
3.1 Landwirtschaftliche Nutztierhaltung und Abwässer aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen	26
3.2 Veröffentlichungen im Teilprojekt: Landwirtschaftliche Nutztierhaltung und Abwässer aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen	30
4 Teilprojekt: Bedeutung von Flugverkehr und Regenüberlaufbecken	33
4.1 Teilbereich: Flugzeugabwässer als Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien	34
4.1.1 Ergebnisse zum Teilbereich Flugzeugabwasser als Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien	34
4.2 Teilbereich: Kanalisationsüberläufe als Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien	35
4.2.1 Ergebnisse zum Teilbereich Kanalisationsüberläufe als Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien	35
4.3 Teilbereich: Auftreten von Colistin-Resistenzgenen im kommunalen Abwasser	36

4.3.1	Ergebnisse zum Teilbereich: Auftreten von Colistin-Resistenzgenen im kommunalen Abwasser.....	36
4.4	Teilbereich: Resistente Bakterien und Resistenzgene im Gewässer.....	36
4.4.1	Ergebnisse zum Teilbereich: Resistente Bakterien und Resistenzgene im Gewässer	37
4.5	Veröffentlichungen im Teilprojekt Bedeutung von Flugverkehr und Regenüberlaufbecken.....	38
5	Teilprojekt: Oberflächengewässer, Grund- und Rohwasser	39
5.1	Teilbereich: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung.....	40
5.1.1	Ergebnisse zum Teilbereich: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung.....	41
5.2	Schlussfolgerung für das Teilprojekt Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung.....	43
5.3	Veröffentlichungen im Teilprojekt: Oberflächengewässer Grund- und Rohwasser.....	44
6	Teilprojekt: Bewertung der urbanen Gewässereinträge und Möglichkeiten der Eintragsminderung	46
6.1	Teilbereich: Relevanz verschiedener urbaner Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt.....	47
6.1.1	Ergebnisse zum Teilbereich: Relevanz verschiedener urbaner Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt	48
6.2	Teilbereich: Technische Maßnahmen zur Emissionsminderung von Antibiotikaresistenzen	48
6.2.1	Weitergehende Verfahrenstechniken auf kommunalen Kläranlagen	49
6.2.2	Behandlung dezentraler Abwasserströme (Krankenhausabwasser)	50
6.2.3	Maßnahmen zur Eintragsminderung aus Mischwasserentlastungen.....	50
6.2.4	Wirksamkeit der betrachteten Maßnahmen für die Frachtreduktion von Antibiotikaresistenzen in verschiedenen Einzugsgebieten	51
6.3	Schlussfolgerung und Handlungsoptionen für das Teilprojekt: Bewertung der urbanen Gewässereinträge und Möglichkeiten der Eintragsminderung.....	52
7	Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern	53
7.1	Hintergrundinformationen.....	54
7.2	Zielsetzungen	55
7.3	Kulturbasierter Nachweis und Charakterisierung von antibiotikaresistenten Bakterien.....	56
7.3.1	Methodisches Vorgehen	56
7.3.2	Belastung der Gülleproben und Drainagewässer mit resistenten Bakterien	63
7.3.3	Zusammenführung und Interpretation der Untersuchungsergebnisse ...	68

7.3.4	Gegenüberstellung der Belastungssituation der Gülle mit der Belastungssituation von Abwässern aus dem Klinikum.....	69
7.4	Molekularbiologische Nachweise von Antibiotikaresistenz-Genen	71
7.4.1	Genetische, qPCR-basierte Nachweise von Antibiotikaresistenzgenen und taxonomischen Markergenen für fakultativ-pathogene Bakterien in Gülle aus Schweinehaltung.....	71
7.4.2	Quantitative molekularbiologische Untersuchungen (qPCR basiert) zur Erfassung von Belastungssituationen mit fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Gülle- und Drainagewässern 77	
7.4.3	Gegenüberstellung der Belastungssituationen der Gülle mit Abwässern aus dem Universitätsklinikum Bonn	80
7.5	Vergleichende Bewertung der Kulturergebnisse und molekularbiologischen Ergebnisse.....	83
7.6	Chemisch-analytischer Nachweis von Antibiotikarückständen	84
7.6.1	Untersuchungen der Gülleproben	85
7.6.2	Untersuchungen von Drainagewasser	87
7.7	Weiterer Forschungsbedarf.....	88
8	Teilprojekt: Risikoregulatorische Konsequenzen	93
8.1	Ausgangspunkt: Derzeitige regulatorische Maßnahmen	94
8.2	Zielstellung	96
8.3	Risikoregulatorische Konsequenzen	97
8.3.1	Risikoabschätzung und Risikobewertung im Verbundprojekt HyReKA..	97
8.3.2	Risikomanagement: Maßnahmeoptionen, einschließlich der Ansätze zur möglichen rechtlichen Umsetzung	102
9	Synthese aller Kernbotschaften und Indikatoren zur Bewertung von Belastungssituationen.....	113
9.1	Überblick und Zusammenfassung aller Kernbotschaften aus den Teilprojekten	114
9.2	Konsequenzen aus den Kernbotschaften des HyReKA-Forschungsprojekts	120
9.3	Das Ampelprinzip zur Bewertung von Antibiotikaresistenzlagen ausgehend von den genannten Indikatoren	121

Abkürzungen

3MRGN	Multiresistente gramnegative Stäbchen mit einer Resistenz gegen 3 der 4 Antibiotikagruppen
4MRGN	Multiresistente gramnegative Stäbchen mit einer Resistenz gegen 4 der 4 Antibiotikagruppen
°C	Grad Celsius
ABR	Antibiotikaresistenzen
AmpC	AmpC Betalaktamasen
AMG	Arzneimittelgesetz
AR	Antibiotikarückstände
ARB	antibiotikaresistente Bakterien
ARG	Antibiotikaresistenzgene
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CTX-M	Cefotaximase-Munich type betalactamase
DART	Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie
DNA	Deoxyribonucleic Acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
ESBL(s)	extended-spectrum betalactamase(s)
ESBL	extended-spectrum betalactamase-producing <i>Enterobacteriaceae</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HyReKA	Biologische bzw. hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern
i.e.	<i>id est</i>
IHPH	Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit des Universitätsklinikums Bonn
IMMIP	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie
KEC	<i>Klebsiella</i> spez., <i>Enterobacter</i> spez. und <i>Citrobacter</i> spez.
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i> , engl.)

MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry
MDR	Multiresistent (<i>multi drug resistant</i> , engl.)
mecA	Strukturgen für die Methicillin-Resistenz in <i>S. aureus</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute(s)
ml	Milliliter
MLST	Multilocus Sequenz-Typisierung
mm	Millimeter
MRE	Multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
n.a.	not applied
NDM	New Delhi Metallo-Betalaktamase
OXA	Oxacillinase (eine Betalaktamasefamilie)
OXA-48	eine Carbapenemase des OXA-Typs
PCR	Polymerase Chain Reaction
QMRA	quantitative microbial risk assessment
RKI	Robert Koch-Institut
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>spa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A-Gen
spp.	<i>species pluralis</i>
TEM	Temoneira-type Betalaktamase
VIM	Verona integron-encoded Metallobetalaktamase
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i> , engl.)
XDR	Extrem resistant (<i>extensively drug resistant</i> , engl.)

Zusammenfassung

Interdisziplinäre Forschungspartner haben sich im vom BMBF geförderten Verbundvorhaben zum Ziel gemacht, die „Biologische bzw. hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern“ (HyReKA) zu untersuchen und damit Eintragspfade von Antibiotika-resistenten Bakterien, Antibiotika-Resistenzgenen und Antibiotika-Rückständen von Mensch oder Tier in die Umwelt qualitativ und quantitativ zu charakterisieren, um so die Ausbreitung in die Umwelt mit geeigneten technischen Verfahren zu unterbrechen.

Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen hohen Antibiotika-Rückständen und der Abundanz von multi-resistenten fakultativ pathogenen Bakterien sowie von Antibiotika-Resistenzgenen im klinischen Abwasser. Trotz konventioneller Klärung konnten in den Abläufen von kommunalen Kläranlagen noch multi-resistente Bakterien und klinisch relevante Resistenzgene nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich jedoch je nach Einzugsgebiet und Aufbereitung Unterschiede der Belastungen in Kläranlagenabläufen. Im Klinikabwasser war der Anteil an 4MRGN (WHO priorisierte multi-resistente Erreger) wesentlich höher als im überwiegend häuslich urbanen Abwasser. Dennoch konnten bereits 3MRGN und fast immer ESBL- (extended spectrum beta-lactamase) produzierende Bakterien im kommunalen Abwasser und in der aquatischen Umwelt mit Abwassereinfluss nachgewiesen werden. Abwasser aus Schlachthöfen zeigten ebenfalls Belastungen, z.B. mit Resistenzen gegen Colistin, das in der Medizin als Reserveantibiotikum eingeordnet ist. In einer vergleichenden Auswertung konnte gezeigt werden, dass die Resistenzen der isolierten Bakterien den unterschiedlichen Einsatz von Antibiotika in Humanmedizin und Nutztierhaltung klar widerspiegeln. Weiterhin wurden Abwässer aus Flugzeugen und Flughäfen untersucht, die ein breites Spektrum an Resistenzgenen besitzen, die dann ebenfalls in kommunale Abwassersysteme eingeleitet werden. Demzufolge wurden unterschiedliche oxidative und physikalisch-mechanische Eliminationsverfahren auf Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen getestet. Vor allem Membranverfahren (Ultrafiltration, MBR) auch in Kombination mit oxidativen Verfahren zeigten sich für eine zusätzliche Reinigungsstufe an zentralen bzw. dezentralen Punkten in der Abwasserverteilung bzw. -aufbereitung als besonders effektiv für den Schutz von Mensch und Umwelt. Vor diesem Hintergrund wurden bereits klinisch relevante Resistenzgene auch in Trinkwassersystemen nachgewiesen, was auf einen Transfer von genetisch mobilen Resistenzgenen hinweist.

Diese Erkenntnisse müssen Konsequenzen für regulatorische Anforderungen der Abwasserentsorgung im Infektionsschutzgesetz finden. Dazu wurde ein neues Indikatorsystem zur Bewertung etabliert, um Handlungsempfehlungen bei hoher Belastung in kritischen Bereichen einzuleiten.

Im Folgenden werden aus Teilbereichen des Verbundvorhabens Kernbotschaften dargestellt und anschließend wird eine Synthese aller Erkenntnisse vorgenommen.

Einleitung

Die Verbreitung von Antibiotika-resistenten (ARBs) Bakterien mit klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) aus anthropogenen Quellen stellt ein zunehmendes Problem dar. Aus Bereichen mit hohem Antibiotikaverbrauch, wie z.B. der Klinik, der Tierzucht oder – bei einigen Arten - einfach aus kolonisierten Individuen gelangen diese Bakterien über unzureichend oder nicht gereinigte Abwässer in die aquatische Umwelt und können von dort, auf verschiedenen Wegen wieder zurück zum Menschen, zu Nutztieren oder auf Nutzpflanzen gelangen, z. B. über Bewässerungswässer (Gekenidis et al., 2018), über Kontakt mit Oberflächenwasser im Rahmen der Freizeitnutzung (Leonard et al., 2018) oder Lebensmittel: So wurden kürzlich z. B. Antibiotika-resistente Bakterien aus Lebensmitteln wie frischem, in Deutschland gekauftem, Koriander (Blau et al., 2018) oder Fleischprodukten (Müller et al., 2018) isoliert.

Zu den gefürchtetsten ARBs gehören resistente Vertreter der sogenannten ESKAPE Bakterien (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. und *Escherichia coli*-Stämme, die in der Lage sind, Beta-Laktamantibiotika aus der Klasse der Drittgenerations-Cephalosporine zu inaktivieren, sog. ESBL- (Extended Spectrum Beta-Laktamase) Produzenten). Mit der Ausnahme von *E. coli* und *S. aureus* handelt es sich bei diesen Bakterien um fakultativ pathogene Erreger, die in der Umwelt (Wasser, Abwasser, Pflanzen) gut überleben, und gleichzeitig in der Lage sind, immungeschwächte, hospitalisierte Patienten zu infizieren oder wie *E. coli* und *Enterococcus* spp. und in einem geringeren Maße auch *K. pneumoniae* zur regulären Darmflora bzw. wie *S. aureus* zur normalen Haut- und Nasenflora von Menschen und Tieren gehören. Diese Bakterien enthalten oft ARGs, die auf mobilen Elementen (Transposons, Plasmide, Integrons etc.) lokalisiert sind. Diese ARGs können sich über den sogenannten horizontalen Gentransfer von einem Wirt zum nächsten bewegen und breiten sich so in der Bakterienpopulation aus. Viele dieser Plasmide werden von mehreren Arten vermehrt, so dass sie nicht auf eine Spezies begrenzt sind. Zurzeit gibt es keine adäquaten Risikoabschätzungen, die die Wirkungen von Antibiotika und auf das Auftreten und die Selektion von Resistenzen in Bakterien, vor allem im nicht-klinischen Umweltbereich, abbilden können. Auch die Bedeutung von freien Resistenzgenen in der Umwelt ist unklar.

Seit den 40iger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde, beginnend mit den Sulfonamiden und Penicillin, eine große Zahl von Antibiotika in die Klinik und Veterinärmedizin eingeführt. Mit dem zunehmenden Einsatz dieser Präparate konnte man in den Kliniken eine Zunahme von resistenten Bakterien erkennen. Die ersten problematischen Erreger waren die sog. Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSA), die sich ab 1992 flächig in Deutschland ausbreiteten (Witte et al., 1997). In Deutschland kamen bereits in den neunziger Jahren Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) (Werner et al., 1997) und danach die Gram-negativen ESBL-Produzenten dazu (Pfeifer and Eller, 2012). Um weiter wirksame Antibiotika zur Verfügung zu haben, setzte man lange auf die Neuentwicklung von antibakteriellen Wirkstoffen. Während in den Jahren 1994 bis 2004 noch 16 neue Präparate auf den deutschen Markt kamen, reduzierte sich die Zahl der Neuzulassungen in den Jahren 2004-2013 auf nur sieben, trotz einer bedenklichen Resistenzentwicklung gerade bei den Gram-negativen

Infektionserregern: Die Behandlung von ESBL-Produzenten mit Carbapenemen, Ciprofloxacin oder Piperacillin/Tazobactam führt z. B. zu vermehrten Resistenzen gegen diese Antibiotika (Qu et al., 2019; Yang et al., 2020). Zusätzlich wurde in letzter Zeit die Forschung der pharmazeutischen Industrie nach neuen antibiotisch wirkenden Substanzen aus ökonomischen Gründen eingestellt, da der Entwicklungsaufwand für Antibiotika hoch ist, die Einsatzmöglichkeiten aber begrenzter sind als z. B. bei Medikamenten, die langfristig eingenommen werden (wie Statinen oder Blutdrucksenkern). Bei Betrachtung der zurzeit in Entwicklung befindlichen Substanzen ist abzusehen, dass es eine Zeit dauern könnte, bis neue effektive Antibiotika gegen die multi-resistenten Gram-negativen Erreger zur Verfügung stehen (Holzgrabe, 2018).

Auch die WHO hat das Problem der steigenden Resistenz inzwischen erkannt und die Antibiotika in drei Klassen eingeteilt; in die niedrigste Klasse („Access“) wurden Antibiotika eingeordnet, die gegen weit verbreitete empfindliche Erreger aktiv sind und gegen die selten Resistenzen entwickelt werden. Die zweite Klasse („Watch“) enthält klinisch relevante Substanzen, die einer Resistenzentwicklung unterliegen und deren Wirksamkeit und Einsatz kritisch beobachtet werden sollte, dazu gehören z. B. die in HyReKA untersuchten Drittgenerations-Cephalosporine wie Ceftazidim and Cefotaxim, Piperacillin/Tazobactam, Ciprofloxacin, die Carbapeneme (alle gegen Gram-negative Bakterien eingesetzt) und Vancomycin (gegen MRSA-Infektionen). Die dritte und höchste Klasse („Reserve“) enthält Reserve-Antibiotika, die nur zur Behandlung von ernsten Infektionen mit multi-resistenten Erregern eingesetzt werden sollen, dazu gehören Colistin, Ceftazidim/Avibactam, Ceftozolan/Tazobactam, intravenöses Fosfomycin, Tigecyclin (alle gegen Gram-negative Bakterien) and Linezolid (gegen VRE) (WHO, 2019). Da diese Reserveantibiotika nur gegen Erreger eingesetzt werden, die auch gegen viele andere Antibiotika Resistenzen zeigen, sind Resistenzen gegen diese Antibiotika besonders kritisch, da die therapeutischen Optionen dann sehr eingeschränkt sind. Im Extremfall ist gar keine Therapie mehr möglich: eine tödliche Infektionen mit einer pan-resistenten Klebsiella ist bereits beschrieben (de Man et al., 2018) und eine solche Kolonisierung gab es – nach Abschluss des Projektes - auch an der untersuchten Klinik. Einen typischen Fall für den Einsatz von Reserveantibiotika würde z. B. eine ESBL-produzierende *K. pneumoniae* (Resistenz gegen Ceftazidim and Cefotaxim) darstellen, die zusätzlich gegen Ciprofloxacin, Piperacillin/Tazobactam und die Carbapeneme resistent ist. Allgemein sieht man schon, dass die globale Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen (ARG) und deren Aufnahme durch klinisch relevante Mikroorganismen mit einer steigenden Sterblichkeitsrate von Patienten, die mit diesen Mikroorganismen infiziert sind, einhergeht (World Health Organisation, 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance). Man geht davon aus, dass in der EU im Jahre 2015 mindestens 33.000 Todesfälle auf Infektionen mit multi-resistenten Erregern zurückgeführt werden können (Cassini et al., 2019). Schätzungen zu Infektionen und Sterblichkeit für die Jahre 2012 und 2014 gehen davon aus, dass bei insgesamt 15.000 MRSA-Infektionen die Sterblichkeit bei 39% lag (Otto, 2012; Biermann et al, 2014), im Falle von VRE mit 13.750 dokumentierten Infektionen erreichte die Sterblichkeitsrate zwischen 21 und 35.5%, bei 9500 Infektionen mit ESBL *E. coli* lag die Sterblichkeit bei 47% (Aghdassi, et al., 2016.) Inzwischen kolonisiert dieser Erreger bereits 3.5-6.8% der deutschen Bevölkerung (Idelevich et al., 2016). Bei 2000 erfassten Infektionen mit resistenten *Klebsiella pneumoniae* lag die

Sterblichkeitsrate sogar bei über 50% (Aghdassi, et al., 2016; Mächler et al., 2017). Die zusätzlichen Kosten, die bei einer Behandlung eines Patienten mit einer Infektion durch resistente Keime entstehen, belaufen sich auf durchschnittlich 13.000 bis 30.000 €, je nach Infektionserreger. Insgesamt wird prognostiziert, dass im Jahre 2050 ca. 10 Mio. Menschen pro Jahr an Antibiotika-resistenten Infektionen sterben werden (O'Neill et al., 2016)

Im Gegensatz zu vielen chemischen Kontaminanten, deren Konzentrationen durch Abbau, Verdünnung oder Sorption typischerweise verringert wird, sind Bakterien fähig in der Umwelt zu persistieren und sich dort auch auszubreiten, d.h. Bakterien können sich im schlimmsten Fall nach teilweiser Entfernung wieder vermehren. Dies bezieht sich nicht nur auf die Bakterienzellen, sondern auch auf die ARGs, die ja auf andere Bakterien übertragen werden können. Aktuelle Veröffentlichungen zeigen bereits, dass in Abwasser beeinflussten aquatischen Habitaten die Häufigkeiten an klinisch-relevanten Resistenzgenen gegen Vancomycin und Imipenem in der Gesamtpopulation deutlich höher sind, als das Vorhandensein der typischen Erreger, die mit diesen Resistenzgenen normalerweise assoziiert sind (Alexander et al., 2015). Dies konnte nur mit Hilfe von kombinatorischen Analyseverfahren erfasst werden. Diese vermehrte Verbreitung von Antibiotika-resistenten Bakterien in der Umwelt basiert wohl auf drei wesentlichen Mechanismen, die sich gegenseitig beeinflussen können:

- dem bereits erwähnten horizontalen Gentransfer von Resistenzgenen, der direkt von „konjugativen“ Plasmiden oder konjugativen Transposons gesteuert wird. Ein zweiter Weg ist die Übertragung von Genen durch Phagen (Transduktion). Weiter gibt es auch Bakterien, die selbstständig DNA aus der Umwelt aufnehmen und in ihr Genom einbauen können.
- der Tatsache, dass Bakterien sich sehr schnell vermehren. In einer Laborkultur können in 48 h Zellzahlen erreicht werden, die der Anzahl der Menschen auf der Erde entsprechen. Antibiotika bedeuten Stress für Bakterien und es gibt Mechanismen, die dafür sorgen, dass unter diesen Bedingungen mehr Mutationen auftreten. So entstehen einige Mutanten, die besser an die Anwesenheit von Antibiotika angepasst sind und besser überleben. Dazu gehört z. B. die stärkere Expression von bereits vorhandenen Effluxpumpen, die die Antibiotika in der Zellmembran binden und wieder ausschleusen. Hier wirken auch Desinfektionsmittel selektiv (Fernando et al., 2014).
- der stärkeren Vermehrung von bereits resistenten Bakterien, wenn ein Selektionsdruck ausgeübt wird: Dazu gehört auch die Kombination von Antibiotika mit anderen Kontaminanten wie Schwermetallen und Bioziden (wie z. B. Desinfektionsmitteln). Im Labor wurde dies bereits gezeigt (Gullberg et al., 2014). Meist ist es auch so, dass ein Resistenzplasmid Resistenzen gegen mehrere Substanzen vermittelt. Damit führt die Anwesenheit einer Substanz zur Selektion von Stämmen, die dieses Plasmid tragen und damit direkt auch gegen andere Antibiotika resistent werden, obwohl diese momentan gar nicht vorhanden sind.

Trotz dieser Erkenntnisse ist es schwer, das Verhalten bzw. den Verbleib von Antibiotikaresistenzgenen und Antibiotika-resistenten Bakterien in der Umwelt vorherzusagen. Es ist jedoch jetzt schon klar, dass neben den medizinischen Einrichtungen auch in anderen

anthropogen beeinflusste Kompartimenten Selektionsdruck bestehen kann. Dazu gehören kommunale Kläranlagen, Abwässer der Pharmaunternehmen, Aquakultur-Einrichtungen und Tiermastbetriebe. Diese Bereiche sind gekennzeichnet durch eine hohe Bakteriendiversität und –dichte, die einhergeht mit therapeutischen (Fick et al., 2009), aber auch subtherapeutischen Konzentrationen von Antibiotika. Diese Kombinationen wiederum unterstützen den Gentransfer und die Selektion resistenter Bakterien und damit eine zunehmende Belastung mit Antibiotika-resistenten Bakterien (Gullberg et al., 2011).

Der Antibiotika-Einsatz in klinischer Medizin und Tiermast unterscheidet sich in Deutschland (AG Antibiotikaresistenz am BVL, 2018). Von den in HyReKA untersuchten Antibiotika werden Colistin, Cephalosporine, Sulfamethoxazol, Oxacillin und Enrofloxacin (das im Tier zum großen Teil in Ciprofloxacin umgewandelt wird (Cester and Toutain, 1997)) in der Tierzucht eingesetzt. Im Gegensatz dazu werden andere Antibiotika der "Watch" Gruppe nur in der klinischen Medizin eingesetzt (Carbapeneme, Piperacillin/Tazobactam, intravenös verabreichtes Fosfomycin, Tigecyclin, die neuen Beta-Laktam/Beta-Laktamasehemmer Kombinationen Ceftozolan/Tazobactam und Ceftazidim/Avibactam), Linezolid and Vancomycin. Von den Reserveantibiotika wird lediglich Colistin in der Tierzucht eingesetzt. Wegen der anfänglich starken Nebenwirkungen hat dieser Einsatz dort eine langjährige Tradition, während diese Substanz als Therapeutikum in der Humanmedizin erst nach Ausbreitung der Carbapenemase-Bildner und Entwicklung einer besser verträglichen Formulierung wieder eingeführt wurde (Li et al., 2006).

Bakterien verwirklichen ein breites Spektrum von Resistenzmechanismen:

- Die Bakterien verändern durch Mutation die Proteine, die das Angriffsziel der Antibiotika in der Zelle darstellen, so dass die Antibiotika dort nicht mehr binden können. Hierzu zählen z. B. die Veränderung der Gyrase und Topoisomerase, die zu einer Resistenz gegen Ciprofloxacin führt oder die Mutation von Regulatorproteinen, die zu einer Veränderung der Struktur der äußeren Membran der Gram-negativen Bakterien und damit zur Colistinresistenz führen. Auch nicht-proteinogene Targets können durch Aufnahme von neuen Biosynthesegenen verändert werden, wie z. B. die Struktur des Zellwandbausteins Lipid II in den VRE.
- Die Bakterien befinden sich in einem Ruhezustand, z. B. weil sie in einen Biofilm eingebettet sind und im Moment nicht wachsen. Alle Antibiotika, die Wachstumsprozesse wie die Zellwand- und DNA-Biosynthese hemmen, sind dann unwirksam oder weniger aktiv, da in der Zelle maximal Reparaturprozesse ablaufen.
- Viele Bakterien bilden Enzyme, die Antibiotika chemisch modifizieren und damit inaktivieren (durch Hydrolyse, Phosphorylierung, Acetylierung etc.). Hier sind die bekanntesten Enzyme die Beta-Laktamasen, von denen es mehrere Klassen und extrem viele Beispiele gibt und die oft auf Plasmiden kodiert sind. In anderen Bakterien sind aber auch Beta-Laktamasegene bereits im Chromosom vorhanden und müssen nur stärker abgelesen werden (z.B. *bla_{OXA-51}* in *A. baumannii*).
- Gram-negative Bakterien verändern durch Mutation der Poren-bildenden Proteine die Durchlässigkeit ihrer äußeren Membran, so dass die Antibiotika nicht ins Periplasma und weiter in die Zelle gelangen.

- Viele Bakterien bilden Transportproteine aus, die dafür sorgen, dass das Antibiotikum bereits aus der inneren Membran des Bakteriums heraustransportiert wird, bevor es an seiner Zielstruktur ankommt, dies ist typisch für *P. aeruginosa* und *A. baumannii*. Diese Transportproteine sind oft bereits im Genom vorhanden, werden aber in empfindlichen Stämmen nicht ausgebildet. Mutanten, in denen die Transporter dann überexprimiert werden, entstehen durch Mutation, oft auch über Integration von springenden Genen vor dem Strukturgen, die das Gen dann sozusagen „anschalten“.
- Manche Bakterien produzieren jene Proteine im Übermaß, die als Angriffsziel der Antibiotika dienen, so dass das Antibiotikum bei normaler Dosierung abgefangen wird.

Im Rahmen des HyReKA-Verbundprojekts war zu klären, in welchem Ausmaß, Antibiotika-resistente Bakterien bzw. deren Antibiotikaresistenzgene in die Umwelt und damit auch zu Menschen/Tier gelangen und auch von dort aus dem Erwerb und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei klinisch relevanten Bakterien beeinflussen können. Mögliche Rückkopplungen aus dem Umweltbereich zurück zum Menschen, sei es in Kliniken oder in Alltagsbereichen im Kontakt mit Wasser oder kontaminierten Lebensmitteln, sollten daher aufgezeigt werden, um Wege der Verbreitung der Risikobakterien zu unterbrechen und damit Hotspot des Auftretens zu reduzieren. Das Ziel einer Vermeidungsstrategie muss sein, die Kolonisierung von Mensch und Tier mit diesen kritischen und Risiko-behafteten Bakterien durch einen direkten Kontakt zu verhindern.

Wie oben beschrieben, haben Bakterien unterschiedliche meist genetisch determinierte Mechanismen entwickelt, um Antibiotika unwirksam zu machen. Es ist für Einschätzung des Risikopotentials unabdingbar einerseits die Bakterienspezies zu ermitteln und auch die Art des zugrundeliegenden molekularen Resistenzmechanismus zu bestimmen. Dies gelang über die Kombination von Analyseverfahren, wie sie im HyReKA-Projekt definiert und umgesetzt wurden:

- Kultivierungsverfahren zur Anreicherung und Identifizierung von Antibiotika-resistenten Bakterien und Ermittlung der Multiresistenzen (spezifische Nährmedien, Antibiogramme)
- Typisierung von Bakterienisolaten über Sequenzmarker sowie Bestimmung der Resistenzgene
- Kulturunabhängige molekularbiologische Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen und von Genen fakultativ-pathogener Bakterienspezies (qPCR/ddPCR)
- Chemisch-analytische Rückstandsanalyse von Antibiotika: Quantitative Bestimmung von Antibiotikarückständen in wässrigen Matrices mittel LC-MS/MS

Durch die Interdisziplinarität der Verbundprojektpartner konnten damit für die genannten 4 Säulen der mikrobiologischen/molekularbiologischen und chemischen Analysen Protokolle standardisiert werden, die von den betroffenen Partnern an den unterschiedlichen Standorten genutzt wurden, so dass eine gesicherte Interpretation der erhaltenen Daten zu Belastungen und daraus resultierenden abgeleiteten biologischen Risiken erfolgen konnte. Diese wurden

bereits in einem Kompendium dargelegt und der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt (Methodenkompendium: siehe HyReKA Webseite Universitätsklinikum Bonn; oder direkte Anfrage bei der Koordination UK Bonn und KIT).

Der Forschungsverbund HyReKA wurde somit ins Leben gerufen, um einen aktiven Beitrag zum umweltbezogenen Gesundheitsschutz der Bevölkerung zu leisten. Er setzte sich aus Forschern verschiedener Fachrichtungen (Mediziner, Biologen, Geografen, Ingenieure, Agrarwissenschaftlern, Lebensmitteltechnologien und Ernährungswissenschaftlern), kommunalen Wasserwirtschaftsbetrieben und Industriepartnern zusammen. Mit den Forschern des Universitätsklinikums Bonn waren Spezialisten für die Bereiche Hygiene, Medizinische Mikrobiologie, Chemie und Medizinische Geografie involviert. Die Beteiligung der Institute für Tierwissenschaften und Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften der Universität Bonn sorgte für Expertise in der Fleisch-erzeugenden Kette von der Primärproduktion bis zur Verarbeitung. Das Karlsruher Institut für Technologie (KIT) war mit dem Institut für Funktionelle Grenzflächen und dem Institut für Mikrostrukturtechnik (jetzt Universität Freiburg) beteiligt. Neben der molekularbiologischen Expertise auf dem Gebiet der bakteriellen Resistenzforschung wurden am KIT auch innovative Technologien zur Biofilmsensorik entwickelt. Die TU Dresden war mit dem Institut für Hydrobiologie an der Identifizierung von Eintragungspfaden von Antibiotika-resistenten Krankheitserregern besonders aus Flugzeugabwässern und Flughäfen beteiligt, während das ISA der RWTH Aachen siedlungswasserwirtschaftliche Kenntnisse einbrachte. Das DVGW Technologiezentrum Wasser aus Karlsruhe diente als Partner auf dem Gebiet des Microbial Source Tracking im Rohwasser, weiterhin waren kommunale Partner wie der Erftverband Bergheim, der Zweckverband Klärwerk Steinhäule (Neu-Ulm) und der Oldenburgisch-Ostfriesische Wasserverband (OOWV) beteiligt. Für den Bereich innovative Abwassertechnologie lieferte der Industriepartner Xylem Services GmbH die technischen Voraussetzungen für die Elimination/Reduktion der kritischen Mikroorganismen. Für regulatorische Fragen war das Umweltbundesamt in Bad Elster zuständig.

Das **Ziel von HyReKA** war es

- die Einträge von ARB, ARG und Antibiotikarückständen in die Umwelt, zum Beispiel durch Abwässer aus Krankenhäusern, kommunalen Abwässern oder auch Abwässern aus Tiermastbetrieben qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Damit sollen Belastungssituationen und Verbreitungswege identifiziert und Risikopotentiale abgeschätzt werden können.
- das Übertragungsrisiko aus dem Umweltbereich, aus der Landwirtschaft oder Tiermast zurück zum Menschen, im Kontakt mit kontaminiertem Wasser oder Lebensmitteln zu charakterisieren.
- die Rückverfolgbarkeit von antibiotikaresistenten Erregern und Resistenzgenen aus Abwässern auf deren Ursprungsorte im Sinne des Microbial Source Tracking zu prüfen.
- innovative technische Verfahren der Abwasseraufbereitung an Kläranlagen zu testen, um die Verfahren zu identifizieren, die die Verbreitungspfade dieser Erreger unterbrechen.

- auf der Basis der Ergebnisse des HyReKA-Verbundprojekts letztlich Handlungsempfehlungen und ein Methodenkompendium zu formulieren, die dazu dienen sollen, angepasste behördliche Regularien für die identifizierten Risikobereiche zu erstellen um die Wirksamkeit der etablierten Antibiotika länger zu erhalten und Schutzgüter (Trinkwasser, Badegewässer, Bewässerung in der Landwirtschaft) und damit auch die Bevölkerung vor Antibiotika-resistenten Erregern aus der Umwelt zu schützen.

Als priorisierte **klinisch relevante Bakterienspezies** waren vorgesehen:

- als Vertreter von ESBL-bildenden Enterobacteriaceae wie *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp. und *Proteus* spp. als Vertreter der Nonfermenter: *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii*.
- als Vertreter Gram-positiver Abwasser relevanter Erreger: intestinale Enterokokken (VRE) und Staphylokokken (MRSA).
- Zur Resistenzbestimmung der gewachsenen Isolate mittels automatisierter Verfahren (Micronautsystem) etc. wurden in Medizin und Landwirtschaft relevante Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine, Fluorchinolone, Carbapeneme, Colistin und weitere Reserveantibiotika entsprechend der Empfehlungen der KRINKO zur Testung herangezogen (KRINKO, 2012).

Bei der Auswahl der Resistenzdeterminanten für molekularbiologische Untersuchungen wurden **klinisch relevante Gene** und **genetisch mobile Elemente** in das Untersuchungsprogramm integriert:

- *bla_{KPC}* (Carbapenemase-Gen bei Klebsiellen), *bla_{Oxa23}* (Carbapenemase-Gen von *Acinetobacter*), *bla_{CTX-M}* und *bla_{TEM}* (Beta-Laktamasen von Enterobacteriaceae), *bla_{NDM-1}* (New Delhi-Metallobetalaktamase), *bla_{VIM}* (Carbapenemase bei *Pseudomonas aeruginosa* und Enterobacteriaceae), *vanA* (Gen aus dem Vancomycin-Operon aus Enterokokken), *mecA* (Penicillin-Bindeprotein bei Staphylokokken), *ermB* (Macrolid-Resistenz bei Gram-positiven Bakterien), *tetM* (Tetracyclin-Resistenz), *sul1* (Sulfonamid-Resistenz). Das *Int1* (Integrase auf dem Integron der Klasse 1) ist genetischer Marker für ein mobiles genetisches Element und damit auch für den horizontalen Gentransfer.
- Parallel dazu wurden auch taxonomische Markergene für *E. coli* (*ycct*), intestinale Enterokokken (23S rDNA), *E. faecalis* (*dll*), *P. aeruginosa* (*efcX*), *A. baumannii* (*secA*), *K. pneumoniae* (*gltA*) eingesetzt, um auch nicht kultivierbare Stadien (VBNC) quantitativ zu erfassen
- Die Abundanzen der Zielorganismen und Resistenzdeterminanten in den Gesamtpopulationen wurden durch Untersuchungen der extrahierten Gesamt-DNA aus den bakteriellen Biozönosen mit nachfolgender qPCR der taxonomischen und Resistenz-spezifischen Genmarker quantitativ erfasst und normiert. Zusätzlich wurden auch Metagenomanalysen zur Bewertung von technischen Verfahren zu Reduktion der ARB bzw. ARG eingesetzt.

Die Untersuchungen mit den o. g. Zielorganismen bzw. Genelementen wurden in folgenden relevanten Bereichen durchgeführt: Kliniken mit deren Abwassersystemen, Mast und Schlachtbetriebe, kommunale Kläranlagen mit unterschiedlichen Ausbaugrößen und Einzugsbereichen, Gewässersysteme unterschiedlicher Abwasserbelastungen inklusive Rohwässer der Trinkwasseraufbereitung und Abwässer aus Flughäfen bzw. Flugzeugen.

In den folgenden Kapiteln sind die einzelnen Teilprojekte zusammengestellt, die oft von mehreren Projektpartnern zusammen bearbeitet wurden.

Literatur zur Einleitung

- Aghdassi, S.J., Behnke, M., Gastmeier, P., Gropmann, A., Hansen, S., Pena Diaz, L.A., Piening, B., Rosenbusch, M.-L., Schröder, C. and Schwab, F. (2016) Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotikaaanwendung, Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen
- AG Antibiotikaresistenz am BVL. 2018. Lagebild zur Antibiotikaresistenz im Bereich Tierhaltung und Lebensmittelkette. https://www.bmel.de/DE/Tier/Tiergesundheit/Tierarzneimittel/_texte/Lagebild_Antibiotikaeinsatz_bei_Tieren.html.
- Alexander, J., Bollmann, A., Seitz, W., Schwartz, T. (2015). Microbiological characterization of aquatic microbiomes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. *Sci Total Environ* 512-513: 316-325
- Biermann, K., Brandt, K.; Drepper, D., Faigle, P., Fuchs, C., Kunze, A., et al. (2014): Die Rache aus dem Stall. Das bringt uns noch um. In: *Die Zeit*, (48), S. 21-24
- Blau, K., Bettermann, A., Jechalke, S., Fornefeld, E., Vanrobaeys, Y., Stalder, T., Top, E.M., Smalla, K. 2018. The transferable resistome of produce. *MBio*. 9, mBio-18. doi: 10.1128/mBio.01300-18.
- Cassini, A., Hogberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D.A., Oliveira, T.C., Struelens, M.J., Suetens, C., Monnet, D.L. 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet. Infect. Dis.* 19, 56-66. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
- Cester, C.C., Toutain, P.L. 1997. A comprehensive model for enrofloxacin to ciprofloxacin transformation and disposition in dog. *J. Pharm. Sci.* 86, 1148-1155. doi: 10.1021/js9603461.
- de Man, T.J.B., Lutgring, J.D., Lonsway, D.R., Anderson, K.F., Kiehlbauch, J.A., Chen, L., Walters, M.S., Sjolund-Karlsson, M., Rasheed, J.K., Kallen, A., Halpin, A.L. 2018. Genomic Analysis of a Pan-Resistant Isolate of *Klebsiella pneumoniae*, United States 2016. *MBio*. 9(2):e00440-18. doi: 10.1128/mBio.00440-18.
- Fernando, D.M., Xu, W., Loewen, P.C., Zhanel, G.G., Kumar, A. 2014. Triclosan can select for an *AdelJK*-overexpressing mutant of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 that

- displays reduced susceptibility to multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 58, 6424-6431. doi: 10.1128/AAC.03074-14.
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, D.G. 2009. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2522-2527. doi: 10.1897/09-073.1.
- 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, e0207857. doi: 10.1371/journal.pone.0207857.
- Gullberg, E., Albrecht, L.M., Karlsson, C., Sandegren, L., Andersson, D.I. 2014. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *MBio.* 5, e01918-14. doi: 10.1128/mBio.01918-14.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilback, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I. 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS. Pathog.* 7, e1002158. doi: 10.1371/journal.ppat.1002158.
- Holzgrabe, U. 2018. Wie gut sind die neuen Antibiotika? *Pharm. Zeitung* 21, <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-212018/wie-gut-sind-die-neuen-antibiotika/>.
- Idelevich, E.A., Lanckohr, C., Horn, D., Wieler, L.H., Becker, K., Kock, R. 2016. [Multidrug-resistant bacteria in Germany. The impact of sources outside healthcare facilities]. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz.* 59, 113-123. doi: 10.1007/s00103-015-2261-z.
- Leonard, A.F.C., Zhang, L., Balfour, A.J., Garside, R., Hawkey, P.M., Murray, A.K., Ukoumunne, O.C., Gaze, W.H. 2018. Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environ. Int.* 114:326-333. doi: 10.1016/j.envint.2017.11.003.
- Li, J., Nation, R.L., Turnidge, J.D., Milne, R.W., Coulthard, K., Rayner, C.R., Paterson, D.L. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet. Infect. Dis.* 6, 589-601. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70580-1.
- Mächler, F., Geffers, C., Schwab, F., Peña Diaz, L.A., Behnke, M., Gastmeier, P. (2017) Entwicklung der Resistenzsituation in Deutschland. Wo stehen wir wirklich. *MedKlin IntensivmedNotfmed* 112:186–191, DOI 10.1007/s00063-017-0272-2
- Müller, A., Jansen, W., Grabowski, N.T., Monecke, S., Ehricht, R., Kehrenberg, C. 2018. ESBL- and AmpC-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: Characterization of isolates brought into the EU from third countries. *Int J. Food. Microbiol.* 283:52-58. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.009.
- O'Neill. 2016. The Review on Antimicrobial Resistance. Final report. <http://amr-review.org/Publications>.
- Otto M. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with increased mortality. *Future Microbiol.* 7(2):189-191. doi:10.2217/fmb.11.156

- Pfeifer, Y., Eller, C. 2012. [Current data and trends about the resistance of Gram-negative pathogens to beta-lactams]. Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz. 55, 1405-1409.
- Qu, X., Wang, H., Chen, C., Tao, Z., Yin, C., Yin, A., Ma, C., Idris, A. 2019. Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Chinese hospitals - A five-year retrospective study. J. Infect. Dev. Ctries. 13, 1101-1107. doi: 10.3855/jidc.11798.
- Werner, G., Klare, I., Witte, W. 1997. Arrangement of the vanA gene cluster in enterococci of different ecological origin. FEMS. Microbiol. Lett. 155, 55-61. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12685.x.
- WHO. 2014. ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance. http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy.htm/en/.
- WHO. 2019. AWaRe Classification antibiotics. <https://www.who.int/news-room/detail/01-10-2019-who-releases-the-2019-aware-classification-antibiotics> .
- Witte, W., Cuny, C., Bräulke, C., Heuck, D., Klare, I. 1997. Widespread dissemination of epidemic MRSA in German hospitals. Euro. Surveill. 2, 25-28. doi: 10.2807/esm.02.04.00178-en.
- Yang, P., Chen, Y., Jiang, S., Shen, P., Lu, X., Xiao, Y. 2020. Association between the rate of fluoroquinolones-resistant gram-negative bacteria and antibiotic consumption from China based on 145 tertiary hospitals data in 2014. BMC. Infect. Dis. 20, 269-04981. doi: 10.1186/s12879-020-04981-0.

1 Teilprojekt: Kliniken und andere medizinische Einrichtungen

Projektpartner Universitätsklinikum Bonn (UKB), Institut für Hygiene und Public Health (IHPH)

Projektpartner Universitätsklinikum Bonn (UKB), Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP)

Projektpartner Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)

1.1 Teilbereich: Klinikabwässer

Die Relevanz von Klinikabwässern als Quelle von ARB, ihr Beitrag zur Verbreitung in der Umwelt und das Gesundheitsrisiko für den Patienten innerhalb des klinischen Bereichs wurden unter Federführung des GeoHealth Centres des IHPH am UKB in Zusammenarbeit mit der Wasserchemie/IHPH/UKB, dem IMMIP/UKB und dem IfG/KIT untersucht. Teilziele im Rahmen des Fallbeispiels Klinik waren dabei:

- Erkenntnisgewinn über die Bedeutung von Waschbecken-Siphons, Duschabläufen bzw. Toiletten in Patientenzimmern am Beispiel einer Hämato-Onkologie als Reservoir für Antibiotika-resistente Erreger;
- Identifizierung und Quantifizierung resistenter klinisch-relevanter planktonischer Bakterien über den Eintragspfad Klinikabwasser sowie deren Verbreitung in der aquatischen Umwelt (Vorfluter) sowie
- Erkenntnisgewinn hinsichtlich der Ausbreitung resistenter Bakterien aus dem Klinikbereich über den Abwasserpfad in die Umwelt (Microbial Dissemination) und hinsichtlich des Gesundheitsrisikos für Patienten innerhalb des Klinikbereichs (Source Tracking) als Risikobetrachtung für die Bevölkerung.

Hierfür wurde über zwei Jahre hinweg insgesamt 294 Proben von Abwasser und Gewässern entnommen. Diese entstammen verschiedenen Entnahmestellen entlang eines Abwasserpfads, beginnend auf einer Station bis hin zu dem, das behandelte Abwasser aufnehmende, Oberflächengewässer. Ein Zulauf der Kläranlage mit Klinik Einfluss und ein zweiter Klinik-unbeeinflusster Zulauf konnten unterschieden werden. Eine Charakterisierung des Kläranlagen-Einzugsgebiets erfolgte mittels Begehungen, Kartierungen und GIS-Analysen sowie Experten-Interviews. Das aufnehmende Fließgewässer wurde sowohl oberhalb als auch unterhalb der einleitenden Kläranlage beprobt.

Die Analyse der Wasserproben erfolgte neben der Bestimmung von physiko-chemischen und organoleptischen Vor-Ort-Parametern, auch mittels hygienisch-mikrobiologischer Methoden (Kultivierung und Identifizierung der Zielspezies aus den Wasserproben, Differenzierung anhand morphologischer und physiologischer Merkmale, MHK-Bestimmung), molekularbiologischer Analysen (MALDI-TOF, qPCR, Typisierung mit spa/DLST/MLST, Next Generation Sequencing) sowie chemisch-analytischer Untersuchungen. Kulturell wurde entsprechende der im Konsortium vereinbarten SOPs speziell auf MRSA (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*), VRE (Vancomycin-resistente Enterokokken) sowie Gram-negative Bakterien mit erweiterter Unempfindlichkeit gegen β -Laktam-Antibiotika (sog. ESBL) der Spezies *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. (KEC-Gruppe), Pseudomonaden (speziell *P. aeruginosa*), *Acinetobacter* spp. und *Proteus* spp. untersucht. Die am GeoHealth Centre des IHPH gewonnenen Isolate wurden am IMMIP per MALDI-TOF MS identifiziert, ihre Antibiotikaresistenz charakterisiert und auf Carbapenemasegene und die transferable Colistinresistenz untersucht. Die Isolate wurden außerdem in Hinsicht auf ihre Multiresistenz analysiert (3MRGN, 4MRGN, Resistenzen gegen neuere Reserveantibiotika), typisiert und auf ihre Zugehörigkeit zu bekannten Epidemie-Stämmen geprüft. Zusätzlich erfolgte die Kultivierung sogenannter Begleitparameter (*E. coli*, Intestinale Enterokokken, Pseudomonaden/*P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp.), welche – unabhängig vom

Resistenzstatus- eine hygienisch-relevante Belastung darstellen. Die molekularbiologischen Gennachweise aus Abwasserproben erfolgten aus den am IHPH gewonnenen Genextrakten beim Kooperationspartner KIT. Zudem erfolgte in der Wasserchemie am IHPH die Untersuchung auf Antibiotika und deren Rückstände.

1.1.1 Ergebnisse im Teilbereich: Klinikabwässer

- Es konnten in den Proben aus Waschbecken- und Dusch-Siphons sowie Toiletten der Patientenzimmer hohe und z.T. persistierende Kontamination mit AB-resistenten Erregern nachgewiesen werden. Besonders der Anteil an Carbapenemase-bildenden 4MRGN-Isolaten war hier höher als in allen anderen untersuchten Proben. Rohabwasser aus Klinikbereichen mit hohem Antibiotikaverbrauch erscheint aufgrund der enthaltenen Erreger-Dichte hochinfektiös (Sib et al. 2019, Müller et al. 2018). Für einzelne Stämme war ein Nachweis über die gesamte Laufzeit möglich, so dass von einer konstanten Besiedlung der Abwassersysteme ausgegangen werden muss. Erste Interventionsmaßnahmen (Einsatz von NaOH, Desinfektionsmitteln, mechanische Reinigung) waren auf lange Sicht nicht erfolgreich.
- Eine hohe und z.T. persistierende Kontamination des Abwassers mit ARB ließ sich auch in der angeschlossenen Kanalisation nachweisen. Es ließen sich dabei aus klinischem Abwasser deutlich mehr der von der WHO hochpriorisierten multiresistenten Erreger isolieren (MRSA und VRE), als aus dem urbanem/kommunalem Abwasser ohne angeschlossenes Krankenhaus bzw. aus häuslichem Abwasser. Gleiches gilt für multiresistente Gram-negative Erreger (v.a. sogenannte 4MRGN), sowie speziell ARB der Art *P. aeruginosa*. Insofern können Krankenhäuser und besonders Stationen mit hohem Antibiotikaverbrauch Schwerpunktemittenten für hochresistente Erreger darstellen (Müller et al. 2018, Schreiber et al. 2019, Voigt et al. 2020). Ferner zeigten die aus Krankenhausabwässern isolierten Stämme auch vermehrt Resistenzen gegen andere neuere Antibiotika oder Antibiotikakombinationen (Colistin, Tigecyclin, Amikacin, Ceftazidim/Avibactam und Ceftozolan/Tazobactam) (Sib et al., 2020). Insgesamt wurden im untersuchten Krankenhaus 45 verschiedene Carbapenemase-bildenden Klone nachgewiesen (Kehl et al., 2022).
- In der Kläranlage werden ARB wie auch andere hygienisch-relevante Mikroorganismen um im Median 3 log-Stufen (Spannweite: 2-4 log-Stufen) reduziert. Dennoch sind auch multi-resistente Isolate im Kläranlagen-Ablauf nachgewiesen worden. Eine Verbreitung (multi-) resistenter Bakterien aus dem Klinikbereich über den Abwasserpfad in die Umwelt findet also demnach statt (Müller et al. 2018, Schreiber et al. 2019, Kehl et al., 2022). Die Typisierung und Genomsequenzierung der Erreger zeigte, dass z. B. Carbapenemase-produzierende (NDM, Oxa-48) ST147 *K. pneumoniae*-Stämme von der Klinik bis zum Auslauf der Kläranlage durchgängig nachweisbar waren. Die Analyse der gesamten Genomsequenz per „core genome MLST“ (Vergleich von 2358 Genen) ergab, dass die Isolate aus dem Auslauf der Kläranlage sich nicht von den Isolaten

aus dem Krankenhaus unterschieden. Für Pseudomonaden waren die Stämme nicht an jeder Probenstelle zwischen Krankenhaus und Kläranlage nachweisbar, aber auch hier unterschied sich das Isolat aus dem Kläranlagenauslauf nur durch 4 Basenaustausche von dem nächstverwandten Isolat von der beprobten Station (Vergleich von 3867 Genen). Beide häufig nachgewiesenen *P. aeruginosa*-Stämme waren zudem hypervirulent. Die Art *E. coli* zeigte dagegen eine große Stammvielfalt (Kehl et al., 2022).

- ESBL-produzierende Bakterien sind im Gewässer bereits regelmäßig vorzufinden, jedoch selten multi-resistent. Im Vergleich zu anderen resistenten Erregern (ESBL, VRE) sind MRSA in Abwasser und Gewässern relativ selten nachweisbar. Verbreitung und Infektionsrisiko von MRSA über Wasser spielt daher eine untergeordnete Rolle (Schreiber et al. 2019).
- Einige Resistenzgene (ARG) sind ebenfalls in Abwasser und Gewässern nachweisbar. Andere ARG wie z.B. *mcr-1* (übertragbare Colistinresistenz) sind noch selten und wurden in unbehandeltem Rohabwasser, aber nicht im Gewässer gefunden (Schreiber et al. 2019, Voigt et al. 2020). Die Resistenzgene für Carbapenemasen waren in Klinikabwasser signifikant häufiger als im Abwasser ohne Klinikeinfluss (Sib et al., 2020).
- Zwischen dem Vorhandensein von Ciprofloxacin/Meropenem und dem Nachweis von ARB konnte in klinisch beeinflusstem Abwasser ein statistischer Zusammenhang nachgewiesen werden. Dies konnte vor allem für Ciprofloxacin und *P. aeruginosa* (resistent gegen 3. Generation Cephalosporine) gezeigt werden (Voigt et al. 2020). Die höchsten gemessenen Antibiotikakonzentrationen in den Abflüssen von Piperacillin und Meropenem übertrafen die minimalen selektiven Konzentrationen eines resistenten *Acinetobacter baylyi*-Stammes und die minimale selektive Konzentration von Ciprofloxacin lag im Bereich der gemessenen Höchstkonzentration in den Abflüssen.

1.1.2 Schlussfolgerung für das Teilprojekt Klinikabwässer

Das Abwassersystem beginnt bereits im Gebäude bzw. im unmittelbaren Patientenbereich (Siphons, Toiletten etc.). Eine retrograde Kontamination des Sanitärbereichs und daraus folgende Infektion von Patienten und Personal ist daher nicht auszuschließen.

Es wird ein akuter bis mittelfristiger Handlungsbedarf bezüglich der Identifikation und Realisierung geeigneter Präventionsmaßnahmen zum Schutz von Patienten, Personal und Besuchern gesehen, der je nach Station bzw. Immunstatus der Patienten in seiner Dringlichkeit und Bedeutung variiert.

Eine Option praktischer Verfahren zur Prävention und Kontrolle stellen, neben regelmäßigen Kontrollen der Siphons, Duschabläufe und Toiletten auf ARB durch die Krankenhaushygieniker, die Schulung des Pflege- und Reinigungspersonals sowie Aufklärung der Patienten dar. In sensiblen Bereichen, wie Intensivstationen oder hämato-onkologische Stationen mit immun-supprimierten Patienten, könnte als technische Präventionsmaßnahme die Installation thermischer Siphons helfen, welche im Abwasser enthaltene Mikroorganismen

durch Erhitzen abtöten. Alternativ wäre eine chemische Reinigung der Siphons zur Vermeidung einer retrograden Kontamination anwendbar. Die derzeit von der KRINKO am RKI erarbeiteten Empfehlungen sollten in jeden Fall umgesetzt werden.

Eine Verbreitung von multi-resistenten Bakterien (MRE) vom Abwasser in die Umwelt findet statt, zum einen als Eintrag über das in Kläranlagen behandelte Abwasser und zum anderen mit unbehandeltem Rohabwasser über Entlastungen der Mischkanalisation im Falle von Starkregenereignissen (siehe Teilprojekt kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung (Swist)).

Eine Behandlung hochbelasteten Abwassers erscheint sinnvoll, um die Verbreitung von MRE in die Umwelt zu reduzieren bzw. weitgehend zu unterbinden. Die kann dezentral am Ort der Entstehung oder zentral auf der Kläranlage durchgeführt werden. Aus hygienisch-fachlicher Sicht erscheint eine Reduktion von Belastungen effektiver möglich, je höher die Belastung bzw. je geringer das Volumen des zu behandelnden Abwassers ist. Hierfür wäre zu prüfen, in wie weit gesetzliche Vorgaben für Kliniken als Verursacher bzw. Einleiter von AB, ARB und ARG bzw. Krankheitserregern generell gemacht werden können, um ggf. notwendig, Grenzwerte zu definieren.

Einer Resistenzverbreitung innerhalb des Kanalsystems oder der Kläranlage, v.a. durch Selektion und horizontalen Gentransfer, würde durch vorgelagerte dezentraler Belastungsreduktion entgegengewirkt. Zusätzlich trägt eine dezentrale Lösung dazu bei, dass bei Starkregenereignissen weniger unbehandeltes Hochrisiko- Abwasser aus der Mischkanalisation (in Deutschland derzeit noch mehrheitlich verbaut) direkt aus dem Kanalnetz in die Gewässer eingeleitet wird.

Als sinnvolle Parameter im Rahmen einer zukünftigen Überwachungsstrategie zur ARB-Verbreitung in der Umwelt erscheinen v.a. Biofilmbildner geeignet, die kritische multi-resistente Erreger (MRE), und hier besonders 4MRGN, darstellen und spezifisch für Klinikabwasser zu sein scheinen, wie z.B. *P. aeruginosa* und/oder *Klebsiella* spp. bzw. die KEC-Gruppe. Eine MHK-Testung für die Identifikation des 3/4 MRGN-Status ist dabei sinnvoll. Als eher ungeeignet zeigte sich MRSA, die in geklärtem Abwasser und Gewässern selten nachweisbar sind.

Zur Beurteilung der Reduktionsleistung im Rahmen einer – wie auch immer realisierten - Abwasserbehandlung bietet sich ESBL *E. coli* als einfacher, häufig vorkommender und resistenter Fäkalindikator für ein regelmäßiges Monitoring an.

Zur Identifikation und Bewertung von Schwerpunkt-Emittenten in einem Einzugsgebiet werden human-relevante resistente coliforme Bakterien (KEC) oder spezifisch *Klebsiella* spp. als sinnvoll erachtet, sowie *P. aeruginosa* (ggf. als einmaliges Screening; inkl. MHK-Testung für 3/4 MRGN).

Ciprofloxacin könnte aufgrund der statistischen Zusammenhänge als Indikator für die Belastung mit Antibiotika-resistenten Bakterien, in klinisch beeinflusstem Abwasser, verwendet werden.

Zusammenfassend stellten sich die Klinikabwässer als am höchstes belastetes Reservoir von multi-resistenten Erregern (3MRGN und 4MRGN) dar und die Anzahl der hoch-resistenten Isolate übertraf deutlich die im Teilprojekt „Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer

ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung (Swist)“ sowie im Teilprojekt „Tierproduktion“ isolierten Stämme, in denen keine Carbapenemasen nachgewiesen werden konnten deutlich.

1.2 Veröffentlichungen im Teilprojekt Klinikabwässer und andere medizinische Einrichtungen

Kehl, K., Schallenberg, A., Szekat, C., Albert, C., Sib, E., Exner, M., Zacharias, N., Schreiber, C., Parcina, M., Bierbaum, G. “Microbial dark matter”: Dissemination of carbapenemase producers from the bowels of the hospital into the environment. *Sci Total Environ.* 806:151339. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151339).

Zacharias, N., Löckener, I., Essert, S.M., Sib, E., Bierbaum, G., Kistemann, T., Schreiber, C. (2021). Antibiotic-Resistant Bacteria in Clams-A Study on Mussels in the River Rhine. *Antibiotics* 10(5):571. doi: 10.3390/antibiotics10050571.

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. *Sci Total Environ.* 2021 750:142265. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142265.

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.** & C. Schreiber** (2020): Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater – an evaluation of clinical influences. *Chemosphere* 241: 125032 *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft.

Sib E.*, Lenz-Plet F.*, Barabasch V., Klanke U., Savin M., Hembach N., Schallenberg A., Kehl K., Albert C., Gajdiss M., Zacharias N., Müller H., Schmithausen R.M., Exner M., Kreyenschmidt J., Schreiber C., Schwartz T, Parcina M.**, Bierbaum G.** (2020): Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Science of the Total Environment*, 746:140894. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140894. *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft

Voigt, A. M., Skutlarek, D., Timm, C., Schreiber, C., Felder, C., Exner, M. & H.A. Faerber (2019): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a fast and simple method for the determination of several antibiotics in different aqueous matrices. *Environmental Chemistry*: <https://doi.org/10.1071/EN19115>.

Sib, E., Voigt, A. M., Wilbring, G., Schreiber, C., Faerber, H.A., Skutlarek, D., Parcina, M., Mahn, R., Wolf, D., Brossart, P., Geiser, F., Engelhart, S., Exner, M., Bierbaum G., & R.M. Schmithausen (2019): Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in biofilms in clinical wastewater networks. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 222 (4): 655–662 bzw. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.03.006>.

Müller, H., Zacharias, N., Timm, C, Schmithausen, R., Engelhart, S., Exner, M., Kistemann, T., Gajdiss, M., Bierbaum, G., Sib, E., Parcina, M. & C. Schreiber (2019): Antibiotika-resistente Bakterien im Abwasser von Patienten-Nasszellen. *Hygiene & Medizin Special 44 -Supplement (Sonderausgabe - Ulmer Symposium):* 43-45.

- Schreiber, C., Zacharias, N., Müller, H., Essert, S., Timm, C., Kistemann, T., Sib, E., Gajdiss, M., Parcina, M., Voigt, A., Färber, H., Exner, M., Schmithausen, R.M. & G. Bierbaum (2019): Einfluss von Krankenhausabwasser auf die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in der aquatischen Umwelt, In: Pinnekamp, J. (Hrsg.): 52. Essener Tagung für Wasserwirtschaft (=Gewässerschutz - Wasser - Abwasser 250): 19/1-19/15.
- Müller, H.* , Sib, E.* , Gajdiss, M.* , Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M.** , Schreiber, C.** & G. Bierbaum** (2018): Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. FEMS Microbiology Ecology 94 (5). *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft

2 Teilprojekt: Kommunale Kläranlagen, Eliminationsverfahren

Projektpartner Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)

Projektpartner Ostfriesischer Oldenburgischer Wasserverband (OOWV)

Projektpartner Zweckverband Klärwerk Steinhäule

Projektpartner Xylem Services GmbH

Projektpartner Universität Freiburg, früher KIT-IMT (Institut für Mikrosystem Technik)

2.1 Teilbereich: Kommunale Kläranlagen und Schlachthöfe

Das KIT in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner Ostfriesischer Oldenburgischer Wasserverband (OOWV) insgesamt 24 Kläranlagen unterschiedlichster Größe und Ausbaustufe überwiegend in Norddeutschland untersucht. Ein Großteil der Kläranlagen (11) behandelte vor allem kommunales Abwasser, 7 Kläranlagen hatten Krankenhäuser im Einzugsgebiet und 6 Kläranlagen behandelten größere Mengen an Abwässern aus Lebensmittel-verarbeitenden Betrieben.

Die Untersuchungen fokussierten sich auf die Kläranlagenabläufe, um das Verbreitungspotential klinisch relevanter Antibiotika-resistenter Bakterien zu analysieren. Dafür wurden 12 Antibiotikaresistenzgenmarker (Sulfonamid-, Makrolid-, Tetracyclin-, β -Laktam-, Carbapenem-, Vancomycin- und Colistinresistenz) und 5 Bakterienmarker (*E. coli*, Enterokokken, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* und *P. aeruginosa*) verwendet.

2.1.1 Ergebnisse aus: Kommunale Kläranlagen und Schlachthöfe

- Unabhängig von Einzugsgebiet der Kläranlagen und deren Größen wurde ein Großteil der Antibiotikaresistenzgene und fakultativ-pathogenen Bakterien in den Ausläufen der Kläranlagen in signifikanten Konzentrationen nachgewiesen und kategorisiert werden (Häufig, mittel häufig und geringe Häufigkeit) (Tabelle 1, Hembach et al., 2019).
- Tagefrachtberechnungen aller Antibiotikaresistenzgene und fakultativ-pathogene Bakterien für die untersuchten Kläranlagen unterschieden sich im Bereich von 2 Logstufen. Trotz eines deutlich höheren Ablaufvolumens zeigen größere Kläranlagen nicht zwangsläufig auch eine erhöhte Emission an Antibiotikaresistenzen im Vergleich zu kleineren Kläranlagen. D.h. die Emission aus kleinen Kläranlagen ist in einigen Fällen ebenso hoch, wie die von Großkläranlagen (Alexander et al., 2019).
- Pearson-Korrelationen zeigen für Kläranlagen mit Krankenhäusern im Einzugsgebiet (Kliniken mit hoher Bettenzahl, Universitätskliniken) ein erhöhtes Vorkommen von fakultativ pathogenen Bakterien mit Resistenzen gegen Reserveantibiotika (z.B. *bla*NDM, *vanA*) im gereinigten Abwasser.
- Kläranlagen mit signifikantem Abwasseranteil aus bestimmten Schlachthöfen wiesen ebenfalls Antibiotikaresistenzen gegen Reserveantibiotika wie Vancomycin (*vanA*) oder das mobile Colistinresistenzgen *mcr-1* auf (Hembach et al., 2017; Alexander et al., 2019).

Tabelle 1: Kategorisierung der nachgewiesenen Resistenzgene und fakultativ-pathogenen Bakterien.

	Resistenzgen	Art und Funktion
Häufig	<i>bla</i> TEM	Verantwortlich für 90% aller Ampicillinresistenzen in <i>E. coli</i> , gilt als Vorläufer für Enzyme mit ESBL-Wirksamkeit
	<i>erm</i> B	Resistenz gegen Makrolide wie Erythromycin
	<i>tet</i> M	Resistenz gegen Tetracyclin, Tetracyclin macht ¼ aller verschriebenen Veterinärantibiotika aus
	<i>sul</i> 1	Resistenz gegen Sulfonamide
Mittlere Häufigkeit	<i>bla</i> CMY2	Resistenz gegen Beta-Laktamantibiotika/Cephalosporine, vermittelt niedrigschwellige Resistenz gegen Carbapeneme
	<i>bla</i> CTX-M15	häufigste Typ bei ESBL produzierende Bakterien, veterinär-assoziiert
	<i>bla</i> CTX-M32	häufigste Typ bei ESBL produzierende Bakterien, human-assoziiert
	<i>bla</i> OXA48	Resistenz gegen Carbapeneme (Reserveantibiotika)
Geringe Häufigkeit	<i>mec</i> A	MRSA assoziierte Antibiotikaresistenz
	<i>bla</i> NDM1	Resistenz gegen Carbapeneme (Reserveantibiotika)
	<i>bla</i> VIM2	Resistenz gegen Carbapeneme, häufig auf <i>P. aeruginosa</i> und <i>K. pneumoniae</i>
	<i>van</i> A	Resistenz gegen Vancomycin (Reserveantibiotika), seit 2018 deutliche Zunahme der Resistenz von <i>E. faecium</i> gegenüber Vancomycin (VRE)
	<i>bla</i> KPC-3	Resistenz gegen Carbapeneme, häufig in fakultativ-pathogenen Gram-negativen Bakterien
	<i>mcr</i> -1	Resistenz gegen Colistin/Polymyxin (letztes Mittel gegen schwere Infektionen durch multiresistente Gram-negative Erreger)
Bakterien		
<i>A. baumannii</i>	<i>sec</i> E	5% aller klinischen Infektionen
<i>K. pneumoniae</i>	<i>glt</i> A	4,5% aller klinischen Infektionen
<i>P. aeruginosa</i>	<i>ecf</i> X	5,8% aller klinischen Infektionen
<i>E. coli</i>	<i>ycc</i> T	16,6% aller klinischen Infektionen
Enterokokken	23S rRNA	14,3% aller klinischen Infektionen
<i>E. faecalis</i>	<i>ddl</i>	6,9% aller klinischen Infektionen
> 50% aller gemeldeten bakteriellen Infekte		

2.2 Teilbereich: Erweiterte Abwasserbehandlungsverfahren

An der Großkläranlage Steinhäule (440.000 EW) wurden in Kooperation mit Projektpartner Zweckverband Klärwerk Steinhäule, Xylem Services GmbH und Universität Freiburg erweiterte Abwasserbehandlungsverfahren zur Reduktion fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzträgern untersucht. Dazu gehörten:

- Ultrafiltration Membrantechnologie (20 nm Porengröße); Zweckverband Steinhäule
- Ozonbehandlung (1 g O₃/g DOC; 5 Minuten Kontaktzeit), Xylem Services GmbH
- UV-Bestrahlung (400 J/m²), Xylem Services GmbH

- Ozon/UV Kombination; Xylem Services GmbH
- Sand und Aktivkohlefiltration; Zweckverband Steinhäule.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden auch unterschiedliche Ozonkonzentrationen, Verweilzeiten im Ozonkontaktreaktor und UV Intensitäten eingesetzt, die jedoch hinsichtlich der mikrobiologischen Parameter bei gleichzeitig erhöhtem Kostenaufwand keine signifikanten Verbesserungen ergaben.

2.2.1 Ergebnisse aus: Erweiterte Abwasserbehandlungsverfahren

- Sand- und Aktivkohlefiltration sind für eine effektive Reduktion der mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungsparameter (18 Antibiotikaresistenzgenen und 5 fakultativ-pathogenen Bakterienspezies) nicht geeignet (Jäger et al., 2018).
- Ultrafiltration, Ozonung und Kombination aus Ozonung mit UV-Bestrahlung > Ozonung > UV) zeigen unter Berücksichtigung der Lebend-Tot Diskriminierung die deutlichsten Reduktions- bzw. Eliminationsleistungen (Hembach et al., 2019; Hiller et al., 2019, Jäger et al., 2018).
- Die Ultrafiltration weist die effektivste Reduktion (bis zu 6 Logstufen/Elimination) auf.
- Die Kombination von Ozon gekoppelt mit Aktivkohlefiltration (Abbau/Inaktivierung von Antibiotikarückständen bzw. Spurenstoffen) und einer nachfolgenden Membranfiltration (Barrierefunktion für Bakterien) ist ein sinnvolles Verfahren, um sowohl Bakterien zurückzuhalten, als auch auftretende Selektionsereignisse für Antibiotikaresistenzen effektiv zu bekämpfen (Hembach et al., 2019; Alexander et al., 2019).
- Online Biofilmanalysen mit Hilfe eines amperometrischen Sensorverfahren (Universität Freiburg) belegen erfolgreiche Reinigungszyklen an den Membranen bzw. ein zeitlich abhängiges Fouling in Form von Biofilmen an der Membran der Ultrafiltration.
- Metagenomanalysen bestätigen eine erhöhte Belastung an Antibiotikaresistenzen und fakultativ-pathogenen Bakterien im Retentat der Membrantechnologien, die einer eigenständige Risikobewertung benötigen (Hembach et al., 2019).

2.3 Nachweis von fakultativ-pathogenen Bakterien im Vorfluter

Langzeituntersuchungen der untersuchten mikrobiologischen Parameter im aufnehmenden Oberflächengewässer belegen eine langfristige Persistenz über mehrere Wochen von kultivierbaren fakultativ-pathogenen Bakterien. Diese ist abhängig von der Bakterienspezies, und zeigt sich besonders bei *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die anfänglichen hohen Abundanzen an *E. coli* und *E. faecium/faecalis* im Abfluss der Kläranlage Steinhäule und im aufnehmenden Fluss Donau nahmen zwar über den

Untersuchungszeitraum kontinuierlich ab, waren aber nach 4 Wochen immer noch im aufnehmende Oberflächengewässer im Kulturverfahren nachweisbar.

2.4 Schlussfolgerung des Teilprojekts: Kommunale Kläranlagen, Elimination

- Die konventionelle Abwasserbehandlung an Kläranlagen verhindert nur unzureichend die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen.
- Zum Schutz der Trinkwassergewinnung, Badegewässer und Bewässerung in der Landwirtschaft müssen an als belastet eingestuften Kläranlagen Maßnahmen zur Gesundheitsvorsorge getroffen werden. Nicht alle Kläranlagen müssen mit zusätzlichen Behandlungsverfahren ausgestattet werden.
- Mikrobiologische Indikatoren für Handlungsbedarf: Resistenzen/Gene gegen Carbapeneme, Colistin, Vancomycin (Reserveantibiotika) in fakultativ-pathogenen Bakterien (ESKAPE-Gruppe), sowie Multiresistenz (4 MRGN). Reduktion der genannten Indikatoren muss ausreichend hoch sein, besser Elimination (99-99,99% bezogen auf Nachklärung oder 5-7 Logstufen bezogen auf Zulauf Kläranlage).
- Eine dezentrale Abwasserbehandlung an Kliniken oder in der Tierverarbeitung trägt zur Minderung der Belastung in Kläranlagen bei (z.B. Multiresistenz, Carbapenem-Resistenz *bla*NDM-1 bei Kliniken; Colistin-Resistenz *mcr*-1 bei Tierverarbeitung).
- Technische Lösungen stehen bereits zur Verfügung und können an erforderlichen Stellen (Kliniken, Kläranlagen) bereits eingesetzt werden (Kombinationen von oxidativen und adsorptiven Verfahren mit Membranverfahren sind höchst effektiv).
- Regularien und Grenzwerte zum Nachweis bzw. zur Reduktion von Antibiotikaresistenten Bakterien sind notwendig.

Übergreifendes Fazit:

Die mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen der Kläranlagen belegen die deutliche Emission hygienisch relevanter mikrobiologischer Parameter nach konventioneller Behandlung direkt in die aquatische Umwelt. Diese stellen somit ein deutliches Risiko für die Verbreitung und damit einer möglichen Kolonisierung der Menschen im Kontakt mit dem Wasser dar. Dies trifft zu, wenn aquatische Schutzgüter wie Badegewässer und Wässer, die zur landwirtschaftlichen Beregnung genutzt werden. Eine Beeinflussung von Rohwässern für eine Trinkwasseraufbereitung ist ebenfalls nicht auszuschließen, da ein Transfer von Resistenzgenen auch auf autochthone Bakterien erfolgen kann. Da Kläranlagen der direkte Link zur Umwelt darstellen, sind Maßnahmen an dieser Stelle erforderlich, auch wenn dezentrale Maßnahmen (z.B. an ausgewählten Krankenhäusern, Schlachthöfen) zu einer Veränderung des Belastungspotentials für spezifische Determinanten beitragen können.

2.5 Veröffentlichungen im Teilprojekt: Kommunale Kläranlagen, Eliminationsverfahren

- Alexander, J., Hembach, N., Schwartz, T. (2020) Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany, *Nature Scientific Reports* (accepted and in press)
- Hiller, C.X., Hübner, U., Fajnorova, S., Schwartz, T., Drewes, J.E. (2019), „Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review”, *Science of Total Environment*, 685, 596-608
- Alexander, J., Hembach, N., Schwartz, T. (2019), “Die Problematik der Antibiotika-resistenten Bakterien”. *wwt Sonderausgabe Modernisierungsreport 2019/20*, 52-57.
- Hembach, N., Alexander, J., Hiller, C.X., 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“. *Nature Scientific Reports*, Volume 9, Article number: 12843
- Jäger, T., Hembach, N., Elpers, C., Wieland, A., Hiller, C.X., Krauter, G., Schwartz, T. (2018) “Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment”, *Frontiers in Microbiology*, 9, 2599
- Jäger T., Alexander, J., Kirchen, S., Dötsch, A., Wieland, A., Hiller, C.X., Schwartz, T. (2018) „Live-dead discrimination analysis, qPCR assessment for opportunistic pathogens, and population analysis at ozone wastewater treatment plants” *Environmental Pollution*, 232, 571-579
- Hembach, N., Alexander, J., Wieland, A., Hiller, C.X., Schwartz, T. (2018) “Investigation of the elimination performance of various advanced wastewater treatment processes to reduce facultative-pathogenic bacteria”. *Vom Wasser - Das Journal*, 2/18.
- Schwartz, T., Pinnekamp, J., Exner, M. (2018) “Verbreitung antibiotikaresistenter Bakterien durch Abwasser: Erste Erkenntnisse aus dem BMBF Verbundprojekt HyReKA“ *Journal für Arbeitsschutz und Umwelt*, Regierungspräsidium Darmstadt 2018
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C.X., 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*, Volume 8, 1282.

3 Teilprojekt: Hot Spots in der Wertschöpfungskette Fleisch

Projektpartner Food Net Center, AG „One Health” (C. Heinemann, B. Petersen, J. Steinhoff-Wagner)

Projektpartner Food Net Center, AG “Food Waste” (M. Savin, J. Kreyenschmidt)

3.1 Landwirtschaftliche Nutztierhaltung und Abwässer aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen

Zur Abschätzung der Relevanz des Austragsrisikos von antibiotikaresistenten Bakterien aus der fleischerzeugenden Produktionskette wurden in Hähnchen- und Schweinemastbetrieben und in Geflügel- und Schweineschlachthöfen Proben gezogen und analysiert. Wissenschaftliches Ziel war es hierbei die Eintragsquellen resistenter Bakterien aus der Wertschöpfungskette „Fleisch“ in den Wasserkreislauf zu identifizieren. Weiterhin sollte anhand der Ergebnisse eine Abschätzung der Auftretenswahrscheinlichkeit, Bedeutung und Entdeckungswahrscheinlichkeit Antibiotikaeinträge und resistenter Bakterien für später mögliche Monitoringsysteme ermöglicht werden. Durch die kulturelle Analyse wurde die Diversität resistenter Indikatorkeime von lebenden Tieren, aus deren nahem Umfeld, aus Schlachthofabwässern bis hin zur kommunalen Kläranlage charakterisiert. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden Handlungsempfehlungen zur Risikominimierung erarbeitet.

Die Probenmatrices waren hierbei Staub, Luft, Tränkewasser, Mist respektive Gülle, Futter und Rektal- respektive Nasaltupfer von Tieren aus insgesamt 40 Hähnchen- und Schweinemastbetrieben. Die Proben wurden kulturell mikrobiologisch mit verschiedenen Selektivmedien untersucht. Das Untersuchungsspektrum an antibiotikaresistenten Bakterien umfasste dabei die Erreger der ESKAPE-Gruppe (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) und *Escherichia coli*. Die Speziesbestimmung erfolgte mittels Massenspektrometrie. Ausgewählte Isolate wurden mittels Mikrodilution auf ihre Empfindlichkeit gegenüber für Humanmedizin besonders relevanten Antibiotika näher charakterisiert. Als MRSA identifizierte Isolate wurden zudem *spa*-typisiert. Zudem wurden verschiedene Managementcharakteristika (u.a. der Einsatz von Antibiotika in einem Zeitraum von 3 Monaten vor der Probenahme) der Betriebe mittels Fragebogen erfasst.

Von insgesamt 990 untersuchten Proben aus den Mastbetrieben wurden in 224 Proben (23%) resistente Erreger nachgewiesen; 766 (77 %) Proben waren kulturell unauffällig.

Als resistente Erreger wurden von den Proben 151 auf MRSA, 72 auf *E. coli*, 21 auf *A. baumannii*, 4 auf *Enterobacter* spp., 2 auf *P. aeruginosa*, 2 auf *K. pneumoniae*, eine auf *Citrobacter* spp. positiv getestet. Teilweise enthielten die Proben mehr als eine der genannten Spezies. In keiner Probe wurden VRE nachgewiesen. Keines der untersuchten Isolate war 4MRGN. Von den isolierten MRSA wurden 267 Isolate *spa*-typisiert (Schwein: 236; Geflügel: 31). Hierbei dominierten in der Schweinemasthaltung die *spa*-Typen t011, t034 und t2011. In Einzelfällen wurden zudem die *spa*-Typen t1170, t1451, t3275, t4030, t5675 und t571 detektiert. In den Isolaten aus der Geflügelmast wurde ausschließlich der *spa*-Typ 034 gefunden. Der überwiegende Teil der MRSA Isolate wurde dem CC398 zugeordnet.

Auf den Schweinemastbetrieben gaben 17 Betriebsleiter*innen Auskunft zum Einsatz von antibiotischen Wirkstoffen. Auf 14 der 17 Schweinemastbetriebe wurden 3 Monate vor der Probenahme ein oder mehrere Antibiotika eingesetzt. Größtenteils wurden hierbei Einzeltiere behandelt (10 von 14). Eingesetzt wurden überwiegend Beta-Lactame (8) und Tetracycline (7), gefolgt von Florfenicolen (3), Lincosamiden (1) und Makroliden (1). Dabei wurden in der Schweinemast keine umgewidmeten Carbapeneme oder Colistin eingesetzt. Bei den an der Studie teilnehmenden Geflügelmastbetrieben gaben 8 von 20 Betrieben an in den letzten 3

Monaten vor der Beprobung ihren Bestand antibiotisch behandelt zu haben. Hierbei ist anzumerken, dass bei einer medikamentösen Behandlung in der Geflügelhaltung immer alle Tiere eines Stalles behandelt werden, da eine Einzeltierbehandlung weder möglich noch nutzbringend wäre. Eingesetzt wurden auf den besuchten Geflügelmastbetrieben hauptsächlich Lincosamide (4), Polymyxine (3) und das Beta-Lactam-Antibiotikum Amoxicillin (2). Jeweils ein Mal wurde Trimethoprim, Sulfamethoxazol, Doxycyclin und das als besonders kritisch einzustufende Enrofloxacin zur Behandlung eingesetzt. Der Antibiotikaeinsatz der beprobten Betriebe spiegelt die erwarteten Wirkstoffe und Häufigkeiten wieder und zeigt den großen Effekt der staatlichen und privatwirtschaftlichen Monitoringmaßnahmen bei der Minimierung des Antibiotikaeinsatzes in den vergangenen 5-10 Jahren (Wallmann et al., 2019).

Die Proben aus Geflügel- und Schweinemastbetrieben zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich Auftretenshäufigkeit und Resistenzmuster im Vergleich zu Proben aus den klinischen und kommunalen Abwässern (Sib et al., 2020 submitted).

Es konnte ein Zusammenhang zwischen Antibiotikaresistenz und Resistenzrate, sowie ein Unterschied in der Speziesdiversität in Abhängigkeit von der Tierart und dem Managementkonzept festgestellt werden (Heinemann et al., 2019a; Heinemann et al., 2019b).

Der restriktive Umgang mit antibiotischen Wirkstoffen in der Tierhaltung verringert das Risiko der Verschleppung in der fleischerzeugenden Kette über kolonisierte Tiere. Die Einsatzhäufigkeit und -menge sind stark von der Haltungsform, dem Betriebsmanagement und dem Wissen über Möglichkeiten der Gesundheitsvorsorge und beispielsweise im Speziellen der Effizienz von Hygienemaßnahmen abhängig (Heinemann et al., 2020a, Heinemann et al., 2020b).

Um den Einsatz von Antibiotika und damit auch den möglichen Austrag von Antibiotikarückständen und -resistenzen in die Umwelt in das aquatische System zu beurteilen, sind verstärkte Investitionen in produktbegleitende überbetriebliche Gesundheitsmanagementsysteme erforderlich. Die Diversität an ARP und Antibiotikarückständen in Abwässern von Anlieferungsbereich von Schlachthöfen lässt sich hierbei als Indikator für den Erfolg von wirtschaftsgetragenen Qualitätsprogrammen nutzen.

Generell muss betont werden, dass sich die Situation in der Nutztierhaltung seit Einführung des Antibiotikamonitorings (privatwirtschaftliches Monitoring über die QS-Datenbank und behördliches Monitoring auf Basis der 16. AMG-Novelle) bereits verbessert hat und vor allem auch privatwirtschaftliche Anreize zur Reduktion von Antibiotika mit besonderer Bedeutung für den Menschen, wie z.B. Fluorchinolone und Cephalosporine der 3. und 4. Generation eine Wirkung zeigen. Allerdings sollte das vom BfR durchgeführte Resistenzmonitoring im landwirtschaftlichen Bereich um klinische Aspekte, wie zusätzliche Erregertypen und zusätzliche getestete Antibiotika erweitern werden, um eine bessere Abschätzung des Risikos für den Menschen zu ermöglichen. Zudem sind die Partner des Verbundprojektes der Auffassung, dass wie in Australien auf den Einsatz von Fluorchinolonen und entsprechend der Empfehlung der WHO von Colistin vollständig verzichtet werden sollte. Hierbei soll nochmal hervorgehoben werden, dass lediglich auf einem von 40 teilnehmenden Mastbetrieben Enrofloxacin und auf 3 von 40 Betrieben Colistin zur Bestandsbehandlung vom Tierarzt*in verschrieben wurde. Den meisten Landwirten war die Resistenzproblematik bewusst, sie

hatten Interesse an zusätzlichen Informationen zu dem Resistenzstatus auf ihrem Betrieb und sie haben sich gerne zur Teilnahme bereit erklärt. Durch eine überwiegende Teilnahme an Markenfleischprogrammen und Branchenstandards wie QS waren die teilnehmenden Betriebe gewohnt, externen Personen gegenüber transparente Auskünfte zu erteilen und ihre Nutztierhaltung zu zeigen. Auf keinem Betrieb wurden inkonsistente Aufzeichnungen oder Aussagen zum Antibiotikaeinsatz festgestellt.

Ein zusätzlicher Ansatzpunkt zur Verbesserung der Resistenzsituation in der Nutztierhaltung, wäre es Anreize zu schaffen um den Ausbau von Tiergesundheits-, Hygiene- und Resistenzmonitorings weiter zu fördern und in bestehende privatwirtschaftliche Systeme zu integrieren. Die in den Antibiotika-Monitorings aufgenommenen Daten könnten mit anderen Daten, z.B. Schlachtdaten verknüpft und noch weitergehend ausgewertet werden. Derzeit ist das große Potential durch die Digitalisierung und intelligente Datenverarbeitung noch nicht ausgeschöpft, um systematisch Gesundheitsprobleme, auffällige Betriebe oder auffälliges Verschreibungsverhalten zu identifizieren und dann gezielt anzugehen.

Wie bereits oben beschrieben, Geflügel und Schweine sind potenzielle Träger der ESKAPE-Bakterien und *E. coli*, die eine klinische Relevanz für den Menschen darstellen. Aufgrund der hohen Anzahl an Tieren aus Betrieben mit unterschiedlich erfolgreichem Gesundheitsmanagement, die in Schlachthöfen verarbeitet werden, repräsentieren Prozesswässer und Abwasser eine wichtige Quelle der Bakterien der ESKAPE-Gruppe.

Um diese Hypothese zu testen, wurden Prozesswässer und Abwasser, die in Anlieferungsbereichen und in schwarzen Produktionsbereichen sowie in betriebseigenen und kommunalen Kläranlagen von vier Schlachthöfen zu mehreren Zeitpunkten genommen und mittels kultureller Verfahren auf ESKAPE-Bakterien untersucht. Die Isolate wurden phänotypisch und genotypisch auf deren Resistenzen untersucht und epidemiologisch typisiert. Ausgewählte Isolate wurden mittels Whole Genome Sequencing näher charakterisiert.

Abwasser und Prozesswässer aus Geflügelschlachthöfen stellten wichtige Reservoirs für antibiotikaresistente Bakterien mit klinischer Relevanz dar. *E. coli* der ExPEC-Phylogruppen B2, D und F wurden an allen Probenahmestellen der untersuchten Schlachthöfe nachgewiesen. Es wurden Hochrisikoklone (z. B. ST10, ST69, ST117, ST648) detektiert, die weltweit an Infektionen beim Menschen beteiligt sind. Die Mehrheit der ESBL-produzierenden *E. coli* trug Gene, die für CTX-M-1-, TEM-116-, TEM-52- und SHV-12- β -Lactamasen kodieren. Es wurden jedoch keine Carbapenemasen nachgewiesen. MRSA-Isolate gehörten hauptsächlich zu CC9 (t1430, t13177) und CC398 (t8588, t011, t034), die die häufigsten LA-MRSA in Europa repräsentieren. Das Auftreten von VRE war selten. Es wurde lediglich ein VRE-Isolat ST1249 detektiert, was bereits in Geflügelprodukten in UK beschrieben wurde (Savin et al. 2020a, Gouliouris et al. 2018).

Darüber hinaus bildeten Abwasser und Prozesswässer aus Schweineschlachthöfen ein weiteres wichtiges Reservoir für ESKAPE-Bakterien und ESBL-produzierende *E. coli*. Nur ein geringer Anteil von ESBL-produzierenden *E. coli* wurde den Virulenz-assoziierten ExPEC-Gruppen B2 und D zugeordnet. Jedoch wurden nachgewiesene Klone der ST10, ST117, ST101, ST354, ST453, ST1170, ST1284 und ST1431 bereits in Infektionen bei Menschen in Deutschland beschrieben. Isolierte LA-MRSA gehörten größtenteils zu CC398 (t011, t034,

t2011, t2576) und wurde an allen Probenahmestellen detektiert. ESKAPE-Bakterien, die das höchste potenzielle Risiko für den Menschen darstellen, wie z. B. *E. coli* der klinisch relevanten klonalen Linien (ST10, ST69, ST95, ST131, ST167, ST405, ST648), CPE, VRE sowie HA-MRSA der CC5 und CC22 wurden hauptsächlich in kommunalen Abwässern nachgewiesen. Nichtsdestotrotz, war das Vorkommen von CPE in kommunalen Kläranlagen gering (Savin et al. 2020b).

In untersuchten Proben aus Geflügelschlachthöfen wurde eine hohe Prävalenz an Colistin-resistenten Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *E. cloacae*-Komplex) festgestellt. Jedoch exprimierte nur ein geringer Anteil der Isolate (<6%) ein MDR-Phänotyp (kombinierte Resistenz gegen Piperacillin-Tazobactam, Cefotaxime und Ciprofloxacin). Nichtsdestotrotz, trug ein hoher Anteil der *E. coli* (70.8%, 46/65) und *K. pneumoniae* (20.6%, 7/34) Isolate das *mcr-1* Gen auf einer Vielzahl übertragbarer Plasmide, die zu den IncI1-, IncHI2-, IncX4-, IncF- und IncI2-Gruppen gehörten und eine Größe zwischen 30 kb und 360 kb hatten. Darüber hinaus zeigte die Mehrzahl der *E. coli* und *K. pneumoniae* Isolate, die negativ auf *mcr-1* bis *mcr-9* getestet wurden, nicht-synonyme Polymorphismen in *pmrAB*-Genen. Es wurde gezeigt, dass *mcr-1* auch durch Fluorchinolone und Tetracycline co-selektiert werden kann. Daher ist es erforderlich, neben Colistin den Einsatz von Antibiotika bei Nutztieren generell zu reduzieren (Savin et al. 2020c).

Unter ESBL-produzierenden, und Colistin-resistenten *K. pneumoniae*-Isolaten aus den Geflügel- und Schweineschlachthöfen sowie den kommunalen Kläranlagen wurde eine Vielzahl an klinisch relevanten Klonen (z. B. ST15, ST17, ST37, ST147, ST412, ST873, ST896) detektiert. In den Isolaten aus kommunalen WWTPs wurde die höchste Vielfalt an Antibiotikaresistenzgenen (n=77) nachgewiesen, die Resistenzen gegen zehn Antibiotika-Klassen verleihen. Isolate aus Geflügelschlachthöfen zeigten die höchste Resistenzrate gegen Colistin. Wohingegen der höchste Anteil an Carbapenem-resistenten Isolaten in kommunalen Kläranlagen festgestellt wurde. Jedoch wurden keine Carbapenemase nachgewiesen (Savin et al. 2020d).

Die ubiquitäre Verbreitung von Bakterien der ESKAPE-Gruppe (insb. *E. coli* und MRSA), die Resistenzen gegen „Highest Priority Critically Important Antimicrobials“ (i.e. Cephalosporine 3. und höheren Generationen, Fluorchinolone, Polymyxine) aufweisen, in Prozesswässern und Abwasser von Geflügel- und Schweineschlachthöfen ist besorgniserregend. Eine Kolonisierung bzw. abhängig von individuellem Gesundheitszustand und der Expositionintensität zu kontaminiertem Wasser, Infektion der Schlachthofmitarbeiter ist nicht vollkommen auszuschließen. Des Weiteren, durch mögliche Kreuzkontaminationen der Schlachtkörper (z.B. mit Brühwasser) können diese Bakterien in die Lebensmittelkette eingetragen werden und stellen somit möglicherweise ein potentielles Risiko für Verbraucher dar. Darüber hinaus werden sie durch betriebseigene Kläranlagen, die keine weitergehende Abwasserreinigung (z.B. Ultrafiltration, Ozonbehandlung) betreiben, nicht vollständig eliminiert und gelangen so in Oberflächengewässer. Im Fall von betriebseigenen Kläranlagen der Geflügelschlachthöfe, die das Abwasser mittels Ultrafiltration und Ozon aufbereiten, wurde gezeigt, dass sich die Gesamtkeimbelastung um 4-6 log-Stufen reduzierte, sodass die ausgewählten Erreger in der Mehrheit der Ablauf-Proben (n=12/16) nicht mehr nachweisbar waren. Für direktleitende Betriebe zeigen die Ergebnisse, dass gezielte Maßnahmen zur Abwasserbehandlung in betriebsinternen Kläranlagen von Schlachthöfen

einen wertvollen Beitrag zur Risikominimierung im aquatischen System liefern, weshalb diese weiter gefördert werden sollten. Final bleibt jedoch festzuhalten, dass der verantwortungsbewusste Einsatz von Antibiotika in Tierhaltungen sich als wichtigste Stellschraube zur Vermeidung von Resistenzen zeigte. Auf Betrieben, die in den letzten drei Monaten keine Antibiotika eingesetzt haben, wurden auch nur sehr selten resistente Mikroorganismen gefunden, unabhängig davon ob es sich um einen konventionell oder biologisch wirtschaftenden Betrieb handelt.

Generell besteht noch weiterer Forschungsbedarf zu den nachfolgend aufgeführten Aspekten:

Reduktion des Antibiotikaeinsatzes in den tierhaltenden Betrieben:

- Welche weiteren Maßnahmen führen zu einer Verbesserung von Monitoring und Gesundheitsmanagement?
- Wie kann der Tiergesundheitsstatus auf landwirtschaftlichen Betrieben noch weiter verbessert werden?
- Wie könnte eine Aktualisierung von bestehenden privatwirtschaftlichen Antibiotika-Monitorings in Verbindung mit Resistenz-Monitorings gestaltet werden?

Maßnahmen zur Risikominimierung der Einträge von Antibiotikarückständen und Antibiotika-resistenten Bakterien in die Umwelt und den Wasserkreislauf:

- Welche Relevanz haben Rinder- und Milchviehbetriebe bei der Ausbreitung von antibiotikaresistenten Erregern und Antibiotikarückständen über Gülle und Prozessabwässer in die aquatische Umwelt?
- Wie ist die Relevanz von antibiotikaresistenten Erregern der Gattungen *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. in der fleischerzeugenden Kette zu bewerten?
- Welche Relevanz haben die Abwässer aus Rinder- und Putenschlachthöfen?
- Was beeinflusst die Persistenz ausgewählter Erreger der ESKAPE-Gruppe in der (aquatischen) Umwelt und im Biotop Tierstall?
- Kann durch risikoorientierte Organisation des Schlachtprozesses hinsichtlich der belasteten Betriebe eine Minimierung der Verbreitung erreicht werden?

3.2 Veröffentlichungen im Teilprojekt: Landwirtschaftliche Nutztierhaltung und Abwässer aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen

Savin M, Bierbaum G, Mutters NT, Schmithausen RM, Kreyenschmidt J, García-Meniño I, Schmogger S, Käsbohrer A, Hammerl JA. Genetic Characterization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* spp. from Municipal and Slaughterhouse Wastewater. *Antibiotics* (Basel). 2022 Mar 24;11(4):435. doi:10.3390/antibiotics11040435.

Savin M, Alexander J, Bierbaum G, Hammerl JA, Hembach N, Schwartz T, Schmithausen RM, Sib E, Voigt A, Kreyenschmidt J. (2021) Antibiotic-resistant bacteria, antibiotic resistance genes, and antibiotic residues in wastewater from a poultry

slaughterhouse after conventional and advanced treatments. Sci Rep.;11(1):16622. doi: 10.1038/s41598-021-96169-y.

Savin M, Bierbaum G, Kreyenschmidt J, Schmithausen RM, Sib E, Schmoger S, Käsbohrer A, Hammerl JA. (2021) Clinically Relevant *Escherichia coli* Isolates from Process Waters and Wastewater of Poultry and Pig Slaughterhouses in Germany. Microorganisms. 9(4):698. doi:10.3390/microorganisms9040698.

Savin M, Bierbaum G, Hammerl JA, Heinemann C, Parcina M, Sib E, Voigt A, Kreyenschmidt J. (2020a): ESKAPE bacteria and extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater and process water from German poultry slaughterhouses. Appl Environ Microbiol 86:e02748-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02748-19.9>

Savin M, Bierbaum G, Hammerl JA, Heinemann C, Parcina M, Sib E, Voigt A, Kreyenschmidt J. (2020b): Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. Science of The Total Environment 727:138788. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138788.

Savin M, Bierbaum G, Blau K, Parcina M, Sib E, Smalla K, Schmithausen R, Heinemann C, Hammerl JA, Kreyenschmidt J. (2020c). Colistin-resistant Enterobacteriaceae isolated from process waters and wastewater from German poultry and pig slaughterhouses. Submitted to Frontiers in Microbiology on 23.06.2020.

Savin M, Parcina M, Schmoger S, Kreyenschmidt J, Käsbohrer A, Hammerl JA. 2019. Draft Genome Sequences of *Acinetobacter baumannii* Isolates Recovered from Sewage Water from a Poultry Slaughterhouse in Germany. Microbiol Resour Announc 8. doi:10.1128/MRA.00553-19.

Savin M, Heinemann C, Bierbaum G, Dohlen S, Parcina M, Sib E, Kreyenschmidt J. 2018. Wastewater from a pig slaughterhouse as a reservoir for clinically relevant antibiotic-resistant pathogens and their dissemination into surface water. Poster Presentation, Joint Event on International Conference on Food Safety & Regulatory & 3rd International Conference on Water Microbiology, Water Sustainability and Reuse Technologies, 03.-04. December 2018, Chicago, USA. J Food Microbiol Saf Hyg 2018, Volume 3, DOI: 10.4172/2476-2059-C4-018

Schmithausen, R.M.; Schulze-Geisthoevel, S.V.; Heinemann, C.; Bierbaum, G.; Exner, M.; Petersen, B.; Steinhoff-Wagner, J. (2018): Reservoirs and Transmission Pathways of Resistant Indicator Bacteria in the Biotope Pig Stable and along the Food Chain: A Review from a One Health Perspective. Sustainability, 10(11), 3967. DOI:10.3390/su10113967

Steinhoff-Wagner, J.; Hayer, J.J.; Heinemann, C. (2018): Antibiotics as confounding factor in newborn calf studies investigating effects on the intestinal microbiome (2018), Res Vet Sci. 2018 Oct 12;121:104-105. doi:10.1016/j.rvsc.2018.10.006

Sib E.*, Lenz-Plet F.*, Barabasch V., Klanke U., Savin M., Hembach N., Schallenberg A., Kehl K., Albert C., Gajdiss M., Zaccharias N., Müller H., Schmithausen R.M., Exner M., Kreyenschmidt J., Schreiber C., Schwartz T, Parcina M.**, Bierbaum G.** (2020): Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. Science of the Total Environment. *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft

4 Teilprojekt: Bedeutung von Flugverkehr und Regenüberlaufbecken

Projektpartner TU Dresden, Institut für Hydrobiologie

4.1 Teilbereich: Flugzeugabwässer als Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien

In zahlreichen Ländern werden Antibiotika in größerem Umfang eingesetzt, als in Deutschland. Zudem unterscheidet sich der relative Anteil der eingesetzten Substanzklassen von Land zu Land. Es liegt also nahe, dass sanitäre Einrichtungen, die von einem internationalen Publikum frequentiert werden, eine höhere Belastung mit Antibiotikaresistenzen aufweisen. Diese könnte sich potentiell in einer erhöhten Abundanz als auch in einer erhöhten Diversität von Resistenzen widerspiegeln.

Die o. g. Hypothese wurde am Beispiel von sanitären Einrichtungen in Flugzeugen untersucht. Zu diesem Zweck wurde Flugzeugabwasser an insgesamt 5 Standorten in ganz Deutschland zu mehreren Zeitpunkten gewonnen. Für Referenzzwecke wurden Zuläufe kommunaler Kläranlagen beprobt. Darunter sind Anlagen mit und ohne Anschluss an einen nahe gelegenen Flughafen. Die relative Abundanz ausgewählte Resistenzgene wurden mittels qPCR quantifiziert. Ausgewählte Proben wurden zudem mittels Metagenomics analysiert, um das gesamte Spektrum bekannter Resistenzgene zu erfassen. Zusätzlich wurde die Häufigkeit phänotypischer Resistenzen am Modellorganismus *E. coli* bestimmt.

4.1.1 Ergebnisse zum Teilbereich Flugzeugabwasser als Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien

Als wesentliche Ergebnisse der Untersuchungen sind zu nennen (Heß et al., 2019):

- Die relative Abundanz von Resistenzgenen war im Flugzeugabwasser signifikant höher als im gewöhnlichem kommunalen Rohabwasser. Dies betrifft insbesondere Gene, die Resistenzen gegen Antibiotika aus den Gruppen der Phenicol, Sulphonamide oder Tetracycline vermitteln. Dagegen wurden genotypische Resistenzen gegen β -Lactame im Flugzeugabwasser ähnlich häufig wie im kommunalen Abwasser gefunden.
- Im Flugzeugabwasser wurden mehr unterschiedliche Resistenzgene bezogen auf eine Einheit bakterieller DNA gefunden, was die o. g. Hypothese bzgl. der Gendiversität unterstützt.
- Multiresistente Isolate von *E. coli* wurden im Flugzeugabwasser signifikant häufiger als im kommunalen Abwasser gefunden. Etwa 60% der Flugzeugisolate sind resistent gegen Antibiotika aus drei oder mehr Klassen.
- Proben aus Zuläufen kommunaler Kläranlagen mit und ohne Anschluss an Flughäfen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede bzgl. der relativen Abundanz von Resistenzgenen.

Die genannten Ergebnisse legen nahe, dass Abwässer aus Flugzeugtanks eine außergewöhnliche Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien darstellen. Im Zuge der Vermischung von Flugzeugabwasser mit sonstigem kommunalen Abwasser kommt es jedoch zu einem erheblichen Verdünnungseffekt. Die spezielle Problematik des hoch belasteten Flugzeugabwassers besteht demnach primär im Eintrag „exotischer“ Resistenzgene, welche das Abwasser-Resistom des Ziellandes „bereichern“. Inwieweit die

speziellen Umweltbedingungen in Flugzeugtanks die Selektion resistenter Bakterien fördern, ist durch weitergehende Untersuchungen zu klären.

Auf methodischer Ebene erwies sich der Einsatz der Metagenomics als besonders wertvoll, da hiermit - im Gegensatz zur qPCR - das gesamte Spektrum vorhandener Resistenzgene erfasst wird. Naturgemäß bestehen Limitationen bzgl. der Erfassung sehr geringer Abundanzen. Für häufigere Gene zeigte sich jedoch eine gute Übereinstimmung der mittels Metagenomics bzw. qPCR gewonnenen quantitativen Ergebnisse.

4.2 Teilbereich: Kanalisationsüberläufe als Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien

Ein großer Anteil des deutschen Kanalnetzes ist als Mischwassersystem konzipiert. Starkniederschläge führend regelmäßig zu einer Überschreitung der Speicherfähigkeit des Kanalnetzes bzw. zur Überauslastung der Reinigungskapazität der Kläranlagen, so dass ein Teil des kommunalen Abwassers ungereinigt in die Gewässer geleitet werden muss. Der damit verbundene Eintrag von Antibiotikaresistenzgenen bzw. resistenten Bakterien wurde bisher kaum quantitativ erfasst.

Durch das Institut für Hydrobiologie wurden Kanalisationsüberläufe an 3 Standorten in Sachsen untersucht. Die Beprobung erfolgte jeweils zu Zeitpunkten eines tatsächlichen Überlaufes (insgesamt 12 Proben). Analysiert wurden die Abundanz ausgewählter Resistenzgene (*sul1*, *tetM*, *mcr1*, *blaTEM*, *blaKPC-3*, *blaOXA-48*, *blaOXA-58*, *blaCTXM-15*, *blaCTXM-32*) sowie der relative Anteil phänotypisch resistenter *E. coli* Isolate (24 getestete Antibiotika).

4.2.1 Ergebnisse zum Teilbereich Kanalisationsüberläufe als Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien

Als wichtigste Resultate sind zu nennen:

- Die Belastungssituation der Kanalisationsüberläufe mit Resistenzgenen war an den 3 untersuchten Standorten grundsätzlich ähnlich. Tendenziell wurden mit zunehmender Größe des Einzugsgebiets der Kläranlage etwas höhere Abundanzen beobachtet.
- Die Abundanz von Resistenzgenen im Kanalisationsüberlauf war in keinem Fall signifikant höher, als die Abundanz im Standardablauf der jeweiligen Kläranlage (gereinigtes Abwasser). In zahlreichen Fällen war sie sogar signifikant geringer.
- Hinweise auf einen signifikant erhöhten Anteil resistenter *E. coli* Isolate im Kanalisationsüberlauf wurden nicht gefunden.

Die Ergebnisse deuten an, dass die Überläufe der Kanalisation in Bezug auf die Konzentration von Resistenzgenen bzw. resistenten Bakterien nicht stärker belastet sind, als die Abläufe von Kläranlagen, welche gereinigtes Wasser abgeben. Dies ist mutmaßlich auf die erhebliche Verdünnung mit großen Mengen Niederschlagswasser zurückzuführen. Davon unberührt

können Kanalisationsüberläufe in Bezug auf die Gen- bzw. Bakterienfracht einen erheblichen Anteil an der Belastung des Einleitgewässers haben.

4.3 Teilbereich: Auftreten von Colistin-Resistenzgenen im kommunalen Abwasser

Bakterielle Resistenzen gegen Reserveantibiotika für humanmedizinische Anwendungen stellen ein besonderes Risiko dar. Vor diesem Hintergrund wurde das Auftreten von *mcr*-Genen im kommunalen Rohabwasser untersucht. Letztere vermitteln Resistenz gegen das als Colistin bekannte Reserveantibiotikum Polymyxin-E. Im Unterschied zu bisherigen Studien wurde die Abundanz von *mcr*-Genen mittels Metagenomics quantifiziert. Die geringere Sensitivität dieser Methode im Vergleich zur qPCR stellt einen Nachteil dar. Der wesentliche Vorteil besteht aber darin, dass das gesamte Spektrum von *mcr*-Genen detektiert wird und nicht nur jene, die vom eingesetzten spezifischen Primer erfasst werden.

4.3.1 Ergebnisse zum Teilbereich: Auftreten von Colistin-Resistenzgenen im kommunalen Abwasser

Untersuchungen an 9 deutschen Probenahmestellen (14 Proben insgesamt) ergaben folgendes Bild (Kneis et al., 2019):

- Das häufig untersuchte Colistin-Resistenzgen *mcr-1* konnte lediglich in einer einzigen Probe in geringer relativer Abundanz nachgewiesen werden.
- Andere Genvarianten (*mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-7*), die bisher nur selten quantifiziert wurden, waren in sämtlichen untersuchten Proben nachweisbar und zwar in deutlich höheren relativen Abundanzen als *mcr-1*. Das betrifft insbesondere die Genvariante *mcr-3*.

Die Ergebnisse legen nahe, dass durch eine Fokussierung auf das *mcr-1* Gen die tatsächliche Abundanz genotypischer Colistin-Resistenzen deutlich unterschätzt wird. Zum Zwecke einer zuverlässigen Quantifizierung sollte folglich auf genomische Methoden bzw. ein größeres Set von PCR-Primern zurückgegriffen werden. Weitere Untersuchungen zur möglichen Herkunft und Verbreitung der gefundenen *mcr*-Gene werden aktuell durchgeführt.

4.4 Teilbereich: Resistente Bakterien und Resistenzgene im Gewässer

Durch die Einleitung gereinigten Abwassers werden erhebliche Mengen von Antibiotikaresistenzgenen und resistenten Bakterien in die Oberflächengewässer entlassen. Während theoretische Verdünnungseffekte leicht berechnet werden können, bestehen hinsichtlich der Elimination bzw. Persistenz von Resistenzgenen und resistenten Bakterien in den Einleitgewässern große Wissenslücken. Aufgrund erhöhter Biomassen und Stoffumsatzraten an der Gewässersohle ist anzunehmen, dass das hyporheische Interstitial für den horizontalen und vertikalen Transfer von Resistenzgenen eine besondere Bedeutung besitzt.

Die am Institut für Hydrobiologie durchgeführten Arbeiten sollten am Beispiel eines mit Abwasser belasteten Nebenflusses der Elbe (Lockwitzbach) klären, inwieweit die Sohlsedimente tatsächlich einen ‚hot-spot‘ der Antibiotikaresistenz darstellen und welche Effekte im Zuge einer Remobilisierung des Sediments zu erwarten sind. Zu diesem Zweck wurden Wassersäule und Sedimente zu 8 Zeitpunkten an mehreren Orten beprobt und hinsichtlich phänotypischer Resistenzen (*E. coli*, 24 Antibiotika) sowie bezüglich der relativen Abundanz von Resistenzgenen (*sul1*, *tetC*, *blaOXA-58*, *blaKPC-3*, *mecA*) charakterisiert.

4.4.1 Ergebnisse zum Teilbereich: Resistente Bakterien und Resistenzgene im Gewässer

Die gewonnenen Erkenntnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen (Heß et al., 2018):

- Erwartungsgemäß wurden im Gewässersediment höhere Bakteriendichten als im Freiwasser gefunden (Anreicherung um ca. Faktor 10 bezogen auf ein Einheitsvolumen).
- Eine generelle, statistische signifikante Anreicherung phänotypischer Resistenzen im Gewässersediment konnte für den Modellorganismus *E. coli* nicht nachgewiesen werden. Vielmehr wurden im Wasserkörper signifikant häufiger Penicillin-Resistenzen registriert.
- Laut qPCR-Analysen ist die relative Abundanz von Resistenzgenen in Sediment verglichen mit den Freiwasser im Mittel lediglich leicht erhöht. Stärkere Anreicherungen im Sediment (bis ca. Faktor 100) wurden nur in einzelnen Proben beobachtet.
- Es ist lediglich mit einer moderaten Erhöhung der Konzentration antibiotikaresistenter Bakterien zu rechnen, wenn Sohlsedimente in Folge erhöhter Abflüsse remobilisiert werden.

Obwohl der Lockwitzbach als typisches Beispiel eines kleinen, mit kommunalem Abwasser belasteten Mittelgebirgsflusses gilt, sind die o. g. Erkenntnisse als gewässerspezifisch zu betrachten. In Flüssen mit stärker organisch geprägten Sedimenten und größeren Einleitungen von Abwasser muss mit stärkeren Remobilisierungseffekten gerechnet werden.

Übergreifendes Fazit

Die am Institut für Hydrobiologie durchgeführten Untersuchungen belegen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Projektpartner, dass über den Pfad des kommunalen Abwassers erhebliche Mengen von antibiotikaresistenten Bakterien bzw. Resistenzgenen in die Gewässer eingetragen werden. Die Untersuchungen an Flugzeugtanks zeigen, dass neben bekannten ‚hot-spots‘ (wie z.B. Krankenhäusern) weitere außerordentliche Quellen hochgradig multiresistenter Bakterien existieren. Die Studie am Lockwitzbach machte weiterhin deutlich, dass resistente Bakterien bzw. Resistenzgene nicht allein über Punktquellen in die Gewässer gelangen, sondern - wie im Fall anderer Belastungen - Einträge diffuser Natur zu berücksichtigen sind. Die Studie zur Verbreitung von *mcr*-Genen zeigte auf, dass die tatsächliche Prävalenz genotypischer Resistenzen leicht unterschätzt werden kann, wenn lediglich die Abundanz eines spezifischen Gens bestimmt wird.

4.5 Veröffentlichungen im Teilprojekt Bedeutung von Flugverkehr und Regenüberlaufbecken

Heß, S., Kneis, D., Österlund, T., Li, D., Kristiansson, E., Berendonk, T.U. (2019) „Sewage from airplanes exhibits high abundance and diversity of antibiotic resistance genes“. *Environmental Science and Technology*, in print, <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03236>

Kneis, D., Berendonk, T.U., Heß, S. (2019) „High prevalence of colistin resistance genes in German municipal wastewater“. *Science of the Total Environment*, 694, 133454.

Heß, S., Berendonk, T.U., Kneis, D. (2018) „Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in the bottom sediment of a small stream and the potential impact of remobilization“. *FEMS Microbiology Ecology*, 94 (9), fiy128.

5 Teilprojekt: Oberflächengewässer, Grund- und Rohwasser

Projektpartner Universitätsklinikum Bonn (UKB), Institut für Hygiene und Public Health (IHPH)

Projektpartner Erftverband, Bergheim

Projektpartner Universitätsklinikum Bonn (UKB), Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP)

Projektpartner DVGW-Technologiezentrum Wasser (TZW), Karlsruhe

5.1 **Teilbereich: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung**

Die Relevanz von kommunalen Abwässern ohne Klinik-Einfluss als Quelle von ARB, ihr Beitrag zum Verbreitungspotential in der Umwelt bzw. aufnehmenden Fließgewässer und das Gesundheitsrisiko für verschiedene Gewässer-Nutzer wurden unter Federführung des GeoHealth Centres des IHPH am UKB und des Erftverbands in Zusammenarbeit mit der Wasserchemie/IHPH/UKB, dem IMMIP/UKB und dem TZW untersucht. Teilziele im Rahmen des Fallbeispiels Swist waren dabei:

- Identifizierung und Quantifizierung resistenter klinisch-relevanter planktonischer Bakterien über den Eintragspfad kommunale Abwässer sowie deren Verbreitung in der aquatischen Umwelt.
- Erkenntnisgewinn hinsichtlich des Gesundheitsrisikos für den Menschen durch resistente Bakterien infolge von anthropogenen Gewässernutzungen (z.B. Baden, Bewässerung) mit dem Ziel einer umfassenden Risikobetrachtung für die Bevölkerung im Sinne der „Microbial Dissemination“.

Hierfür wurden von GeoHealth Centre/IHPH/UKB und Erftverband über zwei Jahre hinweg insgesamt 227 Proben von Abwasser und Gewässern im Einzugsgebiet des Swistbachs als 24h-Mischproben oder qualifizierte Stichproben genommen, dazu 37 Ereignisproben verschiedener niederschlagsbedingter Abflüsse, sowie insgesamt 189 Proben aus Biofilmen (quartalsweise) und Muscheln beprobt. Eine Charakterisierung des Einzugsgebiets erfolgte mittels Begehungen, Kartierungen und GIS-Analysen sowie Experten-Interviews.

Die Analyse der Wasserproben erfolgte auf mehrere Ebenen entsprechend der erarbeiteten SOPs (s. Teilprojekt Klinikabwässer): Die Bestimmung von physiko-chemischen und organoleptischen Vor-Ort-Parametern bei der Probennahme sowie kulturelle Analytik von ARB (MRSA, VRE, ESBL) und Begleitparametern einschließlich Differenzierung verdächtiger Isolate anhand morphologischer und physiologischer Merkmale oblag dem GeoHealth Centre des IHPH/UKB; Art-Identifikation per MALDI-TOF, MHK-Testung, qPCR mit Isolaten und Typisierung wurden am IMMIP/UKB durchgeführt; qPCR in Wasserproben am TZW. Umfangreiche chemische Analytik lief beim Erftverband (insgesamt 200 Parameter, u.a. Nährstoffe, Schwermetalle, Mikroschadstoffe, Antibiotika) und zusätzliche Antibiotika-Analytik in der Wasserchemie am IHPH/UKB.

Beprobte wurden kommunale Abwässer jeweils an den Zuläufen (Rohabwasser) und Abläufen (behandeltes Abwasser) der vier kommunalen in die Swist einleitenden Kläranlagen im als kontinuierlich schüttende Punktquellen, dazu im Falle von Starkregenereignissen direkt aus der Kanalisation unbehandelt eingeleitetes Abwasser (Mischwasser am Zu- und Ablauf eines Retentionsbodenfilters) sowie über Trennkanalisation abgeleitetes Niederschlagswasser (Regenbeckenauslass).

Im Gewässer-Verlauf des Swist-Baches wurden acht Stellen mit unterschiedlich hohem Abwassereinfluss beprobt: ein Abwasser-unbeeinflusster, zuführender Bach im Wald ohne Siedlungseinfluss (Oberlauf), diverse Stellen an Fließgewässern mit verschiedenem Siedlungseinfluss (Kläranlagen-Einleitungen, Oberflächenabfluss versiegelter Flächen,

Mischwasserabschläge, Trennkanaleinleitungen) bis hin zu der Mündung in den aufnehmenden Fluss (Erft).

Diffuse Einträge unversiegelter Flächen aus dem Landschaftswasserhaushalt wurden exemplarisch an zwei Stellen mit landwirtschaftlicher Nutzung als Grünland (Rack) und Acker (Drainage) beprobt.

Zudem wurden Persistenzversuche durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich resistente Umweltisolate der Zielspezies in der Umwelt verhalten. In Wasserproben der Swist mit unterschiedlichem Abwasser-Einfluss wurde die Persistenz verschiedener zudotierter ARB in Reinkultur unter standardisierten Laborbedingungen untersucht.

Im Rahmen der Risikobeurteilungen einer Rückübertragung der ARB aus der Umwelt zum Menschen wurden zum einen an mehreren Stellen im Rhein Muscheln der Gattungen *Corbicula* spp. und *Dreissena* spp. gesammelt und das Muschelfleisch, sowie korrespondierende Wasserproben, auf ARB untersucht, zum anderen erfolgten umfangreiche Literaturrecherchen zu Dosis-Wirkungsbeziehungen und zu QMRA (quantitative microbial risk assessment). Statistische Verfahren und Analysen wurden zur Untersuchung des Zusammenhangs im Vorkommen von AB, ARB und ARG genutzt.

5.1.1 Ergebnisse zum Teilbereich: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung

- Im Vergleich zu anderen, z.T. ubiquitär vorkommenden, resistenten Erregern (ESBL, VRE) sind MRSA im kommunalen Abwasser ohne Klinik-Einfluss und in den Gewässern relativ selten nachweisbar. Es ließen sich aus kommunalem bzw. häuslichem Abwasser deutlich weniger von der WHO hochpriorisierte multiresistente Gram-negative Erreger (sogenannte 4MRGN), MRSA und VRE isolieren, als aus dem klinischem Abwasser (Müller et al 2018, Schreiber et al 2019).
- Einige ARG sind nahezu ubiquitär in Abwasser und Gewässern nachweisbar. Andere wie z.B. *mcr-1* (übertragbare Colistinresistenz) sind selten und wurden im Rohabwasser, aber im Gewässer nicht gefunden. Eine Verbreitung in der Umwelt durch Weitergabe zwischen verschiedenen Bakterien ist für viele Resistenzgene generell möglich (Schreiber et al. 2019).
- Kommunale Kläranlagen an der Swist können ARB im Abwasser analog zu "normalen" Bakterien um im Mittel rund 3 log-Stufen (99,9%) reduzieren. Eine vollständige Elimination ist für die ARB und die Antibiotikarückstände nicht zu erwarten. Es wurde nachgewiesen, dass noch resistente Erreger mit dem behandelten Abwasser über Kläranlageneinleitungen in die Gewässer gelangen (Müller et al., 2018, Schreiber et al., 2019).
- Die Eliminierung von Antibiotikarückständen fällt in den Kläranlagen stoffspezifisch sehr unterschiedlich aus. Einige Wirkstoffe werden praktisch vollständig zurückgehalten. Insbesondere die Wirkstoffe Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Clarithromycin konnten noch regelmäßig in den Kläranlagen-Abläufen nachgewiesen werden (Voigt et al 2020). In den Gewässern war nur

Sulfamethoxazol noch regelmäßig nachweisbar (erst unterhalb der ersten KA-Einleitstelle).

- Im Gewässerverlauf ist generell ein Anstieg der Bakterienkonzentrationen mit zunehmendem Siedlungseinfluss zu erkennen. Dieser gilt sowohl für resistente Erreger, als auch für andere Krankheitserreger (Müller et al. 2018, Schreiber et al. 2019). Ein Zusammenhang zwischen Siedlungsbeeinflussung bzw. Abwasseranteil mit dem Vorkommen von pathogenen Bakterien (u.a. *P. aeruginosa*) im Wasser wurde in anderen Studien bereits statistisch belegt (s.a. Schreiber 2019).
- Ursache für die Konzentrations-Anstiege von Erregern sind bei Trockenwetterbedingungen v.a. Kläranlagen-Einleitungen. Über Mischwasserentlastungen bei Starkregen gelangen MRE direkt und ohne Behandlung des Abwassers aus dem Kanalnetz in die Gewässer. Die Konzentration resistenter Bakterien übersteigt die von Kläranlagenabläufen dabei im Schnitt um das 100-1000fache (entsprechend der Konzentration im Rohabwasser, mit Regen verdünnt). Auf Grundlage des Aufkommens von Antibiotikarückständen im unbehandelten Abwasser ist ebenso von einer Antibiotika-Emission über Mischwasserabschläge auszugehen.
- Das eingeleitete (Niederschlags-)Wasser aus Trennkanalisationen ist nicht frei von ARB und anderen Krankheitserregern. Ursache hierfür sind u.a. Fehlanschlüsse und Abschwemmungen von den versiegelten Flächen (Schreiber et al 2019). Neben Kläranlagen existieren damit weitere bedeutende relevante Eintragspfade für ARB im Falle von Niederschlägen in einem Einzugsgebiet.
- Eine Reduktion der ARB und AR in Mischwasser über Retentionsbodenfilter vor Einleitung ins Gewässer konnte nachgewiesen werden. Eine RBF-Passage reduziert ARB und die mikrobiellen Belastungen um 1 bis 2 log-Stufen (Zacharias et al., submitted a), also ähnlich gut wie Kläranlagen.
- Es ließen sich in Muscheln vereinzelt ARBs der Spezies *Pseudomonas* spp. und *A. baumannii* nachweisen. Darunter befanden sich keine multiresistenten Erreger. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Muscheln die ARBs aus den Habitaten aufnehmen, aber auch durch Ihren Stoffwechsel abbauen und nicht akkumulieren (Zacharias et al, submitted b). Muscheln scheinen demnach kein wesentliches Reservoir für ARBs darzustellen, und damit wenig zur Resistenzverbreitung in der Umwelt sowie bei Verzehr zurück auf den Menschen beitragen.
- In Fließgewässern mit hohem Abwasseranteil sind MRE in Konzentrationen nachweisbar, die eine Gesundheitsgefährdung nicht ausschließen lassen. Eine Modellierung des Risikos im Sinne einer quantitativen Risikoabschätzung mit der Ermittlung von Infektionswahrscheinlichkeiten ist mit der aktuellen Datengrundlage derzeit nicht möglich.

5.2 Schlussfolgerung für das Teilprojekt Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung

Die Bedeutung einzelner Schwerpunkt-Emittenten muss für jedes Gewässer-Einzugsgebiet gesondert bewertet werden. Jedes Einzugsgebiet ist unterschiedlich charakterisiert z.B. bzgl. Flächennutzungen, Bevölkerungsdichte, Kanalnetzsituation oder Landschaftsausstattung. Daher können unterschiedliche Belastungsquellen in den Vordergrund rücken. Zur Quellen-Bewertung ist eine Fracht-Bilanzierung für das Einzugsgebiet notwendig.

Für ausgewiesene und genehmigte Wassernutzungen (z.B. Badegewässer, Beregnungswasser) sind bereits Vorgaben hinsichtlich der Bakterienbelastung einzuhalten. Diese Qualitätsziele sind so hoch, dass bei Einhaltung der jeweils zulässigen Wasserqualität eine Gesundheitsgefährdung durch MRE nicht zu besorgen ist (Exner et al., 2018).

Anders als bei Badeseen sind im Falle von Badestellen an Fließgewässern temporär nach Regenereignissen erhöhte Bakterienkonzentrationen nachweisbar. Ein zeitweiliges Gesundheitsrisiko durch Krankheitserreger und auch ARB beim Baden ist dann nicht auszuschließen. Die Identifikation potentieller stromaufwärts gelegener Emittenten, ein engmaschiges Monitoring und nötigenfalls zeitweiliges Schließen solcher Badegewässer wird daher empfohlen.

Die Wasserqualität inoffizieller Badestellen wird nicht überwacht und ist - v.a. an Fließgewässern - bzgl. hygienischer Belastungen häufig schlechter als jene offizieller überwachter Badestellen. Aufklärung der Bevölkerung und Appell an Eigenverantwortung ist hier angebracht (s.a. DWA M-624).

Die Verbreitung und das Infektionsrisiko von MRSA über Gewässer spielen wegen der hier relativ seltenen und geringen Nachweise eher eine untergeordnete Rolle.

Die Resistenzsituation im Ist-Zustand (insb. unbehandeltes Abwasser) gibt Anlass zur Besorgnis. Weitergehende Beobachtungen (Trend-Analysen) sind nötig, mittelfristig sind ggf. standortspezifische Maßnahmen zu ergreifen (z.B. an Punktquellen Bau von RBF, MBR, etc.). Es sollte hier ein Kriterienkatalog und Bewertungsrahmen für die Identifizierung geeigneter Maßnahmen erarbeitet werden, der auch eine Priorisierung von Maßnahmen ermöglicht. Das Gewässer-Monitoring sollte um ARB, ARG und AR ergänzt werden, um künftig Resistenzveränderung in der Umwelt bewerten zu können.

Eine Reduktion von hygienisch-relevanten Mikroorganismen im Abwasser generell, und damit auch ARB, erfolgt bereits bei der Abwasser-Behandlung in den Kläranlagen. Die Elimination kann hier bei Ertüchtigung um weitere Ausbaustufen verbessert werden, aber wird den Eintrag in die Umwelt nicht vollständig verhindern. Als Überwachungs-Parameter zur Beurteilung der Reduktionsleistung oder des generellen Kontaminationsgrades (regelmäßiges Monitoring) bietet sich ESBL *E. coli* als einfacher, häufiger und resistenter Fäkalindikator an. Es fehlt an gesetzlichen Vorgaben für die Einleitung von Abwasser hinsichtlich AB und ARB, bzw. Krankheitserregern generell. Hier ist zu klären, auf welcher fachlichen und regulatorischen Grundlage ggf. Grenzwerte für Einleitungen erhoben werden sollen/können.

Ein hoher, kurzfristiger Handlungsbedarf wird in Gebieten mit Mischkanalisation gesehen, ein mittelfristiger Handlungsbedarf in Gebieten mit Trennkanalisation. Es ist hierfür ein

Kriterienkatalog und Bewertungsrahmen für die Identifizierung von Maßnahmen auf Ebene der Mischwassereinleitungen (Bau von RBF, intelligente Kanalnetzsteuerung, Erweiterung des Retentionsvolumens etc.) zu schaffen, die den direkten Eintrag über unbehandeltes Abwasser bei Starkregen verringern. Dieser Bewertungsrahmen muss auch eine Priorisierung von Maßnahmen ermöglichen. Die systematische Suche und Behebung bzw. gezielte Vermeidung von Fehlschlüssen in der Trennkanalisation wird als zielführend (aber langwieriger als nachgeschaltete Maßnahmen) angesehen und sollte daher vorgeschrieben werden. Darüber hinaus ist die weitergehende Behandlung von Niederschlagseinleitungen aus Trennkanalisation zu empfehlen. Um Trennkanalisation in Neubaugebieten zu realisieren, sollten diese ggf. gefördert oder verbindlich gefordert werden.

Der Einsatz von Retentionsbodenfiltern zur weitergehenden Behandlung der Einleitungen aus Punktquellen (Misch- und Trennkanalisation) scheint gut geeignet, wo Platzbedarf realisierbar ist.

5.3 Veröffentlichungen im Teilprojekt: Oberflächengewässer Grund- und Rohwasser

Zacharias N., Essert S. M., & C. Schreiber (submitted a): Performance of Retention Soil Filters for the Reduction of Antibiotic-resistant Bacteria and Other Pathogenic Microorganisms in Raw and Treated Wastewater before Being Discharged into Surface Waters. *Water Science and Technology*.

Zacharias N., Löckener I., Essert S.M., Sib E., Bierbaum G., Kistemann T., Schreiber C. (2021): Antibiotic-resistant bacteria in clams – as study on mussels in the river Rhine. *Antibiotics* (Basel). 2021 May 12;10(5):571. doi: 10.3390/antibiotics10050571.

Sib E. *, Lenz-Plet F. *, Barabasch V., Klanke U., Savin M., Hembach N., Schallenberg A., Kehl K., Albert C., Gajdiss M., Zacharias N., Müller H., Schmithausen R.M., Exner M., Kreyenschmidt J., Schreiber C., Schwartz T, Parcina M.**, Bierbaum G.** (2021): Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Science of the Total Environment*:746:140894. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140894 *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft

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.** & C. Schreiber** (2019): Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater – an evaluation of clinical influences. *Chemosphere* 241: 125032 *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft

Voigt, A. M., Skutlarek, D., Timm, C., Schreiber, C., Felder, C., Exner, M. & H.A. Faerber (2019): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a fast and simple method for the determination of several antibiotics in different aqueous matrices. *Environmental Chemistry*: <https://doi.org/10.1071/EN19115>.

Müller, H., Zacharias, N., Timm, C, Schmithausen, R., Engelhart, S., Exner, M., Kistemann, T., Gajdiss, M., Bierbaum, G., Sib, E., Parcina, M. & C. Schreiber (2019): Antibiotika-

resistente Bakterien im Abwasser von Patienten-Nasszellen. Hygiene & Medizin Special 44 -Supplement (Sonderausgabe - Ulmer Symposium): 43-45.

- Schreiber, C., Zacharias, N., Müller, H., Essert, S., Timm, C., Kistemann, T., Sib, E., Gajdiss, M., Parcina, M., Voigt, A., Färber, H., Exner, M., Schmithausen, R.M. & G. Bierbaum (2019): Einfluss von Krankenhausabwasser auf die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in der aquatischen Umwelt, In: Pinnekamp, J. (Hrsg.): 52. Essener Tagung für Wasserwirtschaft (=Gewässerschutz - Wasser - Abwasser 250): 19/1-19/15
- Exner, M., Schmithausen, R., Schreiber, C., Bierbaum, G., Parcina, M., Engelhart, S., Kistemann, T., Sib, E., Walger, P. & T. Schwartz (2018): Zum Vorkommen und zur vorläufigen hygienisch-medizinischen Bewertung von Antibiotika-resistenten Bakterien mit humanmedizinischer Bedeutung in Gewässern, Abwässern, Badegewässern sowie zu möglichen Konsequenzen für die Trinkwasserversorgung. Hygiene & Medizin 43(5): D46-D54.
- Müller, H.*, Sib, E.*, Gajdiss, M.*, Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M.** , Schreiber, C.** & G. Bierbaum** (2018): Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. FEMS Microbiology Ecology 94 (5). *geteilte Erstautorenschaft, **geteilte Letztautorenschaft.

6 Teilprojekt: Bewertung der urbanen Gewässereinträge und Möglichkeiten der Eintragsminderung

Institut für Siedlungswasserwirtschaft (ISA) RWTH Aachen

6.1 Teilbereich: Relevanz verschiedener urbaner Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt

In Abbildung 1 sind die verschiedenen potentiell relevanten urbanen Abwasserströme für den Eintrag von Antibiotikaresistenzen dargestellt, welche auch im HyReKA-Projekt beprobt wurden. Unter dem Sammelbegriff Antibiotikaresistenzen sind antibiotikaresistente Bakterien (ARB), Antibiotikaresistenzgene (ARG) und Antibiotikarückstände (AB) zusammengefasst. Unterschieden werden kann dabei in die Einträge ins Kanalnetz (Haushalte und Indirekteinleiter) und in die Einträge ins Gewässer über die verschiedenen siedlungswasserwirtschaftlichen Bauwerke im Misch- und Trennsystem. Bei den Einträgen ins Kanalnetz stehen neben den Einträgen aus Siedlungsgebieten vor allem die Abwasseremissionen aus Krankenhäusern und Schlachtbetrieben im Fokus. Für die Hauptgewässereinträge sind in erster Linie die Kläranlagenabläufe sowie die Mischwasserentlastungen verantwortlich. Jedoch sollten ebenfalls die Regenwassereinleitungen aus Trennsystemen nicht unberücksichtigt bleiben. Zwar sollte der Oberflächenabfluss weniger mit Antibiotikaresistenzen belastet sein, jedoch führt in manchen Einzugsgebieten eine hohe Fehlanschlussquote zu einem relevanten Eintrag von Antibiotikaresistenzen, da dieser Abwasserstrom dann unbehandelt bzw. nur mechanisch behandelt ins Gewässer eingeleitet wird. Bei den Direkteinleitern stehen im Wesentlichen Schlachtbetriebe im Fokus, da es in Deutschland keine direkteinleitenden Krankenhäuser gibt.

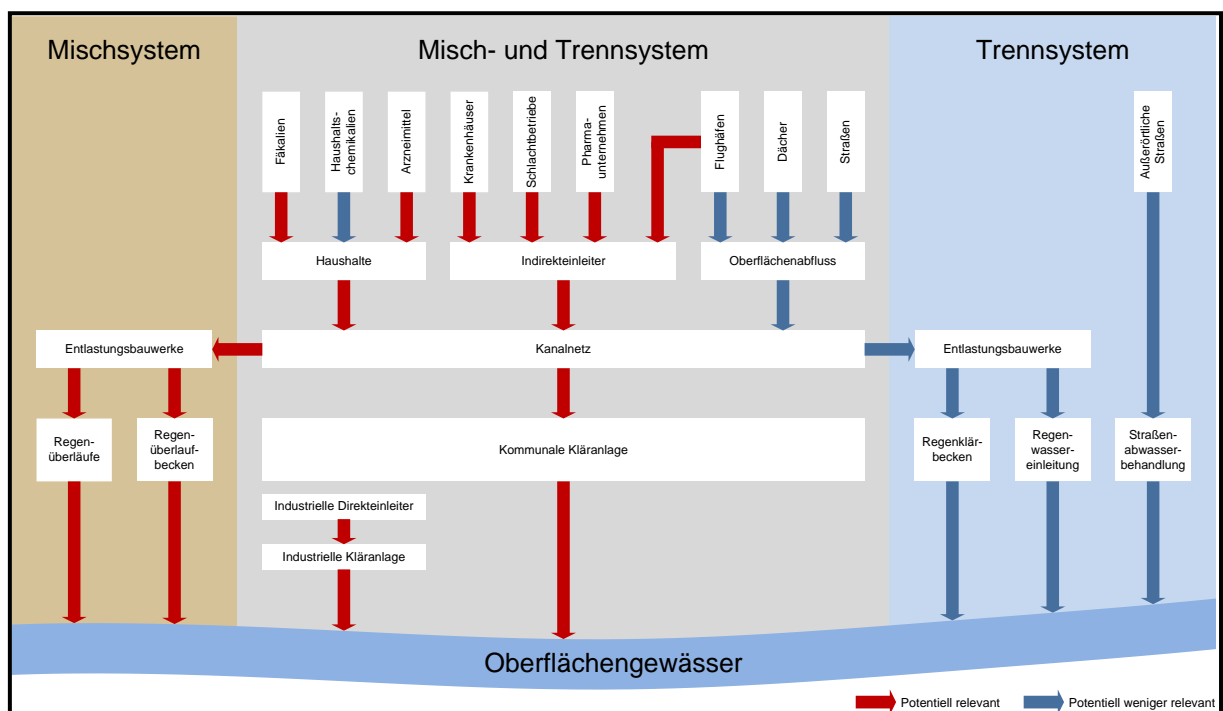


Abbildung 1: Urbane Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in Oberflächengewässer

Mit Hilfe der Messdaten von Antibiotikaresistenzen im Verbundprojekt, wurden Frachtmodellierungen verschiedener realer und fiktiver Einzugsgebiete mit unterschiedlichen Randbedingungen durchgeführt.

6.1.1 Ergebnisse zum Teilbereich: Relevanz verschiedener urbaner Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt

Aus den Frachtmodellierungen können bezüglich der Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen sowohl in Kanalnetze als auch in Oberflächengewässer folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Krankenhausabwasser ist insgesamt höher mit Antibiotikaresistenzen (AB, ARB, ARG) belastet als kommunales Abwasser aus Siedlungsgebieten;
- Durch die deutlich höheren Abwassermengen im Vergleich zu Krankenhäusern, tragen Siedlungsgebiete in der Regel dennoch höhere Gesamtfrachten ins Kanalnetz ein;
- Krankenhausabwässer emittieren jedoch vor allem kritischere Antibiotikaresistenzen (z.B. *bla*NDM, *van*A) in höheren Frachten als Siedlungsgebiete;
- Einzugsgebietsspezifisch können auch Schlachtbetriebe als Indirekteinleiter oder Direkteinleiter für einen Haupteintrag von einzelnen Resistenzgenen bzw. resistenten Bakterien ins Kanalnetz verantwortlich sein;
- Für Antibiotikarückstände sind Kläranlagen sowohl im Misch- als auch im Trennsystem die maßgebenden Eintragsquellen ins Oberflächengewässer;
- Für Resistenzgene und resistente Bakterien überwiegen in reinen Mischsystemen die Mischwasserentlastungen als Eintragsquellen gegenüber Kläranlagenabläufen;
- In Trennsystemen ist die Kläranlage auch für Resistenzgene und resistente Bakterien der Haupteintragungspfad, jedoch können bei hohen Fehlanschlussquoten im Trennsystem (> 2 %) auch die Regenwassereinleitungen einen hohen Frachtanteil in die Gewässer emittieren;
- Der relevante Gewässereintragungspfad (Mischwasserentlastung, Regenwassereinleitung oder Kläranlagenabläufe) für die verschiedenen Parameter hängt stark von der Reinigungsleistung der jeweiligen Kläranlage ab;
- Insgesamt ist das Trennsystem gegenüber dem Mischsystem vorteilhaft, da insgesamt deutlich geringere Frachten von Antibiotikaresistenzen in die Gewässer gelangen.

6.2 Teilbereich: Technische Maßnahmen zur Emissionsminderung von Antibiotikaresistenzen

Zur Reduzierung des Eintrags von Antibiotikaresistenzen in Oberflächengewässer stehen verschiedene technische Maßnahmen zur Verfügung, welche sich in 3 Gruppen einteilen lassen:

- Weitergehende Verfahrenstechniken auf kommunalen Kläranlagen
- Behandlung dezentraler besonders belasteter Abwasserströme

- Maßnahmen zur Eintragsminderung aus Mischwasserentlastungen

6.2.1 Weitergehende Verfahrenstechniken auf kommunalen Kläranlagen

Im Verbundprojekt konnte gezeigt werden, dass konventionelle Kläranlagen einen Beitrag zum Rückhalt von Antibiotikaresistenzen leisten, jedoch nicht auf den weitgehenden Rückhalt ausgelegt sind. Die Elimination von Antibiotikarückständen ist dabei sehr stoffspezifisch und reicht von negativen Eliminationen bis zu einem Rückhalt > 95 %. Resistente Bakterien und Resistenzgene werden im Mittel um 2 – 3 Log-Stufen (99 – 99,9 %) reduziert. Dennoch enthalten Kläranlagenabläufe noch hohe Konzentrationen von AB, ARB und ARG.

Um einen weitgehenden Rückhalt zu gewährleisten, müssen weitergehende Verfahrenstechniken auf kommunalen Kläranlagen implementiert werden. Da sich die betrachteten Parameter (Antibiotikarückstände im Vergleich zu Resistenzgenen und resistenten Bakterien) jedoch deutlich in ihren Eigenschaften und somit auch in ihrer Möglichkeit, sie zu eliminieren voneinander unterscheiden, müssen auch weitergehende Verfahrenstechniken auf ihre Eliminationsleistung hinsichtlich der betrachteten Stoffe bewertet werden. In Deutschland sind bereits einige Kläranlagen mit einer weitergehenden Verfahrensstufe ausgerüstet. So sind einige Anlagen für eine Spurenstoffelimination mit einer Ozonung oder einer Aktivkohleadsorptionsstufe ausgerüstet, andere verfügen über eine weitergehende Stufe mit dem Ziel der Abwasserdesinfektion mittels einer Membranfiltration (Mikro- und Ultrafiltration) oder einer UV-Bestrahlung. In Tabelle 1 ist eine Abschätzung des Potentials zur Elimination von Antibiotikaresistenzen der verfügbaren weitergehenden Verfahrenstechniken dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Verfahren entweder für die gelösten Antibiotikarückstände (Ozonung/Aktivkohle) besonders geeignet sind oder für den Rückhalt von nicht gelösten Bakterien/Genen (Membranfiltration).

Um somit Antibiotikaresistenzen in ausreichendem Maße zu eliminieren, müssen Kombinationsverfahren herangezogen werden. Vor allem Verfahrenskombinationen mit einer Membranfiltration stellen sich als sehr vorteilhaft heraus. Beispielsweise ist eine Dosierung von Pulveraktivkohle in den Membranbioreaktor eine gute Möglichkeit, um sowohl Antibiotikarückstände als auch Antibiotikaresistenzgene und Bakterien zu eliminieren.

Tabelle 1: Weitergehende Verfahrenstechniken auf kommunalen Kläranlagen und deren Potential zur Elimination von Antibiotikaresistenzen. 0 kein Rückhalt zu erwarten + mäßiger Rückhalt zu erwarten ++ weitgehender Rückhalt zu erwarten

	Antibiotikarückstände	Antibiotikaresistenzgene	Antibiotikaresistente Bakterien
Ozon	++	+	+
PAK	++	0	0
GAK	++	0	0
Membranfiltration	0	+ / ++	++
UV-Bestrahlung	0 / +	0 / +	+

6.2.2 Behandlung dezentraler Abwasserströme (Krankenhausabwasser)

Neben den weitergehenden Verfahrenstechniken auf kommunalen Kläranlagen können je nach Einzugsgebiet auch Maßnahmen zur dezentralen Behandlung von besonders belasteten Abwasserströmen sinnvoll sein. Als besonders belastete Abwasserströme haben sich im Verbundprojekt hinsichtlich Antibiotikaresistenzen Krankenhausabwässer herausgestellt. Je nach Einzugsgebiet kann daher eine dezentrale Krankenhausabwasserbehandlung sinnvoll sein. Dies ist vor allem bei Kläranlageneinzugsgebieten mit hohem klinischen Abwasseranteil und einer Entwässerung im Mischsystem der Fall, da hier zum einen ein hoher Frachtanteil von Antibiotikaresistenzen im Kläranlagenzulauf aus Krankenhäusern stammt und eine hohe Fracht von Antibiotikaresistenzen aus Krankenhausabwasser über Mischwasserentlastungen in die Gewässer gelangt und somit eine zentrale Behandlung des Kläranlagenablaufs weniger zielführend wäre. Geeignete dezentrale Verfahren zur Behandlung von KH-Abwasser müssen immer eine biologische Vorreinigung des Abwassers beinhalten. Daher ist ein Membranbioreaktor besonders geeignet, da er das Abwasser sowohl biologisch reinigt, ARB/ARG physikalisch zurückhält und sehr platzsparend ist. Als zusätzliche Stufe eignet sich eine Dosierung von Pulveraktivkohle (PAK), eine nachgeschaltete Ozonung oder eine nachgeschaltete Filtration mittels granulierter Aktivkohle.

Die dezentrale Behandlung von KH-Abwasser ist spezifisch zwar deutlich kostenintensiver als die zentrale weitergehende Behandlung auf einer kommunalen Kläranlage, jedoch durch die geringeren Abwassermengen insgesamt günstiger bezogen auf die Gesamtkosten, ebenso ergibt sich eine höhere Kosteneffizienz bezogen auf die Frachtreduktion von ARG/ARB/AB (€ pro reduzierte Fracht). Eine Teilstrombehandlung kann sinnvoll sein um Kosten zu reduzieren (Abwässer aus Versorgungsgebäuden z.B. Küche/Wäscherei nicht mitbehandeln)

6.2.3 Maßnahmen zur Eintragsminderung aus Mischwasserentlastungen

Die Evaluation von Maßnahmen zur Eintragsminderung von Antibiotikaresistenzen aus Mischwasserentlastungen ist in jedem Fall ratsam, weil ein relevanter Eintrag von Antibiotikaresistenzen im Mischsystem über diese in die Gewässer gelangen. Als technisch wirksame Maßnahmen haben sich dabei die folgenden Verfahren herausgestellt:

Weitergehende Behandlung von Mischwasserentlastungen

- Retentionsbodenfilter
- (Sonstige weitergehende Verfahren)
- Reduzierung der Entlastungswassermengen
- Integrale Abflusssteuerung
- Vergrößerung der Retentionsräume im Kanalnetz
- Erhöhung des Mischwasserzuflusses Q_M zur Kläranlage

Für Mischwasserentlastungen besteht somit zum einen die Möglichkeit einer Reduzierung der Entlastungsmenge, um somit eine größere Fracht in der Kläranlage zu behandeln oder den Überlauf von Regenüberlaufbecken weitergehend zu reinigen. Zur weitergehenden Behandlung von Mischwasserentlastungen haben sich Retentionsbodenfilter (RBF) bewährt.

Diese erreichen für (antibiotikaresistente) Bakterien einen Rückhalt von bis zu 3 log-Stufen und können auch Antibiotikarückstände zum Teil eliminieren. Weitergehende technische Maßnahmen (UV-Bestrahlung, Ozonung, Membranen...) sind für Mischwasserentlastungen auf Grund der diskontinuierlich sehr hohen Abwassermengen und des Verschmutzungsgrad des Mischwassers derzeit nicht umsetzbar.

Zur Reduzierung der Entlastungswassermengen kann zum Beispiel eine integrale Abflusssteuerung oder eine Schaffung von weiteren Retentionsräumen in der Kanalisation eine effektive und kostengünstige Maßnahme zur Reduktion der Gesamtfracht in die Oberflächengewässer darstellen. Dies ist besonders wirksam für die Parameter, welche in der konventionellen Kläranlage bereits weitgehend zurückgehalten werden und für KA-Einzugsgebiete, wo bereits eine weitergehende Verfahrenstechnik auf der Kläranlage implementiert ist, da somit eine größtmögliche Fracht in der Kläranlage weitgehend behandelt und zurückgehalten werden kann.

Eine Umstellung von Mischsystem zum Trennsystem wäre zwar eine sehr wirksame Maßnahme zur Frachtreduktion, lässt sich jedoch in bestehenden Systemen nur schwer umsetzen. Bei Neubaumaßnahmen ist jedoch zur Reduzierung der Antibiotikaresistenzenträge in jedem Fall ein Trennsystem vorzuziehen, wobei hier auf eine möglichst geringe Fehlanschlussquote geachtet werden muss.

6.2.4 Wirksamkeit der betrachteten Maßnahmen für die Frachtreduktion von Antibiotikaresistenzen in verschiedenen Einzugsgebieten

In Tabelle 2 ist qualitativ die Wirksamkeit verschiedener technischer Maßnahmen bezüglich der Gesamtfrachtreduktion und der dazugehörigen Gesamtkosten dargestellt. Zu beachten ist, dass sich je nach Kläranlagen-Einzugsgebiet unterschiedliche Wirksamkeiten und Gesamtkosten ergeben können und daher hier keine allgemeingültige Aussage möglich ist.

Tabelle 2: Wirksamkeit der Gesamtfrachtreduktion und Kosten verschiedener technischer Maßnahmen. 0 geringe Wirksamkeit, + mäßige Wirksamkeit, ++ hohe Wirksamkeit, € geringe Kosten, €€ mäßige Kosten, €€€ hohe Kosten

	Wirksamkeit für Antibiotikarückstände	Wirksamkeit für antibiotikaresistente Bakterien und Resistenzgene	Gesamtkosten
Weitergehende Verfahrenstechnik auf kommunaler KA	++	+	€€€
Dezentrale Behandlung von KH-Abwasser	+	+	€/€€
Mischwasserbehandlung im Retentionsbodenfilter	0	++	€€/€€€
Kanalnetzsteuerung	0	+	€
Vergrößerung der Retentionsräume im Kanalnetz	0	0/+	€/€€

Generell ist zu erkennen, dass für eine Reduktion von Antibiotikarückständen generell weitergehende Verfahrenstechniken auf kommunalen Kläranlagen eine wirksame Maßnahme darstellen. Dagegen ist eine Frachtreduktion von Resistenzgenen und resistenten Bakterien

im Kläranlagenablauf nicht alleine zielführend, da im Mischsystem vor allem Mischwasserentlastungen über Regenüberlaufbecken einen großen Frachteintrag bringen. Daher sind hier vor allem nachgeschaltete Retentionsbodenfilter eine wirksame Maßnahme, jedoch ist diese Maßnahme sowohl kosten- als auch flächenintensiv und daher nicht flächendeckend umsetzbar.

Dezentrale Maßnahmen an Hot-Spots oder Maßnahmen im Kanalnetz können ebenfalls einen Beitrag leisten für die Gesamtfrachtreduktion. Hier wird zwar nur eine geringere Gesamtfracht reduziert, jedoch sind auch die Gesamtkosten für solche Maßnahmen deutlich geringer.

6.3 Schlussfolgerung und Handlungsoptionen für das Teilprojekt: Bewertung der urbanen Gewässereinträge und Möglichkeiten der Eintragsminderung

Die urbanen Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt sind vielfältig und die Relevanz der unterschiedlichen Eintragspfade stark vom jeweiligen Einzugsgebiet abhängig. Insgesamt hat sich jedoch besonders gezeigt, dass Krankenhäuser als Indirekteinleiter ein Hot-Spot für den Eintrag darstellen und in Mischsystem eine besonders hohe Fracht von Antibiotikaresistenzen aus Mischwasserentlastungen ins Gewässer eingeleitet wird.

Um eine möglichst große Reduzierung von AR-Frachten zu erreichen, sollten verschiedene technische Maßnahmen überprüft und kombiniert werden. So ist beispielsweise eine Erweiterung der Kläranlage im MS nur dann sinnvoll, wenn auch gleichzeitig Maßnahmen zur Eintragsminderung im Kanalnetz umgesetzt werden. Zum Beispiel die Kopplung einer Abflusssteuerung mit einer weitergehenden Verfahrensstufe auf der Kläranlage (möglichst viel Abwasser gelangt zur Kläranlage, welches dann wirksam auf der KA behandelt werden kann). Hierbei müssen für alle Kläranlageneinzugsgebiete die wesentlichen Eintragspfade identifiziert werden und anschließend geeignete Maßnahmen zur Reduzierung evaluiert werden.

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Projektpartner Universitätsklinikum Bonn (UKB), Institut für Hygiene und Public Health (IHPH)

Projektpartner Universitätsklinikum Bonn (UKB), Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP)

Projektpartner Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)

Projektpartner Food Net Center, AG “One Health”

Projektpartner Food Net Center, AG “Food Waste”

7.1 Hintergrundinformationen

Die Lebensmittel-produzierenden Sektoren haben eine direkte oder indirekte Bedeutung bei der Verbreitung Antibiotika-resistenter Bakterien und von Antibiotika-Resistenzgenen in humanen Bereichen, Tier-bezogenen Bereichen und in der Umwelt. Diese Antibiotikaresistenzen (in Bakterien und als freie Gene) werden auch über Tier-basierte fäkale Abwässer aus der Lebensmittelproduktionen (hier Tiermast) über Düngemaßnahmen in die Umwelt eingetragen (Bodenflächen, Abschwemmungen in Oberflächenwässer, Versickerungen, etc.). Es zeigt sich, dass fäkal belastete Abwässer als eine Quelle bei der Transmission von ARB und ARG in die Umwelt angesehen werden müssen (Marti et al., 2013; 2014). Düngemittel fäkalen Ursprungs (wie Gülle) sind als ein Weg des Eintrags von ARB/ARGs in die Umwelt bereits identifiziert und von der WHO benannt (WHO, 2020).

Unter den Antibiotika-resistenten Bakterien (ARB) mit höchster Priorität für die öffentliche Gesundheit sind Carbapenem- oder Extended Spektrum Cephalosporin- und/oder Fluorchinolon-resistente Enterobacterales, Fluorchinolon-resistente *Campylobacter* spp., Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und Glycopeptid-resistente *Enterococcus faecium* und *E. faecalis* zu nennen. Unter den Antibiotikaresistenzgenen (ARGs) mit höchster Priorität sind die Gene *bla*_{CTX-M}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA23}, *mcr*, *armA*, *vanA*, *cfr* und *optrA* genannt (Koutsoumanis et al., EPSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EPSA Journal 2021). Die Autoren haben diese Bakterien und Gene mit höchster gesundheitlicher Priorität aus unterschiedlichen Sektoren der Tierproduktion und der daraus resultierenden Gülle für die Bodendüngung ausgewählt. Speziell im Falle der Schweinemast werden in diesem Review als Quelle bzw. Transmissionsvehikel der übertragenen Antibiotika-resistenten Bakterien *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. coli*, MRSA Futterstoffe, Staub, Wasser, Luft, technische Einrichtungen, direkte Umgebungen, Böden bei extensiver Mast und Menschen zitiert (Koutsoumanis et al., EPSA Panel, 2021). Dies bestätigen auch andere Untersuchungen, die sich mit Antibiotika und Antibiotikaresistenzgenen in Gülle aus der Tiermast und deren Anwendungen in der Landwirtschaft beschäftigen (Zalewska et al., 2021). Teilweise wird auf unterschiedliche Aufbereitungsprozesse der Gülle und der Reduktion der Resistenzbelastungen bereits eingegangen (Tien et al., 2017).

Der Gebrauch von antimikrobiellen Wirkstoffen in der Landwirtschaft wird als wichtigster Faktor für die Selektion von Antibiotikaresistenzen in der Gülle angesehen (EMA und EFSA, 2017, Javaro et al., 2019), wenngleich der Verkauf von antimikrobiellen Wirkstoffen um 34,6% in der EU gesunken ist (2001-2018) (EMA, 2020; More 2020). Trotzdem scheint dieser Rückgang nicht ausreichend zu sein, um die Antibiotikaresistenzbelastungen aufgrund der Umwelt-Persistenz und Verbreitung in die Umwelt von ARB und ARG zu kontrollieren. Der Umsatz von Antibiotika korreliert nur dann direkt mit Antibiotikaresistenzbelastungen in humanen Populationen, wenn ein hoher Standard an sanitärer Infrastruktur und Hygiene - Praktiken eingehalten wird, so dass Umweltfaktoren für eine Transmission auf Mensch und Tier nicht zur Geltung kommen (Collignon et., 2018). Ein relevanter Umweltfaktor, der für die Persistenz und die Verbreitung von

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Antibiotikaresistenzen in die Umwelt eine Rolle spielt, ist die mit dem Klimawandel einhergehende Erhöhung der Durchschnittstemperaturen. Allein dieser Faktor kann bei der Kolonisierung mit fakultativ pathogenen Bakterien oder auch für den erhöhten Gentransfer eine Rolle spielen (Kaba et al., 2020; Ischiro, 2010)). Erhöhte Temperaturen können auch als Stresssituation für bestimmte Mikroorganismen und Tiere gewertet werden, die sich beim Tier durch ein erhöhtes Infektionsgeschehen ausdrücken kann und folglich den Gebrauch von Antibiotika mit einhergehender Selektion von Resistenzen intensiviert.

Diese genannten Ausgangssituationen berücksichtigend hat die WHO einen Multi-Sektoren betreffenden Aktionsplan u.a. für ein verbessertes Abwasser-Management zur Prävention von Infektionen und zur Reduktion der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen auf den Weg gebracht (WHO, 2020). Hier wird besonders auf die Verbreitung von Resistenzen durch Wasser, Abwasser und Gülle eingegangen, wobei der Gülle beim Austrag von antimikrobiellen Wirkstoffen eine besondere Relevanz zukommt. Hierbei sollen antimikrobielle Wirkstoffe wie Amoxicillin, Ciprofloxacin Sulfamethoxazol und Trimethoprim in der sogenannten Watch List (WL) berücksichtigt werden.

7.2 Zielsetzungen

Wesentliche Ziele der Untersuchungen des Teilbereichs 7 sind eine qualitative Abschätzung des Vorkommens an Antibiotikarückständen, Antibiotika-resistenten Erregern und Resistenzgenen in tierischer Gülle (Schwein) sowie die möglichen Einträge über den Güllepfad in die Umwelt und explizit über den Boden in den Wasserkreislauf. Die Ergebnisse sollen in die Handlungsleitfäden des Gesamtprojektes einfließen und mit den bisher vorhandenen HyReKA-Daten abgeglichen werden. Denn bisher wurde im Rahmen des HyReKA-Projektes der Eintrag von Antibiotikarückständen, Antibiotika-resistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen über die Eintragspfade kommunaler Abwässer und Oberflächengewässer ohne Klinik-, Industrie-, oder landwirtschaftliche Beeinflussung bestimmt und deren Verbleib im Fließgewässer untersucht.

Das Ausbringen in die Umwelt von Antibiotika-resistenten Erregern, Antibiotikaresistenzgenen oder Antibiotika-Rückständen ist in jedem Fall unerwünscht, stellt aber per se zunächst per definitionem bei fakultativ-pathogenen Bakterien noch keine akute Gesundheitsgefährdung dar (Exner et al., 2020), beinhaltet aber dennoch ein Risikopotential, wenn kolonisierte Menschen erkranken oder ins Krankenhaus aufgenommen werden.

Der Teilbereich 7 des HyReKA-Projekts mit dem Titel „Antibiotikaresistenzen und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern“ gliedert sich in die Sektoren:

- Kulturbasierter Nachweis und Charakterisierung von Antibiotika-resistenten Bakterien (Partner Universitätsklinikum Bonn (UKB) und Food Net Center Universität Bonn (FNC))

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

- Genetischer, qPCR-basierte Nachweise von Antibiotikaresistenzgenen und taxonomischen Markergenen für fakultativ-pathogene Bakterien (Partner Karlsruher Institut für Technologie (KIT))
- Chemisch-analytischer Nachweis von Antibiotikarückständen (UKB)

Abkürzungsverzeichnis:

Antibiotika: AMP, Ampicillin; AMOX, Amoxicillin; CAMP, Chloramphenicol; CEF, Cefquinom; CefAv, Ceftazidim + Avibactam; CEFO, Cefotaxim; CEFT, Ceftazidim; CefTaz, Ceftolozan + Tazobactam; CFX, Cefoxitin; CTC, Chlortetracyclin; CIP, Ciprofloxacin; COL, Colistin; DOC, Doxycyclin; ENR, Enrofloxacin; FLOR, Florfenicol; FOSF, Fosfomycin; GA, Gamithromycin; GENT, Gentamicin; LEV, Levofloxacin; LINC, Lincomycin; SPEC Spectinomycin; MOX, Moxifloxacin; MAR, Marbofloxacin; NEO, Neomycin; OTC, Oxytetracyclin; PEN, Penicillin; PIP, Piperacillin; SYN, Synercid; STREP, Streptomycin; TEM, Temocillin; TC, Tetracyclin; TIA, Tiamulin; TriSul, Trimethoprim + Sulfamethoxazol; TUL, Tulathromycin; TYL, Tylosin

Andere: ARB, Antibiotika-resistente Bakterien; ARG, Antibiotikaresistenzgene; **FNC**, Food Net Center Bonn; **KIT** Karlsruher Institut für Technologie; TM, Trockenmasse; **UKB**, Universitätsklinikum Bonn;

7.3 Kulturbasierter Nachweis und Charakterisierung von antibiotikaresistenten Bakterien

Dieses Kapitel beschreibt das Vorgehen bei der Auswahl der Betriebe und die Ergebnisse der kulturellen mikrobiologischen Untersuchung. Weiterhin wurden die frischen Proben molekularbiologisch von der AG Schwartz analysiert (siehe Kapitel 7.4) und von der AG Färber (siehe Kapitel 7.5) auf Rückstände an antibiotischen Wirkstoffen mittels LC-MS untersucht. Die Proben auf den Höfen wurden in zwei verschiedenen Kampagnen unter Berücksichtigung zwei verschiedener Fragestellungen gezogen: 1. Das FNC untersuchte, ob sich eine häufige Antibiotikagabe in der Zusammensetzung der Gülle (ARB, ARG, Rückstände) widerspiegelt. 2. Das UKB testete, ob nach einer Güllung von Ackerflächen ARB und ARG sowie Rückstände in den Drainagewässern nachgewiesen werden können.

7.3.1 Methodisches Vorgehen

Betriebskennzahlen und Managementdaten der teilnehmenden schweinehaltenden Betriebe

Haltungsformen und Antibiotikagabe

Auf den Mastbetrieben liegt die durchschnittliche Mastdauer zwischen 90 bis 126 Tagen und bis zum einem Mastendgewicht zwischen 110 und 125 kg. Die Haltung der Schweine erfolgt auf Vollspalten- oder Teilspaltenböden in Innenklimaställen.

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Von den 34 teilnehmenden Betrieben der Gesamtuntersuchung arbeiten 18 als reine Mastbetriebe, 9 Betriebe als Ferkelerzeuger und 7 Betriebe wirtschaften als Kombi-Betriebe, bei denen Ferkelerzeugung, Aufzucht und Mast am gleichen Standort durchgeführt werden.

Gülleproben aus Betrieben mit kürzlich behandelten Tieren

Für die Probenahmen aus der Gülle durch die Arbeitsgruppe Petersen (FNC) im Jahre 2019 wurden nach Telefoninterviews mit 75 kontaktierten Betrieben 18 Betriebe (Tabelle 1) ausgewählt, die in den letzten drei Monaten bei ihren Tieren antibiotische Behandlungen ausgeführt hatten und besonders hohe Konzentrationen bzw. diverse Antibiotika eingesetzt hatten. Die FNC-Daten sind daher repräsentativ für Betriebe mit Gesundheitsproblemen innerhalb der letzten drei Monaten vor der Probenahme. Zwei der Betriebe hatten in den letzten drei Monaten keine Antibiotika eingesetzt und wurden als Kontrollen eingeplant. Schwerpunktmäßig waren Penicilline (Penicillin G, Amoxicillin) und Tetracycline eingesetzt worden.

Vor Ort oder per Telefon erfolgte zunächst mit den Betriebsleitern ein umfassendes checklistenbasiertes Interview. Dabei wurden Informationen zu den Betriebskennzahlen, Hygienemanagement, Gesundheitsstatus und antibiotischen Therapien der Tiere und Produktionsabläufe erfasst. Unter den Betrieben waren Mast- als auch Aufzucht- und kombiniert arbeitende Betriebe, bei denen Ferkelerzeugung, Aufzucht und Mast am gleichen Standort durchgeführt werden. Die Größe der beprobten Betriebe lag zwischen 520 bis 5.200 Mastplätzen, 800 bis 7.500 Aufzuchtplätzen und 150 bis 1.400 Sauenplätzen. In 16 der 18 Betriebe wurden in den letzten 3 Monaten vor der Probenahme die Schweine zu therapeutischen Zwecken mit Antibiotika behandelt. Die Behandlung erfolgte bei 13 von 16 Betrieben als Einzeltierbehandlung. In 12 Fällen wurden 2 verschiedene antibiotische Wirkstoffe in Abhängigkeit vom Behandlungsbild eingesetzt. Auf 3 Betrieben kam nur ein Wirkstoff (Amoxicillin) zum Einsatz und auf einem Betrieb wurden 3 verschiedenen Wirkstoffe eingesetzt.

Am häufigsten wurde auf den Betrieben das Aminopenicillin Antibiotikum Amoxicillin eingesetzt (11 x), gefolgt von Penicillin als Penicillin G (4 x), Tetracyclinen (2 x Tetracyclin, 1 x Chlortetracyclin, 1 x Doxycyclin) und Fluorchinolonen (2 x Enrofloxacin, 2 x Marbofloxacin). Jeweils auf 2 Betrieben wurde das Pleuromutilin Tiamulin, das Makrolid Tulathromycin und Florfenicol angewendet. Nur auf einem Betrieb wurde das Lincosamid-AB Lincomycin und das 4. Gen. Cephalosporin Cefquinom verwendet. Keiner der besuchten Betriebe verwendete Colistin in den letzten 3 Monaten vor Betriebsbesuch zur Behandlung der Schweine.

Einer der besuchten Betriebe wirtschaftete nach eigenen Prinzipien tierwohlorientiert, ohne an einem speziellen Standard teilzunehmen. Dort werden die Schweine über 225 Tage bis zu einem Mastendgewicht von 140 kg gemästet. Zudem werden die Schweine in Außenklimaställen auf Stroh gehalten. Auf diesem Betrieb wurden, wie auf einem anderen Betrieb keine Antibiotika in den letzten 3 Monaten vor der Beprobung appliziert

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Tabelle 1: Übersicht über die Betriebe und den Antibiotikaeinsatz, die bei der Probenahme des Food Net Centers Bonn im Oktober bis Dezember des Jahres 2019 teilgenommen haben, sowie die Lagerungsdauer der Gülle vor dem Ausbringen.

Ld. Nr. (2019)	Ausbaugröße des Betriebs (Fläche in ha oder Anzahl Tiere)	Betriebsart	Häufig eingesetzte Antibiotika	Alter der Gülle bzw. Lagerungszeit	zusätzliche Hinweise	optionale Zusatzinformationen
1	190 ha	Mast	AMOX, TUL	Lagerdauer im Flüssigmistlager: 3/4 Jahr; Gülleausbringung größtenteils im Frühjahr; Letzte Gülleausbringung Anfang August	In Na-Thiosulfat Flasche; Vermischung mit Reinigungs- und Desinfektionsmittel	Gülle aus dem Hochbehälter genommen
2	4000	Mast	PEN-G, LINC	Lagerdauer im Flüssigmistlager: 6 Monate; Gülleausbringung: 95% von März bis Mai und 5% im Herbst (August); Letzte Gülleausbringung am 16.08.2019	bei Ankunft bei RT; Vermischung mit Reinigungswasser	Gülle aus dem Hochbehälter genommen
3	455	Mast	AMOX, TIA,	Lagerdauer im Flüssigmistlager: ca. 9 Monate; Gülleausbringung im Frühjahr (Februar bis Juni); Letzte Gülleausbringung Ende August/Anfang September	Keine Vermischung mit Fremdwasser; Gülle besteht aus Gülle der Sauen sowie der Sauen und Saugferkel	Gülle im Stall unter dem Spaltenboden entnommen
4	1400	Abferkelung	PEN-G, ENR	Lagerdauer im Flüssigmistlager: 10 Monate; Letzte Gülleausbringung im Juni	Keine Vermischung mit Fremdwasser; Probenahmestellen	Gülle aus dem Hochbehälter entnommen
5	-	Aufzucht	AMOX, TC	-	-	-
6	1400	Abferkelung	AMOX, TC	Lagerdauer im Flüssigmistlager: 10 Monate; Letzte Gülleausbringung im Juni	Keine Vermischung mit Fremdwasser; Probenahmestellen	Gülle aus der Vorgrube entnommen
7	-	Abferkelung	TC, TUL	-	-	-
8	2200	Mast	TC, TUL	Lagerung im Flüssigmistlager: 6 Monate; Gülleausbringung: Februar bis Juni und im August; Letzte Gülleausbringung im August	Vermischung mit Fremdwasser	Gülle aus der Vorgrube entnommen
9	-	Mast	AMOX	-	-	-
10	1300	Mast	AMOX	Lagerung im Flüssigmistlager: 4 bis 6 Monate; Gülleausbringung im Frühjahr; Letzte Gülleausbringung Mitte Juni in den stehenden Maisbestand	Vermischung mit Reinigungswasser	Gülle aus dem Hochbehälter genommen
11	3560	Mast	-	Lagerung im Flüssigmistlager: ca. 9 Monate; Gülleausbringung: von Februar bis Mai und etwas im August zur Gründüngung; Letzte Gülleausbringung im August	Vermischung mit Fremdwasser	Gülle aus dem Hochbehälter genommen
12	540 Sauen + Ferkelaufzucht	Abferkelung	AMOX, CEF	Lagerdauer im Flüssigmistlager: bis zu 10 Monaten; Gülleausbringung: März und April zu Getreide/April zu Mais/März bis August auf Grünland; Letzte Gülleausbringung: im August direkt aus dem Stall/ im April aus dem Hochbehälter	Vermischung mit Fremdwasser	Gülle aus dem Hochbehälter genommen
13	50 ha	Abferkelung	AMOX	Lagerdauer im Flüssigmistlager: 6 Monate; Gülleausbringung erfolgt im Frühjahr und Herbst; Letzte Gülleausbringung: September	Vermischung mit Fremdwasser	Gülle aus 3 verschiedenen Vorgruben genommen

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Ld. Nr. (2019)	Ausbaugröße des Betriebs (Fläche in ha oder Anzahl Tiere)	Betriebsart	Häufig eingesetzte Antibiotika	Alter der Gülle bzw. Lagerungszeit	zusätzliche Hinweise	optionale Zusatzinformationen
14	100 ha	Abferkelung	AMOX	Lagerdauer im Flüssigmistlager: 9 Monate; Gülleausbringung im Frühjahr bis Vegetationsende und zu den Zwischenfrüchten bis Mitte August; Ein Teil der Gülle wird an andere Betriebe abgegeben; Letzte Gülleausbringung: Mitte August	Keine Vermischung mit Fremdwasser	Gülle aus dem Hochbehälter genommen
15	1220	Mix*	AMOX	Lagerdauer im Flüssigmistlager: 8 Monate; Gülleausbringung im Frühjahr; Letzte Ausbringung im August (Zwischenfrucht)	Gülle ist ein Gemisch aus Sauengülle, Ferkelgülle und Schweinegülle; Keine Vermischung mit Fremdwasser	Gülle aus dem Hochbehälter genommen
16	125 ha	Mix	AMOX, MAR	Lagerdauer im Flüssigmistlager: 1 Jahr; Gülleausbringung ab März bis Mai zum Getreide; Letzte Gülleausbringung im August zum Raps	Vermischung mit Reinigungswasser	Gülle aus der Vorgrube neben dem Maststall entnommen
17	185 ha	Mast	PEN-G, FLOR, TIA		2 Probenahmestellen, die sich auf einem Betriebsgelände befinden; Probe ist ein Gemisch aus Gärresten, Schweinegülle und Rindergülle	Probe aus der Biogasanlage (Hochbehälter) geschöpft
18	185 ha	Biogasanlage	PEN-G, FLOR, TIA,	Lagerdauer im Flüssigmistlager: bis zu 9 Monaten; Gülleausbringung: von Februar bis Mai und im September; Letzte Gülleausbringung im September	2 Probenahmestellen, die sich auf einem Betriebsgelände befinden; Schweinemastgülle; Vermischung mit Fremdwasser	Gülle beim Maststall aus Vorgrube entnommen
19	117 ha	Mast	PEN-G, CTC	Durchschnittliche Lagerdauer im Flüssigmistlager: 3 Monate; Kontinuierliches Ablassen der Gülle in die Biogasanlage; Letzte Gülleausbringung im Oktober	Vermischung mit Fremdwasser; 2 Probenahmestellen, die sich auf einem Betriebsgelände befinden	Gülle beim Maststall aus Vorgrube entnommen
20	117 ha	Biogasanlage	PEN-G, CTC	Durchschnittliche Lagerdauer im Flüssigmistlager: 3 Monate; Kontinuierliche Austragung der Gülle in die Biogasanlage; Letzte Gülleausbringung im Oktober	2 Probenahmestellen, die sich auf einem Betriebsgelände befinden	Fermenter ist der Biogasanlage vorgelagert. Aus dem Fermenterbehälter wurde eine Probe abgelassen.
21	250 ha	Mast	-	Lagerdauer im Flüssigmistlager: 8 Monate; Ausbringung von Januar bis August; Letzte Gülleausbringung im August	Vermischung mit Fremdwasser; 1 Probenahmestelle, die ca. 2 km vom Betrieb entfernt liegt	Gülle beim Maststall aus Vorgrube entnommen
22	520	Mast	FLOR, MAR	Lagerdauer im Flüssigmistlager: 8 Monate; Ausbringung: ein Teil im Spätsommer und der Rest im Frühjahr	Vermischung mit Reinigungswasser	Gülle beim Maststall aus Vorgrube entnommen

* Mix: Ferkelerzeugung + Ferkelaufzucht + Schweinemast

Gülleproben und assoziierte Drainagewässer

Im Rahmen des UKB-Projektteils hatten sich 16 schweinehaltende Betriebe (Tabelle 2) bereit erklärt, am HyReKA-Projekt teilzunehmen und Gülle und Drainagewässer einzuschicken. Der Antibiotikaeinsatz innerhalb der letzten Monate war in diesem Projektteil kein Einschlusskriterium. Entscheidend für den Einschluss war die Zugänglichkeit zu Drainagen und Ableitungen von den zu begüllenden Feldern sowie eine hohe Motivation und Einsatz der involvierten Landwirte. Denn nicht nur die Gülleprobenentnahmen in Assoziation zur Ausbringung, sondern auch die damit verbundene Entnahme von Drainagewasser in Abhängigkeit vom Niederschlag waren extrem aufwändig und konnten daher in größten Teilen nur vom Landwirt selbst vor Ort durchgeführt werden. Die teilnehmenden Betriebe schickten vor Beginn der Düngung Boden- und Gülleproben ein. Sobald die Drainagen nach der Düngung mit Gülle Wasser förderten, schickten die Betriebe Proben des Drainagewassers ein, um die Dissemination von Antibiotika-resistenten Bakterien, Resistenzgenen und von Antibiotika zu untersuchen.

Hier wurden Proben in den Jahren 2020 und 2021 entnommen. Während der Interviews bzw. auf den Fragebögen wurden für den UKB-Teil zusätzlich die Angaben zur Regenmenge, Datum der Begüllung, Probennahmen aus der Drainage etc. erhoben. In dem sehr trockenen Sommer 2020 hat es von April bis Ende September kaum geregnet. Daher konnten die meisten Landwirte der Schweineerzeugung auch kaum ihre Gülle ausbringen bzw. es fielen keine Drainagewässer an. Die Probennahmen wurden deshalb verlängert und bis Mai 2021 innerhalb der jeweiligen Gülle-Ausbringungsperioden (Februar bis Mai jeden Jahres) durchgeführt. Das Probennahmeprotokoll für die Drainagewässer sah als zusätzliche Parameter die Abschätzung der Regenmengen und die Protokollierung des zeitlichen Abstandes zwischen Begüllung und Probenahme aus der Drainage vor.

Sechs dieser Betriebe waren reine Mastbetriebe mit 1650 bis 5700 Mastplätzen, ein Betrieb ein Ferkelerzeuger und Aufzuchtbetrieb, ein Betrieb wirtschaftete als Aufzucht und Mastbetrieb und der Rest kombinierte Ferkelerzeugung, Aufzucht und Mast. Hier hatte nur 50 % der Betriebe in den letzten Monaten Antibiotika eingesetzt. Das Spektrum der eingesetzten Antibiotika hatte ebenfalls einen Schwerpunkt bei den leicht abbaubaren Betalaktamen, die auf fast jedem Hof eingesetzt wurden, gefolgt von den Tetracyclinen und Lincosaminen. In zwei Fällen wurde Colistin eingesetzt und in drei Fällen Chinolone. Vier Betriebe gaben an, lediglich Einzeltierbehandlungen einzusetzen, drei weitere, dass Gruppenbehandlungen selten durchgeführt wurden.

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Tabelle 2: Teilnehmende Betriebe in der Untersuchung des UKB im Jahr 2020 und 2021 mit Angabe der eingesetzten Antibiotika. Im Jahr 2020 konnten die Drainagewässer erst nach erneuten Regenfällen gewonnen werden, was die z. T. langen Zeitspannen bzw. fehlenden Einsendungen erklärt.

Lfd. Nr. (2020/21)	Betriebsart	Betriebsgröße (Tiere)	Häufig verabreichte Antibiotika	Antibiotika, die an Schweine gegeben wurden, deren Gülle untersucht wurde (wenn in Begüllungszeitraum eingesetzt)	1. Probenahmedatum Boden und Gülle	Bemerkung bei der Einsendung des Drainagewassers 2020	1. Probennahme Drainagewasser 2020	2. Probennahme Gülle 2021	2. Probennahme Drainagewasser 2021
1		1650	AMOX LINC DOC TUL	AMOX LINC DOC TUL	24.03.2020	-	-	05.03.2021	05.03.2021
2	Mix**	3220	AMOX		06.06.2020	-	-	15.03.2021	15.03.2021
3	Schweinemast	2600	AMOX TIA		15.04.2020	28 d nach Düngung	04.05.2020	22.03.2021	22.03.2021
4	Ferkelerzeugung, Ferkelaufzucht	3050	AMOX ENRO PEN		02.04.2020	34 d nach Düngung	06.05.2020	29.03.2021	07.04.2021
5	Mix	3400	PEN TC GA Tri-Sul AMOX COL		-	-	-	06.04.2021	28.05.2021
6	Schweinemast	4000	PEN LINC TYL	PEN LINC TYL	25.03.2020	-	-	23.03.2021	07.04.2021
7	Mix	2260	AMOX		16.04.2020	-	-	22.04.2021	22.04.2021*
8	Schweinemast	5700	LINC-SPEC PEN	AMOX PEN LINC-SPEC	25.03.2020	14 d nach Düngung	08.04.2020	21.04.2021	27.05.2021
9	Ferkelaufzucht, Schweinemast	8100	TUL COL GA DOC		24.03.2020	19 d nach Düngung, aus Drainageschacht genommen	15.06.2020		
10	Schweinemast	2400	TC	TC	23.03.2020	41 d nach Düngung	03.05.2020		
11	Schweinemast	1250	AMOX		18.04.2020	20 d nach Düngung	15.05.2020		
12	Mix	2220	AMOX MAR		06.04.2020	13 d nach Düngung	19.04.2020		
13	Schweinemast	1890	DOC	DOC	21.04.2020	-	-		
14	Mix	6260	AMOX LINC-SPEC ENRO	AMOX LINC ENRO	21.04.2020	-	-		
15	Schweinemast	1998	TIA AMOX		04.05.2020	2 d nach Düngung, aus Tümpel in die die Drainage mündet	06.05.2020		
16	Mix	4670	PEN STREP TC	PEN TC DOC	26.03.2020	81 d nach Düngung	15.06.2020		

* Diese Wasserprobe stand nicht mit einem Begüllungsereignis in Zusammenhang ** Mix: Ferkelerzeugung + Ferkelaufzucht + Schweinemast

Probenentnahmen und Aufbereitung der Proben

Auf den Betrieben des FNC-Teils wurden im Herbst und Winter 2019 insgesamt 22 Proben von Wirtschaftsdünger entnommen. Davon waren 11 Proben Gülle aus der Schweinemast, 6 Proben Gülle aus der Abferkelung, 1 Probe Gülle aus dem Flatdeck, 2 Proben gemischte Gülle aus der Abferkelung und der Mast und 2 Proben Wirtschaftsdünger aus Biogasanlagen. Es wurden jeweils 10 L Probenmaterial mittels steriler Metallschöpfkelle nach dem Umrühren ca. 50 cm unterhalb der Schwimmschicht entnommen und abgefüllt.

Auf den Betrieben des UKB-Teils wurden in den Düngeperioden 2020 und 2021 gut durchmischte Proben von Gülle gezogen. D.h. zunächst wurde die Gülle aus den Schweineställen in das Güllefass gepumpt und somit gut durchmischt. Kurz vor Ausbringung auf (bevorzugt drainierte) Ackerflächen wurde die Probe direkt aus Güllefass entnommen. Das Volumen der Probenflasche betrug 1 L, die Befüllung erfolgte mit nicht mehr als 750 mL.

Von den Gülleproben wurden unmittelbar vor Ort der pH-Wert und die Temperatur gemessen. Der pH-Wert der Proben lag zwischen 6,0 und 8,3 und die Temperatur zwischen 6,2° und 21,0°C.

Innerhalb von 24 h nach Abnahme wurden 22 (FNC) bzw. 23 (UKB), somit insgesamt 45, Gülleproben untersucht. Es erfolgte, für alle Proben mit der gleichen, abgestimmten Methodik, die Kultivierung folgender fakultativ-pathogener Zielorganismen mit Antibiotikaresistenzen: Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente *Enterococcus* spp. und Extended Spectrum Beta-Lactamase Bildner (ESBL), respektive Erreger der Spezies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* und *Enterobacter* spp. mit Resistenz gegen Cephalosporine der 3. Generation. Neben den resistenten Erregern wurden die Proben generell auf *S. aureus* und *Pseudomonas* spp. untersucht, um Aussagen über die Auftretenswahrscheinlichkeit dieser Spezies in der Gülle treffen zu können. Die Gülle wurde vor dem Auftragen auf die Platten 1:10 und 1:100 verdünnt und in diesen Verdünnungsstufen als auch unverdünnt auf die ESBL-, MRSA- und VRE-Platten aufgetragen.

Nach dem Wachstum auf den Selektivplatten, wurden die verdächtigen Kolonien isoliert. Die Spezies- und Resistenzbestimmung erfolgte für alle Isolate im UKB. Die Artbestimmung wurde mittels MALDI-TOF MS durchgeführt. Die Kolonien der Zielspezies wurden danach im UKB mittels Mikrodilutionsverfahren (Merlin-Mikrotiterplatten) hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber humanrelevanten Antibiotika untersucht und mit klinischen Cut-Off-Werten nach EUCAST ausgewertet. MRSA wurden *spa*-typisiert. Wenn in der Untersuchung des UKBs mehrere *E. coli* aus einem Betrieb oder Betrieb und Drainagewasser isoliert wurden, wurden die *E. coli*-Stämme ebenfalls typisiert.

Lagerungsversuche

Die originalen Gülleproben des FNCs lagerten danach unter Außentemperaturen luftabgeschlossen, um die Lagerung im Güllesilo zu imitieren. Nach einem Lagerungszeitraum von 11-15 Wochen und 30-34 Wochen wurde die kulturelle Untersuchung wiederholt. Zusätzlich wurden Aliquots der Proben jeweils selektiv für *Enterobacteriaceae* (Mossel-Bouillon, ohne zugesetzte Antibiotika) und MRSA (Müller-Hinton-Bouillon mit 6,5% NaCl zur Anreicherung von *S. aureus* und anschließender Inkubation in TSB mit Aztreonam und Cefoxitin für MRSA) in Flüssigmedien bebrütet, um sichere Aussagen über mögliche verbliebene antibiotikaresistente Bakterien treffen zu können. Im Anschluss an die Lagerversuche erfolgte die Bestimmung der Trockenmasse der Proben gemäß DIN EN 15934:2012-11.

Drainagewässer

Für die Bestimmungen wurden jeweils 100 ml Drainagewasser filtriert und der Filter, die native Probe und 1:2 und 1:4 Verdünnungen auf die selektiven Agarplatten mit Antibiotika aufgetragen.

Der Erftverband schickte ebenfalls Proben von Drainagewässern aus Probenahmestellen im Einzugsbereich des Swistbachs ein (Miel, Buschhoven, Meckenheim), die genauso behandelt wurden.

7.3.2 Belastung der Gülleproben und Drainagewässer mit resistenten Bakterien

Aus den Gülleproben wurden insgesamt 281 Isolate im UKB charakterisiert, davon stammten 153 Isolate aus den Proben des FNCs.

Gülleproben aus Betrieben mit kürzlich behandelten Tieren

Resistente Bakterien waren in 12 der 22 Proben des FNCs (8 Proben nur mit *E. coli*, 2 x nur *S. aureus*, 1 x *E. coli* / *S. aureus*, und einmal *A. baumannii*) nachweisbar (Tabelle 3). Insgesamt wuchsen 49 gramnegative Isolate auf dem Selektivagar. In zwei Proben von zwei Höfen befanden sich insgesamt 12 multiresistente 3MRGN *E. coli*-Stämme (resistent gegen Piperacillin (aber nicht Piperacillin/Tazobactam), Drittgenerations-Cephalosporine und Ciprofloxacin). 4MRGN mit Resistenz gegen Carbapeneme oder 3MRGN mit Resistenz gegen Piperacillin-Tazobactam oder VRE wurden nicht isoliert.

Insgesamt wurden aus den untersuchten Proben 71 Isolate näher charakterisiert (22 MRSA, 47 *E. coli*, 2 *A. baumannii*). Von den 22 untersuchten MRSA Isolaten waren 13 Isolate aus 2 verschiedenen Proben Moxifloxacin resistent. Alle getesteten MRSA Isolate waren sensibel gegenüber Tigecyclin, Fosfomycin, Teicoplanin, Fusidinsäure, Linezolid, Clindamycin, Daptomycin, Erythromycin, Ceftarolin, Vancomycin, Rifampicin und Mupirocin. Zur näheren Beschreibung wurden die Isolate *spa*-typisiert bzw. durch MALDI-

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

TOF MS und anschließender exemplarischer Bestätigung mittels MLST-Typisierung. Die resultierenden Typen sind alle ausschließlich solche Typen, die mit der Nutztierhaltung assoziiert sind, wie ST398 (Probe 4), t034 (Probe 16), t1451 und t011 (beide Probe 14). Alle getesteten *E. coli* und *A. baumannii* Isolate waren sensibel gegenüber Piperacillin/Tazobactam, Imipenem, Meropenem, Amikacin und Tigecyclin. Ein *E. coli* Isolat zeigte eine Resistenz gegenüber Fosfomycin. Von den 49 gramnegativen Isolaten, zeigten acht Isolate aus drei verschiedenen Proben eine Resistenz gegen Colistin, wobei dies nach Angabe der Landwirte in den letzten 3 Monaten vor den Betriebsbesuchen nicht eingesetzt wurde. Bei zwei dieser Proben handelt es sich um Gülle aus der Ferkelproduktion. Colistin wird häufig zur Behandlung von an Mastitis erkrankten Sauen eingesetzt. Hier ist es vorstellbar, dass die Landwirte entweder bei der Erfassung nur die bei den Ferkeln verwendeten Antibiosen im Sinn hatten oder, dass die Colistin-Resistenz, durch zuvor behandelte Sauen über einen längeren Zeitraum im Stall persistiert. Ein einzelnes Isolat mit Colistinresistenz wurde in einer Probe aus der Mast des als negative Kontrolle gedachten Betriebes isoliert. Auf diesem Betrieb wurde insgesamt nur eine einzige Kolonie eines *E. coli* auf ESBL-Agar detektiert. Dieses Isolat zeigte eine Resistenz gegen Cefotaxim, Ceftolozan/Tazobactam, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Fosfomycin und Colistin. Trotz mehrfacher Untersuchung der Probe konnten kulturell keine weiteren *E. coli* auf dem Selektivmedium angezüchtet werden, was nahelegt, dass es sich hierbei eventuell um eine zu vernachlässigende Verunreinigung handelte.

Gülleproben und assoziierte Drainagewässer

In den Untersuchungen des UKB wurden in den Gülleproben 10 ESBL-*E. coli* gefunden (Tabelle 4). Nur einer dieser Stämme zeigte eine Resistenz gegen Ciprofloxacin, war aber gegen Piperacillin empfindlich. Damit konnte keiner dieser Stämme als MRGN eingeordnet werden. Alle Stämme waren empfindlich gegen Temocillin, Piperacillin/Tazobactam, Carbapeneme, Amikacin, Tigecyclin, Fosfomycin und Colistin. Lediglich gegen Chloramphenicol und Trimethoprim/Sulfamethoxazol war ein Teil der Isolate resistent. Die positiven *E. coli*-Proben stammten aus neun verschiedenen Betrieben. MRSA wurden häufig in den Tierkontrollabstrichen (nasal und anal) nachgewiesen (Resistenz gegen Erythromycin in 70 % aller Isolate), aber nur einmal in der Gülle; auch dieser Stamm war gegen Erythromycin resistent. Ein ESBL *E. coli* konnte ebenfalls aus einem Tierabstrich isoliert werden. Eine Typisierung zweier *E. coli*-Stämme aus demselben Betrieb ergab unterschiedliche Sequenztypen (ST2692 und eine bisher unbekannte Allelkombination).

Bei dem Vergleich der kürzlich eingesetzten Antibiotika mit den Antibiotikarückständen zeigte sich, dass nicht die häufig gegebenen, leicht abbaubaren Betalaktame nachweisbar waren, sondern nur die sehr schwer abbaubaren Tetracycline und Chinolone, die während der Lagerung der Gülle sehr lange überdauern. Da die Güllebehälter ja nie völlig leer werden, kann es sein, dass die Antibiotikarückstände der schwer abbaubaren Substanzen dort schon länger vorlagen (für weitere Erläuterungen siehe auch Abschnitt 7.6.2).

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Tabelle 3: Kulturergebnisse der Proben aus der Untersuchung der Gülle behandelter Tiere mit eingesetzten Antibiotika und Antibiotikarückständen.

Probe/Betrieb	Eingesetzte AB	Nachgewiesene AB-Rückst.	Anzahl Isolate	Spezies	Alle phänotypischen Resistenzen dieser Art (*Alle Isolate waren resistent)		
					MRSA**	<i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i>
1	AMOX, TUL	CIP, ENR, TC	-	-	-	-	-
2	PEN-G, LINC	DOC	-	-	-	-	-
3	AMOX, TIA,	-	1	<i>S. aureus</i>	AMP*, PEN-G*, GENT*, CFX*	-	-
4	PEN-G, ENR	CIP, DOC, ENR, TC, TIA, TYL,	7	<i>S. aureus</i>	AMP*, PEN-G*, GENT*, CFX*	-	-
5	AMOX, TC	DOC, ENR	-	-	-	-	-
6	AMOX, TC	DOC, OTC	12	<i>E. coli</i>	-	TEM, PIP*, CEFO*, CEFT, CefAvi, CefTaz, CIP, LEV, CAMP, TriSul, COL	-
7	TC, TUL	DOC, TC, TIA, TYL,	5	<i>E. coli</i>	-	PIP*, CEFO*, CEFT, CAMP*, TriSul	-
8	TC, TUL	DOC, OTC, TC	2	<i>E. coli</i>	-	PIP*, CEFO*, CefTaz, CAMP, TriSul	-
9	AMOX	DOC, OTC, TC, TIA	-	-	-	-	-
10	AMOX	OTC	6	<i>E. coli</i>	-	PIP*, CEFO*, CEFT, CAMP	-
11	-	CTC, DOC, ENR, OTC, TC,	-	-	-	-	-
12	AMOX, CEF	DOC, ENR, OTC	-	-	-	-	-
13	AMOX	DOC	10	<i>E. coli</i>	-	TEM, PIP*, CEFO*, CefTaz, TriSul, COL	-
14	AMOX	CIP, DOC, ENR, OTC	1 5	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	AMP*, PEN-G*, MOX, CFX*	PIP, CEFO	-
15	AMOX	CIP, DOC, ENR	1	<i>E. coli</i>	-	PIP, CEFO, CAMP, TriSul	-
16	AMOX, MAR	-	4 10	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	TriSul, AMP*, PEN-G*, MOX*, CFX*, SYN	PIP*, CEFO*, CefTaz, CIP, LEV, CAMP, TriSul	-
17	PEN-G, FLOR, TIA,	-	2	<i>E. coli</i>	-	PIP*, CEFO*, TriSul	-
18	PEN-G, FLOR, TIA,	TIA	-	-	-	-	-
19	PEN-G, CTC	CIP, ENR, OTC	1	<i>A. baumannii</i>	-	-	TEM, CEFO, CAMP, FOSF
20	PEN-G, CTC	-	-	-	-	-	-
21	-	-	1	<i>E. coli</i>	-	CEFO*, CefTaz*, CIP*, CAMP*, FOSF*, COL*	-
22	FLOR, MAR	TYL	-	-	-	-	-

** MRSA sind charakteristischerweise gegen alle älteren Betalaktame resistent.

Untersuchung des Effektes der Langzeitlagerung der Gülle

Nach der ersten Lagerperiode von 15 Wochen wurden in Probe 6 und Probe 13 noch resistente *E. coli* nachgewiesen. Auf Basis der erhobenen Daten entspricht dies einer Reduktion um 85%. Weder *S. aureus*, noch MRSA waren zu diesem Zeitpunkt kulturell nachweisbar. Nach der zweiten Lagerperiode von 34 Wochen ließen sich trotz Voranreicherung in keiner der untersuchten Proben resistente Keime anziehen.

Untersuchungen der Drainagewässer

In den von den Landwirten eingesendeten Drainagewässern wurde insgesamt ein ESBL-*E. coli* nachgewiesen, der gegen Ciprofloxacin empfindlich war und damit nicht als MRGN eingeordnet werden kann. Der Stamm zeigte Resistenz gegen Chloramphenicol und Trimethoprim/Sulfamethoxazol und gehörte zum Sequenztyp ST865, der schon einmal von Hühnern (Dissanayake et al., 2014) und Kühen (Shafiq et al., 2021) beschrieben wurde. In einer Gülleprobe desselben Betriebs wurde auch ein *E. coli*-Stamm gefunden, der aber nach einer Typisierung den Sequenztyp ST58 angehörte, so dass kein Zusammenhang zwischen der Begüllung und dem *E. coli* in der Wasserprobe bewiesen werden konnte. Dieser Sequenztyp ist weit verbreitet und wurde bereits Schweinen nachgewiesen (Reid et al., 2022). Die anderen Isolate waren Vertreter der Gattungen *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus* und *Lysinobacillus*. MRSA wurden nicht gefunden.

Aus den 16 Proben der Drainagewässer des Erftverbandes konnte nur ein 3 MRGN (resistent gegen Piperacillin) angezchtet werden, ansonsten wurden keine resistenten Isolate der Zielspezies gefunden. Dieses Isolat stammte aus derselben Probe, die auch mit Antibiotikarückständen belastet war (siehe auch 7.6.2) und wahrscheinlich als Verunreinigung aus einer privaten Kleinkläranlage in die Drainagewässer eingebracht wurde. In dieser Probe wurden auch empfindliche *E. coli*-Stämme nachgewiesen (45 Kolonie-bildende Einheiten auf 100 mL).

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Tabelle 4: Kulturergebnisse für resistente Bakterien aus Gülle (Zielspezies HyReKA) und assoziierten Drainagewässern, als auch Antibiotikanachweise in der Gülle. *nd: keine Daten

Probe / Betrieb	Häufig verabreichte Antibiotika	Antibiotika in den letzten 3 Monaten	Probenahmedatum Boden und Gülle	Antibiotikarückstände in der Gülle, keine Nachweise in Drainagewässern	Anzahl Isolate	Spezies/ Herkunft	Alle phänotypischen Resistenzen dieser Art (* alle Kolonien sind resistent)	
							<i>E. coli</i>	MRSA
2020								
1	AMOX, LINC, DOC, TUL	AMOX LINC DOC TUL	24.03.2020	TET, DOC, CTC	0			
2	AMOX		06.06.2020	ENRO, TIA, DOC, OTC	0			
3	AMOX, TIA		15.04.2020	ENRO, TIA, TUL, TC, DOC	1	<i>E. coli</i> / Gülle	CEFO, PIP	
4	AMOX, ENRO, PEN		02.04.2020	CIP, ENRO, TIA, TC, DOC, CTC	1	<i>E. coli</i> / Gülle	CEFO, PIP	
5	PEN, TC, GA, Tri-Sul, AMOX, COL		-	ENRO, TC, DOC, CTC	1	<i>E. coli</i> / Gülle	CEFO, PIP, TriSul	
6	PEN, LINC, TYL	PEN LINC TYL	25.03.2020	TC, DOC, OTC, CTC	1	<i>E. coli</i> / Gülle	CEFO, PIP	
7	AMOX		16.04.2020	-	0			
8	LINC-SPEC, PEN	AMOX PEN LINC-SPEC	25.03.2020	TC	0			
9	TUL, COL, GA, DOC		24.03.2020	TC, DOC, CTC	3	<i>E. coli</i> / Gülle ST58 <i>E. coli</i> / Drainage ST865 <i>S. aureus</i> / Gülle	CEFO, PIP, CEFT, TriSul CEFO, PIP, CAMP, TriSul	AMP, OX, CLIN, ERY, FOX
10	TC	TC	23.03.2020	TYL, TIA, TC, DOC, OTC	0			
11	AMOX		18.04.2020	TIA	0			
12	AMOX, MAR		06.04.2020	TIA, TC, DOC	0			
13	DOC	DOC	21.04.2020	ENRO, CTC	1	<i>E. coli</i> / Gülle	CEFO, PIP, CAMP, TriSul	
14	AMOX, LINC-SPEC, ENRO	AMOX LINC ENRO	21.04.2020	ENRO, TIA	1	<i>E. coli</i> /Gülle	CEFO, PIP, TriSul,	
15	TIA, AMOX		04.05.2020	ENRO, TIA, DOC	1	<i>E. coli</i> /Gülle	CEFO, PIP, CAMP, TriSul	
16	PEN, STREP, TC	PEN TC DOC	26.03.2020	TIA, TC	0			
2021								
1	AMOX, LINC, DOC, TUL	AMOX LINC	15.03.2021	nd*	0			
2	AMOX		15.03.2021	DOC, OTC	0			
3	AMOX, TIA		22.03.2021	OTC	0			
4	AMOX, ENRO, PEN	AMOX, ENRO	29.03.2021	ENRO	0			
5	PEN, TC, GA, Tri-Sul, AMOX, COL		06.04.2021	DOC, OTC	2	2 <i>E. coli</i> aus Gülle (ST2692 / neuer ST)	CEFO*, CEFT, PIP, CIP	
6	PEN LINC TYL	PEN	23.03.2021	-	0			
7	AMOX		22.04.2021	ENRO	0			
8	LINC,-SPEC, PEN	PEN	27.05.2021	-	0			

7.3.3 Zusammenführung und Interpretation der Untersuchungsergebnisse

Zusammenfassend war die Anzahl der mittels Kulturverfahren nachweisbaren Antibiotika-resistenten Bakterien in beiden Arbeitsgruppen gering, wobei die Anzahl an resistenten Bakterien bei der Gruppe der Höfe, die unter Berücksichtigung des Antibiotika-Einsatzes ausgewählt worden waren, höher war. Auffällig war, dass die Platten überwiegend mit Umweltbakterien bewachsen waren, z. B. *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas* spp., *Ochrobactrum* spp., *Alcaligenes*, *Bordetella trematum* und diversen *Bacillus*-Arten aus den Bodenproben. Ein Teil dieser Bakterien besitzt natürliche Resistenzen gegen die eingesetzten Antibiotika der Selektivplatten (z. B. *Achromobacter species* (AXC), *Pseudomonas otitidis* (POM), *P. citronellolis* (Ambler Klasse A β -Laktamase), und *Ochrobactrum intermedium* (AmpC)), d. h. intrinsische β -Laktamasen; *B. licheniformis* ist intrinsisch resistent gegen Oxacillin und *Pediococcus pentasocceus* ist natürlich resistent gegen Vancomycin (Allam et al., 2017; Alonso et al., 2017; Gupta et al., 2019; Hu et al., 2015; Remus-Emsermann et al., 2016; Thaller et al., 2011; Wass et al., 2019). Ein Teil der Bakterienisolate war in der medizinischen Datenbank, die der Identifizierung per MALDI-TOF MS zugrunde liegt, nicht enthalten und konnte daher nicht bestimmt werden (Abbildung 1). Die Tatsache, dass es bei der Lagerung von Dünger zu einer Abnahme der lebensfähigen ESBL-*E. coli* kommen kann, wurde bereits beschrieben (Siller et al., 2020) und diese Art wurde wegen ihres kurzen Überlebens in der Umwelt ja auch als Indikatorspezies für fäkale Verschmutzung eingesetzt.

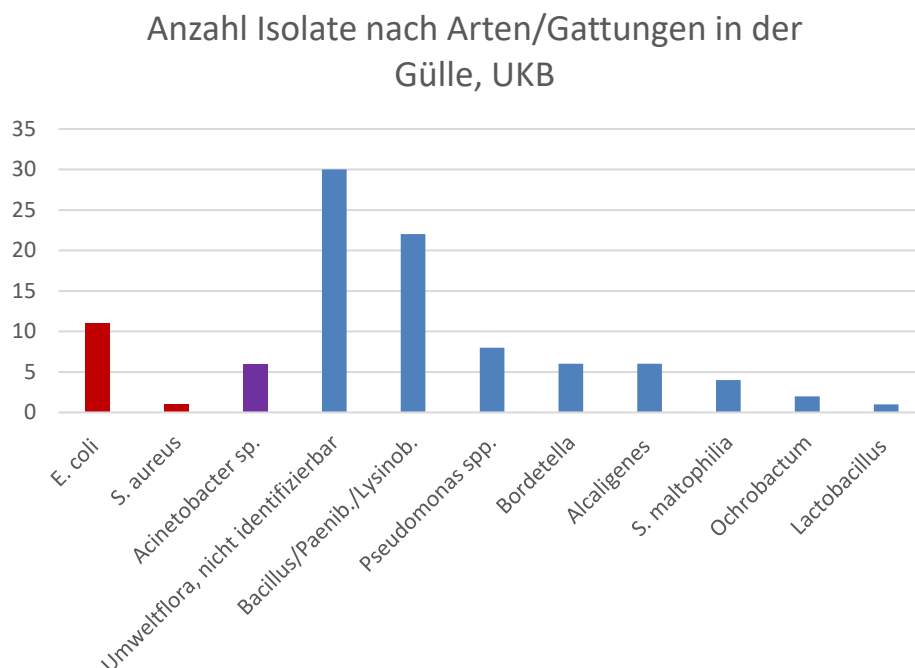


Abbildung 1: Anzahl der Isolate nach Arten und Gattungen geordnet (UKB) aus Gülle, Erd- und Wasserproben. Rot: Zielspezies von HyReKA, lila: *Acinetobacter* (verschiedene Arten, teilweise relevant), blau: Umwelt bzw. Tierassoziierte Arten.

7.3.4 Gegenüberstellung der Belastungssituation der Gülle mit der Belastungssituation von Abwässern aus dem Klinikum

Im Vergleich mit den Proben aus dem Krankenhausabwasser dominierten in der Gülle lediglich 3MRGN, d. h. Isolate mit Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation, Chinolone und Piperacillin, aber nicht gegen Piperacillin-Tazobactam. 4MRGN wurden nicht isoliert (Abbildung 2). Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen aus den Schlachthofabwässern überein. Auch hier waren – aus zeitnah verarbeiteten Proben - sogar nach Anreicherungskulturen keine Carbapenemasebildner isoliert worden. Die multi-resistenten Bakterien aus den Krankenhausabwässern, bei denen die schwer behandelbaren 4MRGN überwogen (Sib et al., 2020), sind aus medizinischer Sicht als wesentlich kritischer zu bewerten, zumal hier auch noch Stämme auftraten, die zusätzlich Colistin-resistent waren, ohne das *mcr-1* Resistenzgen zu besitzen (durch Genomsequenzierung konnte die Resistenz hier auf eine Mutation in MgrB (C28S MgrB) zurückgeführt werden) (Kehl et al., 2022). Im Krankenhausabwasser konnte zudem kaum Umweltflora detektiert werden (5 %).

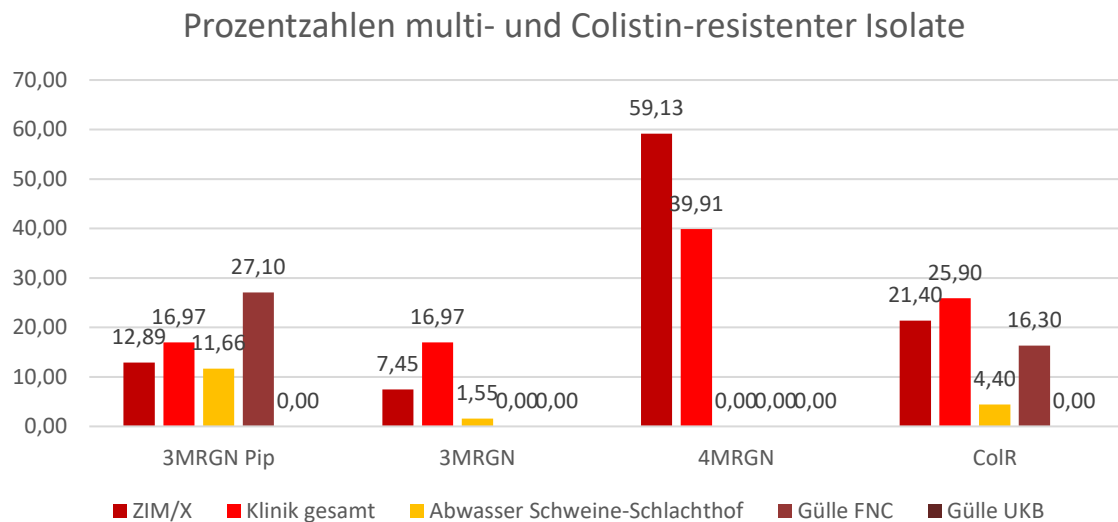


Abbildung 2: Multiresistente Erreger mit medizinischer Relevanz in Krankenhaus und Gülleproben im Vergleich (3MRGN Pip: resistent gegen Dritt-Gen. Cephalosporine; 3MRGN: resistent gegen Dritt-Gen. Cephalosporine+ Piperacillin + Chinolone; 4MRGN: resistent gegen Carbapeneme+Dritt-Generations-Cephalosporine + Piperacillin/ Tazobactam + Chinolone; ColR: resistent gegen Colistin). ZIM/X bezeichnet die Abwässer der hämatologisch-onkologischen Klinik und des nördlichen Teils des Klinikums. Wenn als Wert 0,00 Prozent angegeben wird, dann konnten aus der unverdünnten Gülle auf den Selektivplatten keine Bakterien mit dem entsprechenden Resistenzphänotyp angezogen werden.

Schlussfolgerungen zur Kultur-basierten Analyse der Gülleproben und Drainagewässer

- Aus der Gülle behandelter Tiere konnte eine geringe Anzahl gramnegativer Bakterien mit Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation (ESBL) und MRSA isoliert werden.
- Einige aus Gülle isolierte Bakterien wurden in Bezug auf ihre Multiresistenz als 3MRGN-Pip eingeordnet, sie sind aber hygienisch wesentlich weniger bedeutsam als die 4MRGN und 3MRGN die im Krankenhausabwasser zu großen Anteilen vorliegen. Die Menge an Colistin-resistenten Isolaten lag noch unter der in den Krankenhausabwässern.
- Die Versuche zur Isolierung von Antibiotika-resistenten Bakterien waren erfolgreicher, wenn die Tierbestände vorher antibiotisch behandelt worden waren. Ein Zusammenhang zwischen Antibiotikagabe, Antibiotikarückständen und Antibiotikaresistenzen der Isolate ließ sich nicht eindeutig beweisen.
- Nach 30-34 Wochen Lagerung konnten keine resistenten *Enterobacteriaceae* oder MRSA aus Gülle isoliert werden, auch Anreicherungskulturen waren nicht erfolgreich. Es ist unklar, ob die Bakterien inaktiviert waren, oder im VBNC-Status vorlagen.
- Aus Drainagewässern konnten – mit zwei Ausnahmen, wobei bei in einem Fall eine starke Verunreinigung vorlag – keine resistenten Bakterien isoliert werden.

7.4 Molekularbiologische Nachweise von Antibiotikaresistenz-Genen

7.4.1 Genetische, qPCR-basierte Nachweise von Antibiotikaresistenzgenen und taxonomischen Markergenen für fakultativ-pathogene Bakterien in Gülle aus Schweinehaltung

Die erzielten Ergebnisse beziehen sich alle auf die Anzahl von Genkopien bzw. Zelläquivalenten in 100 mL Probenvolumen und entsprechen somit einer absoluten Quantifizierung. Kalibriergerade mit definierten Zellzahlen an Referenzbakterien, die Träger der Resistenzgene sind, und mehrere Log-Stufen der Detektion beinhalten, wurden für jedes Detektionssystem erstellt. Alle molekular-biologischen Parameter wurden als technische Triplikate gemessen. Die Spezifität jeder Nachweisreaktion erfolgte über das Erstellen von Schmelzpunktbestimmungen der Amplicons nach jeder Analysenreaktion. Damit sind die qualifizierten Rahmenbedingungen für die Quantifikationen der Genspezies in den Abwasser-/Gülle-Proben definiert (siehe auch Methodenkompendium des HyReKA-Verbunds). Unspezifische Reaktionen wurde in nachfolgenden Ergebnisdarstellungen nicht berücksichtigt.

Nachweissysteme für fakultativ-pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene, die als prioritär angesehen werden (Scientific Opinion, EPSA Journal, 2021; siehe oben), wurden im HyReKA-Projekt bereits identifiziert und verwendet (nachfolgend fett geschrieben). Darüber hinaus wurden Nachweissysteme etabliert, um allgemeine Belastungssituationen mit spezifischen Bakterien oder Resistenzgenen zu quantifizieren. Die molekularbiologischen Untersuchungen weisen somit Resistenzpotentiale bzw. Risikopotentiale für das Auftreten von ausgewählten Resistenzgenen und taxonomischen Markergenen fakultativ-pathogener Bakterien in einer Gesamtpopulation nach, um Belastungen und damit auch mögliche Transferereignisse mit zu erfassen. Anders als in der klinischen Diagnostik, ist das Resistenzpotential in einer Population relevant.

Nachfolgend sind die verwendeten molekularbiologischen Untersuchungsparameter aus HyReKA mit zusätzlich Veterinär-relevanten Ergänzungen zur Charakterisierung von Gülle und Drainage-Wässern aus Tiermastbetrieben aufgeführt (Hembach et al., 2019; Alexander et al., 2020; HyReKA Methodenkompendium):

- β -Laktamresistenzen (*bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M32}, *pbp*)
- **Carbapenemresistenzen** (*bla*_{OXA48}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM2}, *bla*_{KPC-3})
- Erythromycinresistenz (*ermB*)
- Tetracyclinresistenz (*tetM*)
- Sulfonamidresistenz (*su1*)
- **Vancomycinresistenz** (*vanA*)
- **Colistinresistenz** (*mcr-1*)
- **Chinolonresistenz** (*qnrS*)

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

- Gentamicinresistenz (*aac-al-aph*)

Die Taxon-relevanten Parameter der fakultativ-pathogenen Bakterien aus der ESKAPE-Gruppe (WHO) wurden um *Salmonella enterica* (humanpathogen) und *Streptococcus suis* (tierpathogen, Hinweis auf behandlungsbedürftige Erkrankung) erweitert:

- *E. coli* (*yccT*)
- Methicillin resistente Staphylokokken (*mecA*)
- *K. pneumoniae* (*gltA*)
- *A. baumannii* (*secE*)
- *P. aeruginosa* (*ecfX*)
- Intestinale Enterokokken (23S)
- *Salmonella enterica* (*invA*)
- *Streptococcus suis* (*cps2J*)

Gülleproben aus Schweinemastbetrieben mit unterschiedlichem Tierbestand und Hektargrößen wurden analysiert. Nachfolgend sind die molekularbiologischen Auswertungen nach Tierbestand geordnet gezeigt.

Tabelle 5: Quantitativer qPCR-basierter Nachweis von fakultativ-pathogenen Bakterien über taxonomische Markergene pro 100 mL, die für die jeweilige Spezies spezifisch sind. LOD: Limit Of Detection.

Anzahl Tiere	Enterokokken	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>
4000	3,72E+05	<LOD	1,80E+04	1,97E+04	7,85E+04	1,07E+05
3560	7,63E+07	<LOD	6,60E+03	<LOD	<LOD	1,47E+06
2220	6,00E+07	1,36E+04	3,06E+03	6,29E+06	3,31E+05	1,53E+07
2200	1,80E+08	2,26E+03	9,53E+02	1,00E+05	1,94E+04	1,20E+06
1400	5,38E+05	<LOD	9,15E+04	3,85E+05	7,08E+05	1,01E+07
1300	3,01E+05	<LOD	2,43E+03	<LOD	<LOD	1,41E+05
540	5,41E+06	<LOD	1,78E+03	<LOD	2,21E+03	1,51E+05
520	3,18E+07	<LOD	1,19E+04	<LOD	8,27E+04	1,30E+06
455	2,36E+07	<LOD	7,61E+03	3,72E+03	1,56E+05	3,34E+06

Vor allem Vertreter aus der Gruppe der Enterokokken, *P. aeruginosa* und *E. coli* konnten in nahezu allen Proben unabhängig vom Tierbestand in teilweise hohen Abundanzen via qPCR nachgewiesen werden, wobei *P. aeruginosa* noch weniger häufig in Vergleich zu *E. coli* und Enterokokken nachgewiesen wurde, dieses ist auch zu erwarten, da es sich bei den letzteren Arten um Vertreter der Darmflora handelt. Die DNA-Marker für *K. pneumoniae* und *A. baumannii* dagegen konnten in 5 von 9 bzw. 7 von 9 Probenwässern mit deutlichen Belastungen in der Gesamtpopulation der Gülleproben detektiert werden. Dies war in Betrieben mit hohem und niedrigem Tierbestand erfolgreich.

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Lediglich der spezifische Nachweis von *E. faecalis* erfolgte nur in 2 Betrieben. Hier scheinen andere Enterokokken-Spezies zu dominieren.

Tabelle 6: A und B: Antibiotikaresistenzgene pro 100 mL Gülle mit besonderer klinischer Relevanz. LOD: Limit Of Detection.

A)

Anzahl Tiere	2. Cephalosporin Gen. (<i>bla</i> _{CTX-M-32})	Carbapenemase (<i>bla</i> _{OXA-48})	2. Cephalosporin G. (<i>bla</i> _{CMY-2})
4000	1,04E+07	<LOD	5,36E+05
3560	<LOD	2,94E+06	3,92E+04
2220	3,24E+05	<LOD	<LOD
2200	3,64E+05	<LOD	<LOD
1400	<LOD	<LOD	<LOD
1300	2,19E+06	<LOD	<LOD
540	3,88E+07	<LOD	1,94E+06
520	1,35E+07	6,45E+04	3,81E+05
455	1,69E+07	<LOD	<LOD

B)

Anzahl Tiere	Carbapenem (<i>bla</i> _{NDM-1})	Vancomycin (<i>vanA</i>)	Colistin (<i>mcr-1</i>)	Carbapenem (<i>bla</i> _{KPC-3})	Methicillin (<i>mecA</i>)
4000	2,75E+06	1,48E+03	4,70E+04	2,01E+06	1,74E+04
3560	4,90E+03	4,19E+02	1,26E+04	2,61E+05	4,66E+03
2220	<LOD	<LOD	3,72E+07	3,56E+04	1,20E+05
2200	6,57E+03	9,59E+04	<LOD	4,31E+04	1,43E+05
1400	1,43E+07	5,54E+03	1,17E+04	1,05E+05	3,28E+06
1300	<LOD	1,83E+04	<LOD	4,93E+05	1,39E+04
540	<LOD	1,57E+04	4,37E+04	7,01E+03	1,10E+04
520	<LOD	3,40E+04	<LOD	<LOD	3,98E+04
455	4,92E+06	5,14E+03	7,97E+02	1,34E+04	7,03E+05

Die Carbapenem-Resistenzgene *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1}, sowie Cephalosporin Resistenz der 2. Generation *bla*_{CMY-2} wurden nur vereinzelt und unabhängig des Tierbestands nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde *bla*_{CTX-M-32} (Cephalosporin der 2. Generation), die Vancomycin-Resistenz *vanA*, die Colistin-Resistenz *mcr-1* und die Carbapenem-Resistenz *bla*_{KPC-3} deutlich häufiger in den Gülleproben nachgewiesen. Hier ist der Nachweis der Colistin-, Vancomycin- und Carbapenem (*bla*_{KPC-3})-Resistenz als besonders kritisch zu werten, da es sich hier um Resistenzgene gegen klinisch bedeutsame Reserveantibiotika handelt, die in der Tiermast eigentlich nicht oder nur bedingt eingesetzt

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

werden sollten. Im Falle des *bla*_{KPC-3} Resistenzgens lagen die Abundanzen höher als der taxonomische Nachweis für *K. pneumoniae*. Dies kann der Tatsache geschuldet sein, dass der taxonomische Genmarker sehr Spezies spezifisch für *K. pneumoniae* ist, während der Resistenzgenmarker für die *bla*_{KPC-3} (Szczepanowski et al., 2009) in weiteren Klebsiellen und anderen Bakterien vorliegen kann, die das *bla*_{KPC-3} Plasmid tragen (z.B. *Phytobacter ursingii* oder *Streptomyces polyasparticus*). Auch die Methicillin Resistenz *mecA* wurde in deutlich hohen Abundanzen detektiert und dies unabhängig vom Tierbestand. Dieses Resistenzgen kann gleichzeitig ein taxonomischer Marker für tierassoziierte Koagulase-negative Staphylokokken (Hautflora) sein. Es bleibt zu untersuchen, welche Bakterienspezies dieses Resistenzgen *mecA* trägt, bzw. wenn es sich um MRSA handeln sollte, wie lange diese Tier-assoziierte Bakterienspezies in der Gülleprobe persistieren kann.

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Tabelle 7: Antibiotikaresistenzgene, die in Abwässern und Oberflächenwässern bereits häufig nachgewiesen sind. LOD: Limit Of Detection.

Anzahl Tiere	Erythromycin (<i>ermB</i>)	Ampicillin (<i>bla_{TEM}</i>)	Sulfonamid (<i>su1</i>)	Tetracyclin (<i>tetM</i>)
4000	2,70E+10	5,98E+07	2,32E+10	7,89E+10
3560	4,32E+09	9,21E+07	2,08E+10	3,31E+11
2220	1,96E+09	6,89E+08	7,47E+09	7,66E+10
2200	8,64E+09	4,04E+08	9,05E+10	1,21E+11
1400	3,26E+09	4,16E+09	6,21E+10	2,44E+10
1300	1,59E+10	<LOD	3,91E+10	6,13E+10
540	1,87E+09	3,45E+07	3,19E+10	1,75E+11
520	1,58E+10	6,46E+07	1,11E+10	1,79E+11
455	2,34E+10	1,73E+08	2,98E+10	3,79E+10

Die Ergebnisse aus Tabelle 7 belegen die hohen Abundanzen der Resistenzgene gegen Tetracyclin (*tetM*), Sulfonamide (*su1*) und Erythromycin (*ermB*). Die Ampicillin-Resistenz, die über das Gen *bla_{TEM}* vermittelt wird, wurde in einer geringeren Belastung nachgewiesen, zeigt aber immer noch eine deutlich hohe Abundanz. Für die Kalibriergerade und als Positivkontrolle für das Erythromycin-Resistenzgen *ermB* wurde *Streptococcus hyointestinalis* genutzt. Dieses Bakterium stammte auch ursprünglich auch aus dem Darm von Schweinen. Die Primersequenzen, die für dieses Resistenzgen gewählt wurden, erfassen auch die Bakterien aus der Gruppe der Enterokokken, Streptokokken und Clostridien. Der Nachweis der Tetrazyklin-Resistenz über das *tetM*-Gen wurde zunächst so ausgewählt, dass sie nicht auf eine spezifische Spezies ausgerichtet ist. Tatsächlich zeigt ein BLAST Alignments der Forward und Reverse Primer eine 100% Übereinstimmung mit *tetM* Genen aus *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Staphylococcus* spp. und auch *Streptococcus*. Zudem sind viele der untersuchten Resistenzgene, die im Rahmen von HyReKA untersucht wurden, als mobil beschrieben oder direkt mit **Mobilgenetischen Elementen (MGE)** assoziiert, wie im Falle der Sulfonamid-Resistenz *su1* und dem MGE Integron Class 1. Ein horizontaler Gentransfer in Gülle ist daher anzunehmen, da Phosphate, Partikelfrachten, metabolische Shifts und Nährstoffsituationen (Stress) den horizontalen Gentransfer fördern und von daher auch diese hohen Abundanzen bedingen können.

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Tabelle 8: Weitere Antibiotikaresistenzgene und zusätzlich Veterinär-assoziierte fakultativ-pathogene Bakterien. LOD: Limit Of Detection.

Anzahl Tiere	Gentamicin (aac(6')Ie-aph(2'')-Ia)	Amoxicillin (<i>pbp</i>)	<i>S. enterica</i>	<i>S. suis</i>
4000	1,07E+07	1,92E+04	7,95E+04	2,45E+04
3560	4,51E+06	1,60E+04	<LOD	<LOD
2220	6,70E+08	1,36E+06	7,52E+04	<LOD
2200	2,60E+07	3,22E+05	<LOD	<LOD
1400	5,07E+06	5,34E+05	<LOD	<LOD
1300	2,68E+07	1,51E+04	9,45E+04	4,96E+04
540	1,53E+07	1,33E+04	1,85E+06	<LOD
520	4,85E+06	3,70E+04	2,34E+05	1,74E+05
455	5,62E+07	3,43E+04	1,36E+05	4,92E+04

Die Gentamicin-Resistenz wurde in hoher Abundanz mit Genkopien/100 mL größer 10^6 bis zu $>10^7$ deutlich in allen untersuchten Betrieben unabhängig von dem Tierbestand nachgewiesen. In geringerer Abundanz mit Genkopien von 10^4 bis zu 10^6 wurde die Amoxicillin Resistenz in Gülleproben aller Betriebe erfasst.

Die beiden taxonomischen Parameter für *Salmonella enterica* und *Streptococcus suis* wurden in 6 bzw. 4 Betrieben mit Abundanzen bis zu 10^6 Zellen/100 mL nachgewiesen. Auch hier konnte keine Korrelation zur Größe des Tierbestands festgestellt werden.

Schlussfolgerungen zu den Gülleproben

Generell zeigen sich die Abwässer/Gülle-Proben bezüglich der Häufigkeit von Antibiotikaresistenzgenen und DNA-Markergenen von fakultativ pathogenen Bakterien als deutlich belastet.

Antibiotikaresistenzen gegen Reserveantibiotika (Carbapeneme, Glykopeptide, Colistin, Chinolone), die vor allem durch die Gene *mcr-1*, *bla_{NDM-1}*, *vanA*, *qnrS* und *bla_{KPC-3}* nachgewiesen werden, konnten in nahezu alle Proben detektiert werden. Das Methicillin-Resistenzgen *mecA* wurde ebenfalls nachgewiesen, wenngleich *Staphylococcus aureus* als Träger des *mecA* Gens nicht isoliert werden konnte und die Hautflora der Haustiere als der natürliche Ursprung dieses Gens gilt (*Staphylococcus sciuri*-Gruppe) (Rolo et al., 2017).

Es konnten keine Korrelationen zwischen Tierbestand bzw. Betriebsgrößen (hier nicht gezeigt) und Belastungssituationen mit fakultativ-pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen unterschiedlicher Kategorien nachgewiesen werden.

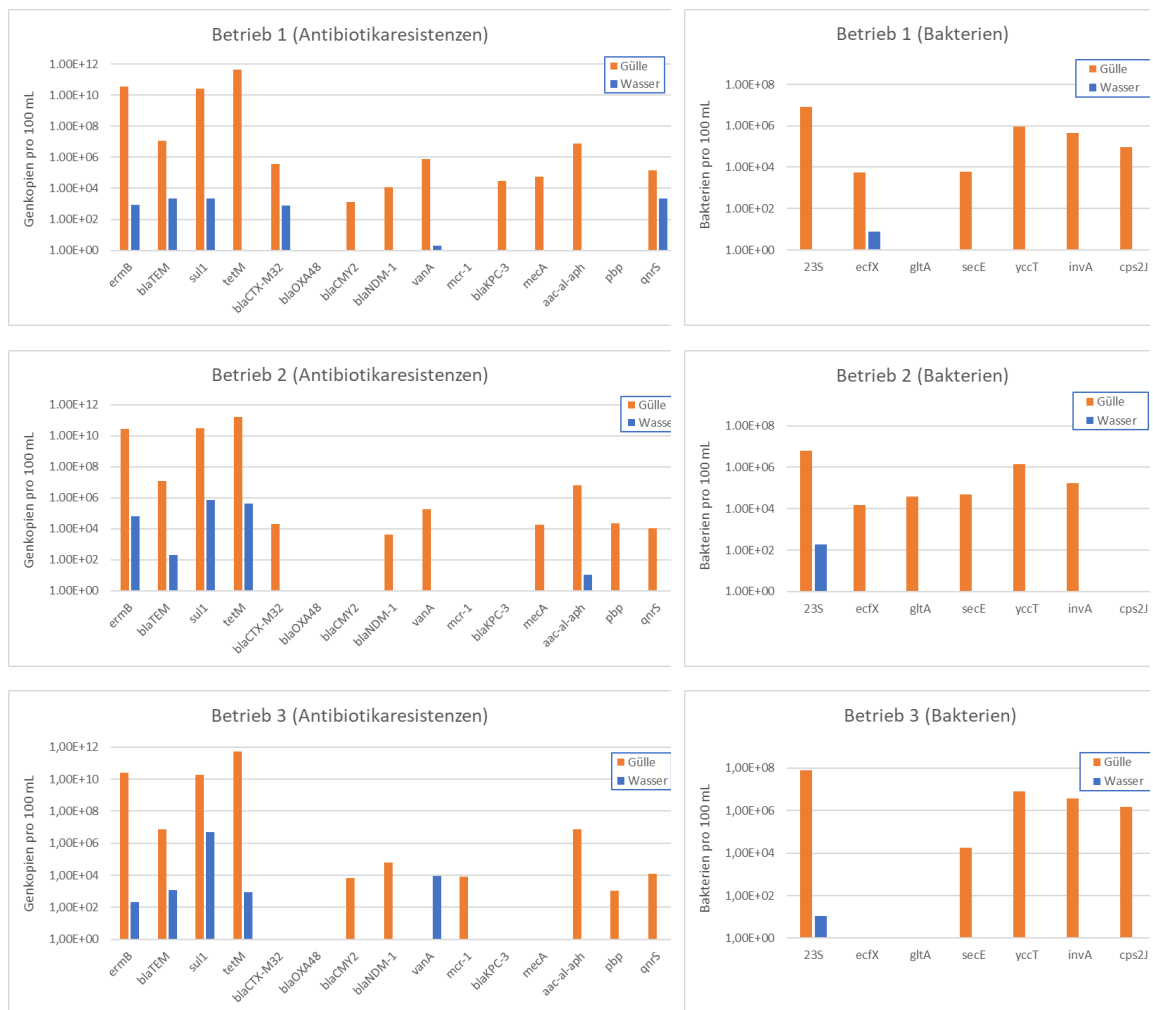
Aufgrund der hier untersuchten Probenanzahl aus den jeweiligen Tiermastbetrieben für Schweine sind Angaben zu bestimmten Prozess-Schritten im Umgang mit Gülle zur Minimierung von Belastungen nicht möglich.

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinestiermast und in Drainagewässern

7.4.2 Quantitative molekularbiologische Untersuchungen (qPCR basiert) zur Erfassung von Belastungssituationen mit fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Gülle- und Drainagewässern

In einer zweiten Messkampagne wurden insgesamt 8 Gülle- und 6 Drainagewässer aus 8 weiteren Mastbetriebe für Schweine untersucht. Die Proben wurden vom Projektpartner Uniklinikum Bonn, nach Erhalt vom Mastbetrieb, gekühlt an das KIT versendet. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte am gleichen Tag der Anlieferung. Die Aufarbeitung der Gülleproben erfolgten gemäß der ersten Kampagne; größere Probenvolumen von bis zu 200 mL wurde für die DNA-Extraktion aus anliegenden Drainagewässern genutzt. Nach Rücksprache mit den Projektpartnern erfolgte die Probenahme der Drainagewässer nach der Ausbringung der Gülle auf die Felder.

Die Untersuchungsparameter sind analog zu der ersten Untersuchungskampagne (Abschnitt 7.4.1). Die in der qPCR gemessenen Parameterkonzentrationen wurden zum besseren Vergleich der Belastungssituationen von Gülle und Drainagewasser auf 100 mL normiert. Nachfolgend sind die Konzentrationen der untersuchten Antibiotikaresistenzen und fakultativ pathogenen Bakterien nach Mastbetrieb getrennt aufgeführt.



7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

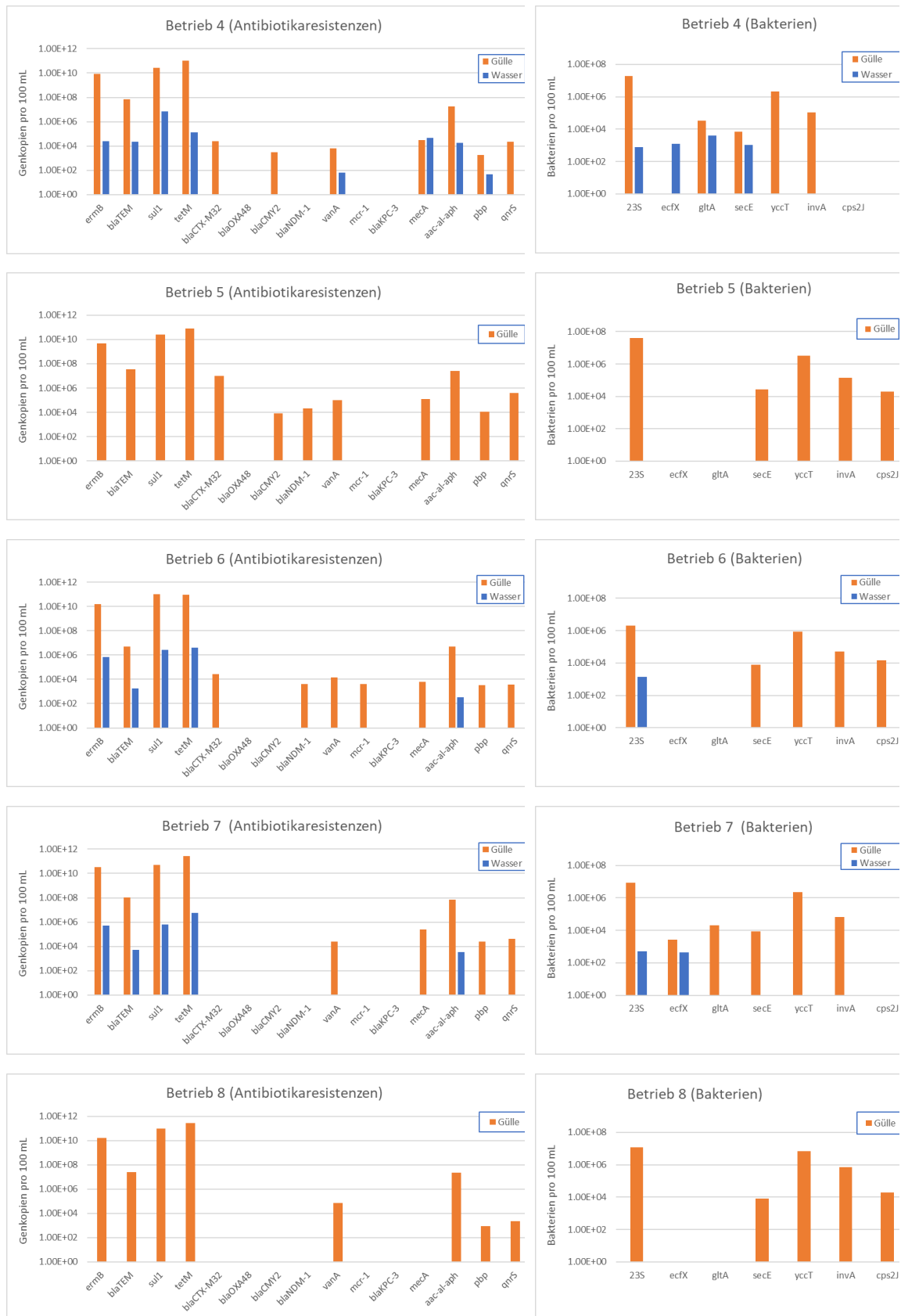


Abbildung 3: Molekularbiologischer Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen und fakultativ-pathogenen Bakterien in Gülleproben und Drainagewässern von 8 unterschiedlichen

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinestiermast und in Drainagewässern

Schweinemastbetrieben. Gen-Namen für Antibiotikaresistenzen und Bakterien sind im Abschnitt 7.4.1 erklärt.

Im Durchschnitt (Mittelwert aus 8 Betrieben) wurden mit Ausnahme der Carbapenemase *bla*_{OXA48} alle Antibiotikaresistenzgene in den **Gülle-Proben (Abbildung 3, orange)** nachgewiesen. Individuelle Unterschiede im quantitativen Auftreten der Untersuchungsparameter wurden vor allem für β -Laktamasen (*bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M32}), Carbapenemasen (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-3}), das Vancomycin-Resistenzgen (*vanA*) und für das Colistin-Resistenzgen (*mcr-1*) festgestellt. Die Abundanz aller anderen Antibiotikaresistenzen war ähnlich für alle untersuchten Gülleproben.

DNA der fakultativ pathogenen Bakterien der intestinalen Enterokokken, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* wurde in allen Gülleproben nachgewiesen. Individuelle Unterschiede gab es für *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* und *Streptococcus suis*. In keiner Gülle-Probe wurden alle untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien nachgewiesen.

In den **Drainagewässern (Abbildung 3, blau)** wurden vor allem Abundanzen für die Erythromycinresistenz (*ermB*), Sulfonamidresistenz (*sul1*), Tetracyclinresistenz (*tetM*) und die Beta-laktamase *bla*_{TEM} nachgewiesen. Diese Resistenzdeterminanten wurden auch anderen Untersuchungen von Abwässern und Oberflächenwässern als bereits häufig vorkommend beschrieben (siehe auch Abschnitt 7.4.1). Im Gegensatz zur gleichen betrieblich-assoziierten Gülleprobe lagen diese Abundanzen aber bis zu 6 Zehnerpotenzen niedriger. Die höchste Antibiotikaresistenzgendiversität wurde im Drainagewasser des Betriebs 4 festgestellt. Dort wurden 8 von maximal 15 Antibiotikaresistenz-Parametern gemessen. Die Parameter für bestimmte Beta-Laktamasen und Carbapenemasen (*bla*_{CMY2}, *bla*_{NDM1}, *bla*_{KPC-3}) sowie die Colistinresistenz *mcr-1* konnten in keinem Drainagewasser nachgewiesen werden. Das Drainagewasser von der Probestelle 1 war deutlich am geringsten belastet und deutet eher darauf hin, dass es sich nicht um ein Drainagewasser gehandelt hat, da alle weiteren untersuchten Drainagewässer ähnliche hohe Abundanzen aufwiesen.

Die Konzentrationen DNA-Marker der nachgewiesenen fakultativ-pathogenen Bakterien in den Drainagewässern war sowohl qualitativ, als auch quantitativ deutlich geringer als in den Gülleproben. Hier wurden meist nur einzelne bakterielle Untersuchungsparameter gemessen. Eine Ausnahme bildet wiederum der Betrieb 4. In diesem Drainagewasser wurden 4 von 7 fakultativ-pathogenen Bakterien nachgewiesen (intestinale Enterokokken, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *A. baumannii*).

Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen der Gülleproben und Drainagewässer

Gülleproben zeigen sich als deutlich mit Antibiotikaresistenzgenen auch gegen Reserveantibiotika belastet. Auch DNA-Marker fakultativ-pathogener Bakterien sind in signifikanten Abundanzen nachweisbar.

Es zeigen sich unterschiedliche Risikopotentiale bei den untersuchten Mastbetrieben, gerade bei der Erfassung von Resistenzgenen gegen die Reserveantibiotika. Es zeigt

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

sich, dass sich die molekularbiologischen Quantifizierungen von Resistenzgenen oder Bakterien als Toolbox für die grundsätzliche Erfassung des Vorkommens von Antibiotikaresistenzgenen gegen Reserveantibiotika eignen.

Drainagewässer zeigen sich in dieser weiteren Messkampagne als signifikant weniger belastet. Dies zeigt sich bei der Detektion von Resistenzgenen als auch beim Nachweis von Bakterien. Diese geringen Abundanzen können aber auch möglicherweise auf die geringen Regenereignisse während der Kampagne zurückgeführt werden, die eine geringe Versickerung des Oberflächenwassers nach Gülleausbringung verursacht hatte.

7.4.3 Gegenüberstellung der Belastungssituationen der Gülle mit Abwässern aus dem Universitätsklinikum Bonn

Die dargestellten Daten basieren auf dem **Gesamtabwasserstrom des Klinikums Bonn** (n=9) und Gülleproben **aus 29 unterschiedlichen Schweine-Mast- und Zuchtbetrieben** (n=29). Es können keine Angaben zu den Gülleproben bezüglich Alter, Lagerung oder Behandlung gemacht werden.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde wiederum das Spektrum an Primer-Systemen verwendet, wie sie bereits in den vorangegangenen Teilbereichen für klinische Abwässer und kommunale Abwässer für die qPCR-basierten Analysen eingesetzt wurden (Sib et al., 2020; Hembach et al., 2017; 2019; Alexander et al., 2020; Methodenkompendium HyReKA). Für die Untersuchungen der Gülle wurden darüber hinaus auch für den Veterinärbereich relevante Zielgene integriert (*Streptococcus suis*, *Salmonella enterica*, Amoxicillin-Resistenzgen, Gentamicin-Resistenzgen, Chinolon-Resistenzgen).

Es zeigte sich, dass die Abundanzen der fakultativ-pathogenen Bakterien in den Gülleproben im Vergleich zum Klinikabwasser mit ähnlich hohen Belastungen nachgewiesen wurden. Teilweise zeigten spezifische Nachweise für Enterokokken-Spezies in Klinikabwasser höhere Abundanzen als in den Gülleproben (*E. faecalis*). Dafür scheinen andere Enterokokken-Spezies häufiger in Gülle vorzukommen (siehe „Enterokokken“). Zusätzlich wurden auch die Bakterienspezies *S. suis* und *S. enterica* in den Gülleproben mittels qPCR quantifiziert (in Klinikabwässern nicht untersucht).

Von besonderer Bedeutung ist das Auftreten von Antibiotikaresistenzgenen gegen Reserveantibiotika. So wurden Resistenzgene gegen Colistin mit *mcr-1*, Chinolone mit *qnrS*, Glykopeptide mit *vanA*, Carbapeneme mit *bla_{OXA48}* kontinuierlich in Gülle- und Klinikabwasserproben nachgewiesen. Die Resistenzgene gegen Carbapeneme *bla_{NDM-1}* und *bla_{KPC-3}*, die als genetisch mobil beschrieben sind, wurden bereits in den meisten Schweinemastbetrieben nachgewiesen (siehe Abschnitt 7.4.1 und 7.4.2). Beide Gene wurden auch im Klinikabwasser nachgewiesen (in Abbildung 4 jedoch nicht aufgeführt). Weitere Resistenzgene gegen Ampicillin und Gentamicin wurden dagegen in allen Gülleproben nachgewiesen, in den Klinikabwässern jedoch nicht untersucht.

Antibiotikaresistenzgene, die schon häufig und in hohen Abundanzen in Abwässern gemessen wurden (z.B. *bla_{TEM}*, *ermB*, *sul1*, *tetM*) werden sowohl in Klinikabwässern als

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

auch in den Gülleproben in vergleichbar hohen Abundanzen nachgewiesen, die die Belastungen mit Genen gegen Reserveantibiotika deutlich überschreiten. Durchgehend sind die Gülleproben mit den genetischen Determinanten dieser häufig vorkommenden Resistenzgene (z.B. *bla*_{TEM}, *ermB*, *sul1*, *tetM*) sogar höher belastet (Abbildung 4).

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinestiermast und in Drainagewässern

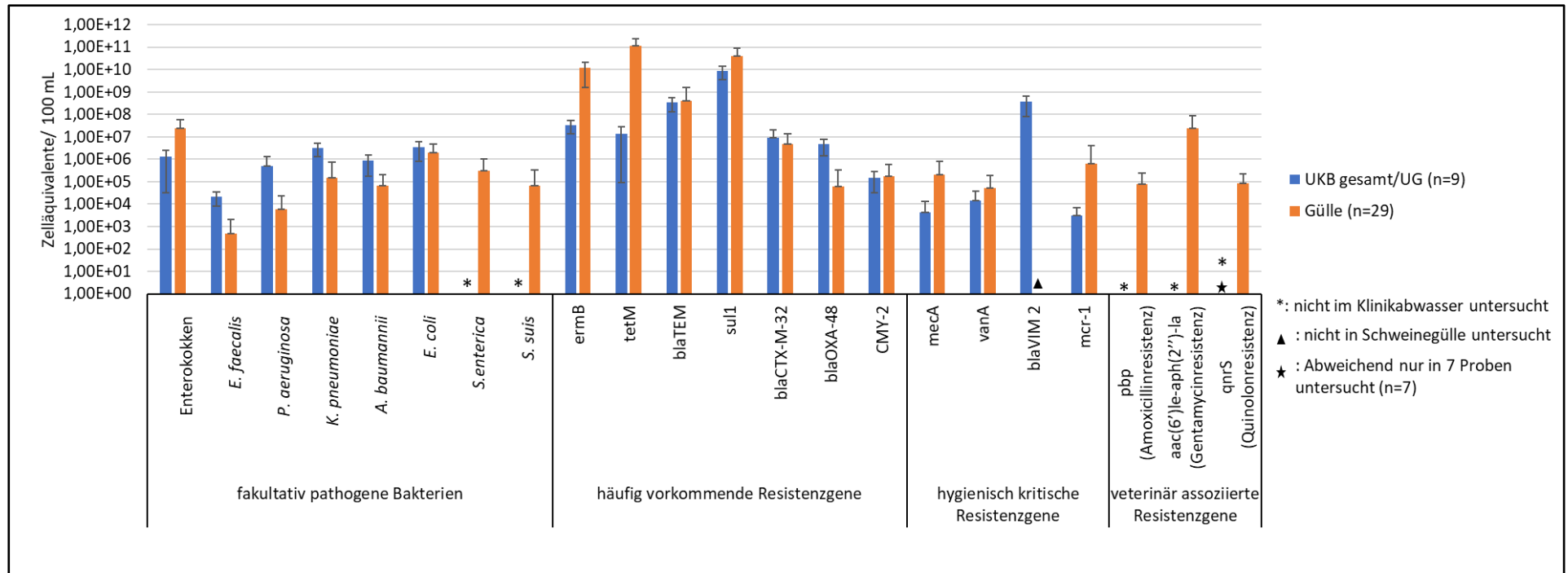


Abbildung 4: Vergleich der Abundanzen von Genmarkern für fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Abwasser des Uniklinikums Bonn-Gesamt/UG (n=9) und Gülleproben aus der Schweinestiermast (n=29).

Schlussfolgerung zu den vergleichenden Abundanzen in Klinikabwasser- und Gülleproben aus Schweinemastbetrieben

Nicht nur in den Klinikabwässern, sondern auch in den Gülleproben treten die besonders klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgene gegen Reserveantibiotika wie Colistin, Carbapeneme, Glycopeptide und Chinolone auf.

Eine Persistenz in Infektionserregern oder auch Gentransfer auf fakultativ-pathogene Bakterien in der Gülle und im Klinikabwasser ist anzunehmen, da auch diese kritischen Bakterienspezies mit molekularbiologischen Analysen in deutlich hohen Abundanzen nachgewiesen wurden.

Die DNA-Marker für fakultativ- pathogene Bakterien kommen bis zu 2-Log Stufen häufiger im Klinikabwasser vor (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. faecalis*) vor. Auch Carbapenemresistenzen (bla_{OXA48} , bla_{VIM2}) sind deutlich häufiger im Krankenhausabwasser nachgewiesen worden. Jedoch wurde oftmals das kritisch zu bewertende Colistin-Resistenzgen ($mcr-1$) in der Gülle in höheren Abundanzen gemessen als im Klinikabwasser. Darüber hinaus wurden auch die Carbapenem-Resistenzgene bla_{NDM-1} und bla_{KPC3} in einigen Gülleproben, wobei bla_{NDM-1} auch im Klinikabwasser nachgewiesen wurde (bla_{KPC3} nicht getestet). Auf der anderen Seite ist die Gülle deutlich stärker mit den weniger hygienisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen (*ermB*, *sul1*, *tetM* und bla_{TEM}) belastet.

Die Konzentration der untersuchten Antibiotikaresistenzgene und fakultativ-pathogenen Bakterien in den Gülleproben lagen im Vergleich zu den bisher im HyReKA-Projekt untersuchten kommunalen Abwässern aus Kläranlagenausläufen (n=24) um 2-3 Log-Stufen höher (Daten hier nicht gezeigt), gelangen jedoch auch direkt in die Umwelt.

7.5 Vergleichende Bewertung der Kulturergebnisse und molekularbiologischen Ergebnisse

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Molekularbiologie wurden wenig Stämme isoliert und vor allem im Vergleich mit Krankenhausabwasser schienen weniger Kolonien der Zielspezies auf den Selektivplatten zu wachsen, obwohl die PCR-Signale in zumindest einigen Proben in gleicher Höhe vorhanden waren. Um abzuschätzen, ob aus den Gülleproben weniger Bakterien auf den Kulturplatten angewachsen sind als im Krankenhausabwasser, wurden die dort erreichten PCR-Werte und die Kulturergebnisse verglichen. Der Vergleich der PCR-Ergebnisse und Kulturergebnisse zeigte;

1. „dass im Krankenhausabwasser viele der HyReKA-Zielspecies, wie *Pseudomonas*, *Klebsiella* und *Acinetobacter*, die auch in der Umwelt gut überleben oder sich sogar vermehren in höheren Konzentrationen vorlagen als in der Gülle (Abbildung 4). Im Krankenhausabwasser machten diese Arten den Großteil der isolierten multi-resistenten Stämme aus. In der Gülle (und auch in den

Schlachthofabwässern) lagen dagegen im Vergleich mehr *E. coli* vor, deren Umweltresistenz geringer ist.

2. „dass in der Gülle wesentlich höhere Werte für die 16S RNA als Schätzparameter für die allgemeine bakterielle Belastung erreicht wurden. Damit lag in der Gülle insgesamt eine höhere Bakterienkonzentration vor als im Krankenhausabwasser, dabei handelte es sich vermutlich um Bakterien, die erst sekundär während der Lagerung die ursprünglichen Keime überwachsen hatten. In der Kultur spiegelte sich dieses wie berichtet durch das Wachstum von zahlreichen intrinsisch resistenten Arten auf den Agarplatten wider, die nicht zu den Zielspezies von HyReKA gehörten, aber ähnliche Koloniemorphologien und intrinsische Antibiotikaresistenzen besaßen und zu einem großen Teil noch nicht einmal in der Datenbasis des Massenspektrometers hinterlegt waren. Weiter konnte aufgrund der Beschaffenheit der Gülle nur geringe Probenvolumina auf den Platten ausgespatelt werden, ohne die Platten zu überlasten und eine Filtration war nicht möglich, so dass die Ausbeute an isolierten *E. coli*-Stämmen geringer war als im Klinikabwasser. Ein weiterer Aspekt ist auch, dass die im Vergleich zum humanen frischen Abwasser veränderte Zusammensetzung des Artenspektrums der Gülle eine direkte Abschätzung von resistenten Kolonien nicht ermöglicht. Die Kultivierung kann hier lediglich Aufschluss über die Multiresistenz der Organismen geben.
3. „dass nach nochmaliger Lagerung der Gülle war auch kein Wachstum in Antibiotika-freier Mossier-Bouillon festzustellen war. Dieses Medium ist selektiv für Enterobacterales und dass keine Zellen gewachsen sind, weist stark auf eine Inaktivierung der Bakterien oder das Vorliegen des VBNC- (viable but not culturable) Zustandes durch die Lagerung der Gülle hin. Auch dies führt zu einer Verminderung der Ausbeute.

Zusammenfassend bedeutet die hohe Abundanz von Resistenzgenen in der Gülle ein Risikopotential, eine Manifestation eines akuten Risikos für Mensch und Tier würde aber nur gesehen, wenn ein Nachweis vermehrungsfähiger Bakterien durch die Kulturverfahren erfolgt wäre.

7.6 Chemisch-analytischer Nachweis von Antibiotikarückständen

Im Rahmen des Gülle-Teilprojektes wurden insgesamt 45 Gülleproben und 12 Proben von Drainagewässern auf Antibiotikarückstände untersucht. Insgesamt gab es in den untersuchten Gülleproben insgesamt 106 quantitative Nachweise von Antibiotikarückständen, wobei in vielen Fällen die PNEC-Werte für die Entstehung von Resistenzen (= Predicted No Effect Concentrations for selection of resistance), oder sogar die „lowest MIC“-Werte (= Minimal Inhibitory Concentrations) überschritten wurden (Bengtsson-Palme und Larsson 2016). In den Proben der Drainagewässer konnten jeweils keine Antibiotikarückstände nachgewiesen werden.

7.6.1 Untersuchungen der Gülleproben

Die Gülleproben wurden entweder durch eine Probenehmerin des FNC (2019), oder durch die Landwirte (2020 & 2021) genommen. Die Probenahme fand nach einer Gülle-Homogenisierung in den Tanks im Vorfeld der Ausbringung der Gülle auf landwirtschaftlichen Flächen statt. Die Proben wurden in sterile Gefäße gefüllt und gekühlt transportiert. Nach Probeneingang im Labor wurden diese entweder am gleichen Tag analysiert bzw. bis zur Analyse bei -40°C gelagert. Teilproben gingen jeweils zeitnah an die AG Schmithausen sowie im gekühlten Transport an die AG Schwartz.

Die Proben wurden homogenisiert, mit einer Extraktionslösung (Wasser:Acetonitril 8:2 + 10 g/l EDTA) verdünnt und zentrifugiert, bevor der Überstand zur Messung in ein Vial überführt wurde. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Analyten (s. Tab. 9) mittels LC-MS/MS mit Hilfe isotope-markierter interner Standards analog zur Methode von Voigt et. al. (Voigt et al. 2019).

Tabelle 9: Liste der Antibiotikarückstände, die im Rahmen des HyReKA-Projektes in Schweinegülle untersucht wurden.

Untersuchungsspektrum der chemischen Gülleuntersuchungen

Piperacillin	Metronidazol	Sulfathiazol
Cefotaxim	Linezolid	Sulfamerazin
Ceftazidim	Benzylpenicillin	Sulfadimidin
Ciprofloxacin (Cipro)	Ampicillin	Sulfamethoxyridazin
Enrofloxacin (Enro)	Penicillin V	Sulfachloropyridazin
Moxifloxacin	Amoxicillin	Sulfaethoxyridazin
Ofloxacin	Methicillin	N4-Acetyl-Sulfamethoxazol
Marbofloxacin	Oxacillin	Sulfadoxin
Clindamycin	Nafcillin	Sulfadimethoxin
Dehydrato-Erythromycin	Flucloxacillin	Trimetoprim
Erythromycin	Mezlocillin	Tetracyclin (Tetra)
Clarithromycin	Chloramphenicol	Doxycyclin (Doxy)
Azithromycin	Florfenicol	Oxytetracyclin (Oxytetra)
Roxithromycin	Tiamulin (Tia)	Chlortetracyclin (Chlortetra)
Spiramycin	Sulfadiazin	
Tylosin	Sulfamethoxazol	

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

In der Mehrzahl der untersuchten Proben konnten Substanzen aus der Stoffgruppe der Tetracycline, das Pleuromutilin Tiamulin, sowie die Fluorchinolone Enrofloxacin und Ciprofloxacin nachgewiesen werden (s. Tabelle 10). Die höchste nachgewiesene Konzentration betrug 4100 µg/kg Doxycyclin in der Probe eines Betriebes, der Anfang 2020 beprobt wurde. Insgesamt hatte Doxycyclin mit 56 % die größte Nachweishäufigkeit. Die nachgewiesenen Konzentrationen des Doxycyclins lagen immer oberhalb des PNEC und in 80 % der Fälle auch oberhalb des lowest MIC. Die nachgewiesenen Konzentrationen liegen in einem Konzentrationsbereich, in dem in der Vergangenheit bereits Rückstände von Tetracyclinen nachgewiesen werden konnten (van den Meersche et al. 2016). In 84 % der Fälle, in welchen Doxycyclin nachgewiesen werden konnte, konnte zusätzlich mindestens ein weiteres Tetracyclin nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der chemischen Gülleuntersuchungen

	Cipro	Enro	Tyl	Tia	Tetra	Doxy	Oxytetra	Chlortetra
pos. Nachweise (n)	6	17	5	13	16	25	14	8
Nachweishäufigkeit [%]	13	38	11	29	36	56	31	18
Konz. > MIC (n)	6	15	0	1	15	20	4	-
Konz. >PNEC (n)	0	2	5	12	1	5	10	-
Maximalwert [µg/kg]	82	420	830	2200	540	4100	420	150

Bei Tiamulin handelt es sich um einen antibiotischen Wirkstoff, der in Deutschland nur zum Einsatz in der Veterinärmedizin zugelassen ist und bei der Behandlung von Schweinen und Geflügel eingesetzt wird. Die nachgewiesenen Konzentrationen überschritten auch hier in allen Positivproben den jeweiligen PNEC, aber nur in einem Fall die geringste festgestellte minimale Hemmkonzentration (lowest MIC) (Tabelle 10).

Enrofloxacin wurde in 38 % der untersuchten Gülleproben nachgewiesen, ebenfalls immer mit Konzentrationen oberhalb des PNEC, wobei in 88 % der Fälle auch der lowest MIC überschritten wurde. Ciprofloxacin, das zweite nachweisbare Fluorchinolon, ist ein aktiver Metabolit des Enrofloxacin und ebenfalls ein von der WHO als HPCIA eingestuftes Antibiotikum.

Ciprofloxacin selbst ist nicht für den Einsatz in der Veterinärmedizin zugelassen, wird aber im Organismus durch Abspaltung einer Ethylgruppe am Piperazin-Ring des Enrofloxacin aus diesem gebildet. Im Rahmen des HyReKA-Projektes wurde bereits das Abwasser von Schlachthöfen untersucht, wobei auch hier Ciprofloxacin in Konzentrationen zwischen 0,16 µg/l und 4,20 µg/l im Zulauf der Kläranlagen nachgewiesen werden konnte (Savin et al. 2020).

Sowohl Tetracycline als auch Fluorchinolone neigen stark zu Bindungen an Feststoffoberflächen, weswegen sie bei der kommunalen Abwasseraufbereitung in den Kläranlagen über den Klärschlamm weitgehend von der flüssigen Phase abgetrennt werden. Im Falle der Gülle werden die festen Bestandteile nicht abgetrennt, weswegen die Antibiotikarückstände hier über den Einsatz der Gülle als Wirtschaftsdünger auf die

landwirtschaftlichen Flächen und damit in die Umwelt gelangen. Die Stoffe gelangen so in tiefere Bodenschichten, wo sie als sogenannte „gebundene Rückstände“ längerfristig persistieren. Sie können über lange Zeiträume hinweg nachgewiesen werden, da sie im Boden nur im verringerten Maße für Abbauprozesse zugänglich sind und, in Abhängigkeit von Parametern wie etwa pH-Wert des Bodens, organischem Bodenanteil, Ionenaustauschkapazität oder Bodenzusammensetzung auch wieder desorbiert werden können (Pollard und Morra 2018; Riaz et al. 2018; Hamscher et al. 2002)

Schlussfolgerung zur chemischen Analyse der Gülleproben

Schweinegülle ist häufig mit Antibiotikarückständen in erhöhten Konzentrationen belastet. Die nachgewiesenen Konzentrationen überschreiten oft den jeweiligen, stoffspezifischen PNEC (für resistenzselektive Prozesse) oder gar den analytspezifischen MIC-Wert (s. Tabelle 10). Vor allem langlebige Rückstände von Tetracyclinen und Fluorchinolonen gelangen über die Gülleausbringung in die Umwelt. Als antibiotisch wirksames Abbauprodukt des Veterinärantibiotikums Enrofloxacin gelangen Rückstände des humanen Reserveantibiotikums Ciprofloxacin in die Umwelt, weswegen der Einsatz von Enrofloxacin im Veterinärbereich kritisch zu sehen ist.

7.6.2 Untersuchungen von Drainagewasser

Drainagewasserproben der landwirtschaftlichen Betriebe des UKB-Teils

Nach Ausbringung der Gülle auf drainierte Ackerflächen wurden sowohl vom UKB (AG Schmithausen) als auch vom Erftverband, Proben von Drainagewasser aus diesen Flächen genommen. Diese Drainagen fördern nach stärkeren Niederschlagsereignissen Wasser aus den oberen Bodenschichten in an die Ackerflächen angrenzende Gräben oder Oberflächengewässer. Während des Projektes konnte nur eine relativ niedrige Anzahl von Drainagewasserproben untersucht werden. Ursächlich dafür waren ungewöhnliche Trockenphasen während der Zeit der Gülleausbringung, in deren Folge die Böden so stark ausgetrocknet waren, dass sie selbst nach stärkeren Regenfällen kein Wasser an die Drainagen abgaben.

Die Proben der Drainagewässer wurden am Tag ihres Eintreffens im Labor analysiert. Dazu wurde die, im Rahmen des HyReKA-Projektes entwickelte, Methode zur Quantifizierung von 54-Antibiotikarückständen in wässrigen Matrices verwendet. In keiner der untersuchten Proben konnten Antibiotikarückstände bestimmt werden.

In den untersuchten Gülleproben konnten hauptsächlich Tetracycline und Fluorchinolone nachgewiesen werden. Bei Stoffgruppen sind in Bodenmatrices wenig bzw. nicht mobil, da sie bevorzugt an Kompartimente der Bodenmatrix (s.o.) binden und nicht zu wasserassoziierten Transportmechanismen neigen (Aga et al. 2005; Christl et al. 2016; Du et al. 2021; Leal et al. 2012; Nowara et al. 1997).

Drainagewasserproben des Erftverbandes

Von den 20 Drainagewasserproben des Erftverbandes wurden durch das UKB insgesamt 19 auf Antibiotikarückstände untersucht. Nur in einer einzelnen Probe vom

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

Drainagestandort 2 konnten antibiotische Wirkstoffe oberhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden: Oxytetracyclin (1,0 µg/l), Sulfamerazin (11,0 µg/l) sowie Trimethoprim (3,7 µg/l). Als wahrscheinliche Ursache dieser Einzelbefunde wird ein Fremdwassereinfluss aus einer privaten Kleinkläranlage angesehen. Hier lagen auch Bakterien vor (siehe auch 7.3.2).

Schlussfolgerungen aus der Analyse der Drainagewässer

In den hier untersuchten Drainagewässern von begüllten Feldern konnten keine Antibiotikarückstände nachgewiesen werden. Dies liegt vermutlich an der entsprechenden Bodenpassage, bei der die Stoffe wie o.a. im Boden eher immobilisiert werden. Auf Grund der geringen Probenzahl in Folge der ungewöhnlichen Dürreperiode können allerdings keine generellen Aussagen über den Einfluss von Drainagewässern auf den Eintrag von Antibiotikarückständen in die aquatische Umwelt getroffen werden.

Es wäre jedoch zu beachten bzw. gegebenenfalls zukünftig zu untersuchen, wie groß der Einfluss von direkten Gülle-Abschwemmungen (ohne Bodenpassage) in Gräben und Gewässer nach starken Niederschlägen ist.

7.7 Weiterer Forschungsbedarf

- Die Klärung einer verbesserten angewandten Prozessführung von Gülle, die unter Realbedingungen zu einer Reduktion der Antibiotikaresistenz (Bakterien, Genen) und Antibiotika-Rückständen führen. Ziel ist die Verminderung der Verbreitung durch das Ausbringen der Gülle in die Umwelt.
- Erfassen von Risikopotentialen durch Abschwemmungen bakterieller Kontaminanten und chemischen Wirkstoffen bei Regenereignissen aus der Landwirtschaftsfläche in Oberflächenwasser.
- Überprüfung der physiologischen Stadien von antibiotikaresistenten Bakteriengruppen in Gülleproben nach unterschiedlicher Behandlung (Lagerungszeit, anaerobes Milieu, Fermentation, Kompostierung).
- Einfluss von Reinigungswasser/Fremdwasser in Gülle auf die mikrobielle Zusammensetzung.
- Einfluss der Gülleausbringung auf Grundwasseraquifere in Abhängigkeit von der Bodenmatrix.
- Einfluss der Lagerung von Gülle auf das Vorkommen von Resistenzgenen, antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotikarückstände
- Vorkommen resistenter Bakterien in Stuhlproben von Weidevieh und Landwirten, die gegenüber der Gülle exponiert sind, zur Abklärung der Kolonisation in Abhängigkeit von der Einnahme von Antibiotika.
- Abklärung der Frage, in wieweit die Bakterien in der Gülle nach längerer Lagerung noch lebensfähig sind.

Literatur

- Aga DS, O'Connor S, Ensley S, Payero JO, Snow D, Tarkalson D (2005): Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry. In: Journal of agricultural and food chemistry 53 (18), 7165–7171. DOI: 10.1021/jf050415+.
- Alexander J, Hembach N, Schwartz T (2020): Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany, Nature Scientific Reports, 10, 8952. DOI: 10.1038/s41598-020-65635-4.
- Allam NAT, Sedky D, Mira EK. (2017): The clinical impact of antimicrobial resistance genomics in competition with she-camels recurrent mastitis metabolomics due to heterogeneous *Bacillus licheniformis* field isolates. Vet World 10(11), 1353–1360. DOI: 10.14202/vetworld.2017.1353-1360.
- Alonso CA, Kwabugge YA, Anyanwu MU, Torres C, Chah KF (2017): Diversity of *Ochrobactrum* species in food animals, antibiotic resistance phenotypes and polymorphisms in the blaOCH gene. FEMS Microbiology Letters 364(17). DOI: 10.1093/femsle/fnx178
- Bengtsson-Palme J, Larsson DGJ (2016): Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. Environment international 86, 140–149. DOI: 10.1016/j.envint.2015.10.015.
- Christl I, Ruiz M, Schmidt J R, Pedersen JA (2016): Clarithromycin and Tetracycline Binding to Soil Humic Acid in the Absence and Presence of Calcium. Environmental science & technology 50 (18), 9933–9942. DOI: 10.1021/acs.est.5b04693.
- Collignon P, Beggs JJ, Walsh TR, Gandra S and Laxminarayan R, 2018. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. Lancet Planet Health 2: e398–e405. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30186-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30186-4)
- Dissanayake DRA, Octavia S, Lan R (2014): Population structure and virulence content of avian pathogenic Escherichia coli isolated from outbreaks in Sri Lanka. Veterinary Microbiology 168(2-4), 403–12. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.11.028.
- EMA and EFSA (European Medicines Agency and European Food Safety Authority), 2017. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). EFSA Journal 2017;15(1):4666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4666>
- Exner M, Schmithausen R, Pleischl S, Koch C, Döhla M, Exner D. (2020): Hygienisch-mikrobiologische Risiken sowie Präventions- und Kontrollstrategien in der Trinkwasserversorgung und Abwasserentsorgung im Krankenhaus. Hyg Med 45(1–2), D1–D12.
- Hembach N, Alexander J, Hiller CX, Wieland A, Schwartz T (2019) Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant. *Nature Scientific Reports*, Volume 9, 12843. DOI: 10.1038/s41598-019-49263-1.

Jayarao B, Almeida R and Oliver S, (2019): Antimicrobial resistance on dairy farms. *Foodborne Pathogens and Disease* 16, 1–4. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.29011.edi>

Du H, Du J, Liu F, Zhang Y, Guo H, Wan D (2021): Binding of tetracycline on soil phyllosilicates with Cd(II) as affected by pH and mineral type. *J Soils Sediments* 21 (2), 775–783. DOI: 10.1007/s11368-020-02867-x.

EMA (European Medicines Agency - European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption), 2020. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018 (EMA/24309/2020). Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf.

Gupta S, Sahu C, Nag S, Saha US, Prasad N, Prasad KN. (2019): First report of peritonitis caused by the vancomycin-resistant coccus *Pediococcus pentosaceus* in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Access Microbiology* 1(5), e000007. DOI: 10.1099/acmi.0.000007.

Hamscher G, Sczesny S, Höper H, Nau H (2002): Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 74 (7), 1509–1518. DOI: 10.1021/ac015588m.

Ischiro K. 2010. The Effect of Global Warming on Infectious Diseases (2010): *Public Health Res Perspect* 1(1), 4e9 DOI:10.1016/j.phrp.2010.12.004.

Hu Y, Zhu Y, Ma Y, Liu F, Lu N, Yang X et al. (2015): Genomic insights into intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob Agents Chemother* 59(2), 1152–61. DOI: 10.1128/AAC.04260-14

Kaba HEJ, Kuhlmann E and Scheithauer S, (2020): Thinking outside the box: association of antimicrobial resistance with climate warming in Europe – A 30 country observational study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 223, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.09.008>.

Kehl K, Schallenberg A, Szekat C, Albert C, Sib E, Exner M, Zacharias N, Schreiber C, Parčina M, Bierbaum G. (2022): Dissemination of carbapenem resistant bacteria from hospital wastewater into the environment. *Sci Total Environ.* 806(Pt 4), 151339. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.151339.

Koutsoumanis et al., (2021): EPSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EPSA Journal* 19(6), 6651. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6651

Leal RM Pereira, Figueira RF, Tornisielo VL, Regitano JB (2012): Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. In: *The Science of the total environment* 432, S. 344–349. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.002.

8 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

- Marti R, Scott A, Tien YC, Murray R, Sabourin L, Zhang Y and Topp E, (2013): Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environment Microbiology* 79, 5701–5709. <https://doi.org/10.1128/aem.01682-13>
- Marti R, Tien YC, Murray R, Scott A, Sabourin L and Topp E, (2014): Safely coupling livestock and crop production systems: how rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure? *Applied and Environment Microbiology* 80, 3258–3265. <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-14>.
- More SJ, (2020): European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal production. *Irish Veterinary Journal* 73, 2. <https://doi.org/10.1186/s13620-019-0154-4>.
- Nowara A, Burhenne J, Spittler M (1997): Binding of Fluoroquinolone Carboxylic Acid Derivatives to Clay Minerals. *Journal of agricultural and food chemistry* 45 (4), 1459–1463. DOI: 10.1021/jf960215l.
- Pollard AT, Morra MJ. (2018): Fate of tetracycline antibiotics in dairy manure-amended soils. *Environ. Rev.* 26 (1), 102–112. DOI: 10.1139/er-2017-0041.
- Reid CJ, Cummins ML, Börjesson S, Brouwer MSM, Hasman H, Hammerum AM, Roer L, Hess S, Berendonk T, Nešporová K, Haenni M, Madec JY, Bethe A, Michael GB, Schink AK, Schwarz S, Dolejska M, Djordjevic SP (2022): A role for ColV plasmids in the evolution of pathogenic *Escherichia coli* ST58. *Nat Commun.* 13(1), 683. DOI: 10.1038/s41467-022-28342-4.
- Remus-Emsermann MNP, Schmid M, Gekenidis M-T, Pelludat C, Frey JE, Ahrens CH et al. (2016): Complete genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* P3B5, a candidate for microbial phyllo-remediation of hydrocarbon-contaminated sites. *Stand Genomic Sci* 11(1), 75. DOI: 10.1186/s40793-016-0190-6
- Riaz L, Mahmood T, Khalid A, Rashid A, Ahmed Siddiqe MB, Kamal A, Coyne MS. (2018): Fluoroquinolones (FQs) in the environment: A review on their abundance, sorption and toxicity in soil. *Chemosphere* 191, 704–720. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.092.
- Rolo J, Worning P, Nielsen JB, Bowden R, Bouchami O, Damborg P. et al. (2017): Evolutionary Origin of the Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec). *Antimicrob Agents Chemother* 61 (6), e02302-16 DOI: 10.1128/AAC.02302-16.
- Savin M, Bierbaum G, Hammerl JA, Heinemann C, Parcina M, Sib E et al. (2020): Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *The Science of the total environment* 727, 138788. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138788.
- Shafiq M, Huang J, Shah JM, Wang X, Rahman SU, Ali I et al. (2021): Characterization and virulence factors distribution of *bla*CTX-M and *mcr-1* carrying *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *J Appl Microbiol* 131(2), 634–46. DOI: 10.1111/jam.14994

7 Teilprojekt: Antibiotikaresistenzgene, Antibiotika-resistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern

- Sib E., Lenz-Plet F., Barabasch V., Klanke U., Savin M., Hembach N., Schallenberg A., Kehl K., Albert C., Gajdiss M., Zaccharias N., Müller H., Schmithausen R.M., Exner M., Kreyenschmidt J., Schreiber C., Schwartz T, Parcina M., Bierbaum G. (2020): Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Science of the Total Environment*, 746, 140894. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140894>.
- Siller P, Daehre K, Thiel N, Nübel U, Roesler U. (2020) Impact of short-term storage on the quantity of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broiler litter under practical conditions. *Poultry Science* 99(4), 2125–35. DOI: 10.1016/j.psj.2019.11.043
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K.H., Gützkow, T., Eichler, W., Pühler, A., Schlüter, A. (2009) Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* 155, 2306–2319. DOI: 10.1099/mic.0.028233-0.
- Thaller MC, Borgianni L, Di Lallo G, Chong Y, Lee K, Dajcs J et al. (2011): Metallo-beta-lactamase production by *Pseudomonas otitidis*: a species-related trait. *Antimicrob Agents Chemother* 55(1), 118–123. DOI: 10.1128/AAC.01062-10
- Tien, Y-C., Li B, Scott A, Murray R, Sabourin L, Marti R, Topp E. (2017): Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of the Total Environment* 581-582, 32-39. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.138>.
- Van den Meersche T, van Pamel E, van Poucke C, Herman L, Heyndrickx M, Rasschaert G, Daeseleire E (2016): Development, validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous detection and quantification of five different classes of veterinary antibiotics in swine manure. *Journal of chromatography A* 1429, 248–257. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.12.046
- Wass TJ, Syed-Ab-Rahman SF, Carvalhais LC, Ferguson BJ, Schenk PM. (2019): Complete genome sequence of *Achromobacter spanius* UQ283, a soilborne isolate exhibiting plant growth-promoting properties. *Microbiol Resour Announc* 8(16), e00236-19. DOI: 10.1128/MRA.00236-19
- WHO (World Health Organization) (2020): Technical brief on water, sanitation, hygiene (WASH) and wastewater management to prevent infections and reduce the spread of antimicrobial resistance (AMR). Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240006416>.
- Voigt AM, Skutlarek D, Timm C, Schreiber C, Felder C, Exner M, Faerber HA. (2019): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a fast and simple method for the determination of several antibiotics in different aqueous matrices. *Environ. Chem.* DOI: 10.1071/EN19115.
- Zalewska M, Blazejewska A, Czako A, Popowska M. (2021): Antibiotics and antibiotic resistance genes in animal manure – consequences of its application in agriculture. *Frontiers in Microbiology* 12, 610656. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.610656>.

8 Teilprojekt: Risikoregulatorische Konsequenzen

Projektpartner Umweltbundesamt Bad Elster

Dieser Berichtsteil wurde unter Mitwirkung von Frau Dr. Tamara Grummt[†], ehemals Fachgebietsleiterin II 3.6 - Toxikologie des Trink- und Badebeckenwassers, angefertigt. Frau Dr. Grummt ist am 26.01.2020 verstorben.

8.1 Ausgangspunkt: Derzeitige regulatorische Maßnahmen

Von der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) wird die antimikrobielle Resistenzentwicklung in Anbetracht der damit verbundenen schweren Krankheitsverläufe und der eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten derzeit als eine der größten Herausforderungen für die globale öffentliche Gesundheit angesehen (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>). Es gibt daher weltweit Programme und Strategien zur Eindämmung antimikrobieller Resistenzen (Abb. 1). Global zählen dazu z. B. der "Global action plan on antimicrobial resistance" der WHO, die darauf basierenden Maßnahmenpakete der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) und der Weltorganisation für Tiergesundheit (*World Organisation for Animal Health*, OIE) sowie die Politische Erklärung der Vereinten Nationen zur antimikrobiellen Resistenz.

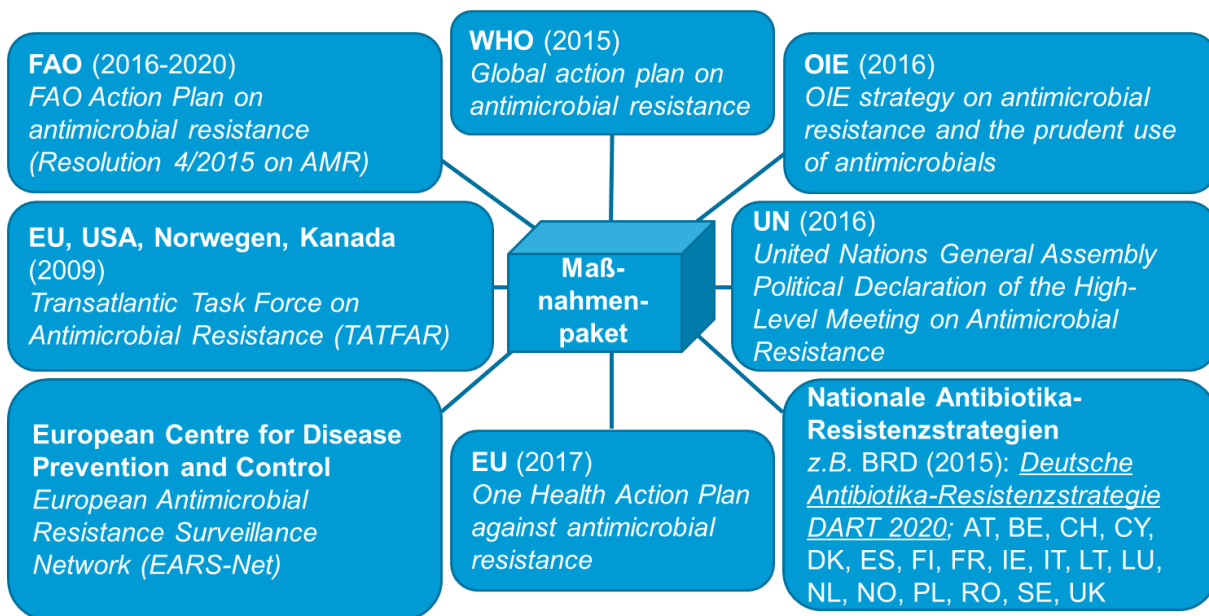


Abbildung 1: Auswahl an weltweiten Strategien zur Eindämmung von Antibiotikaresistenzen

Auf EU-Ebene wurde 2017 basierend auf dem vorherigen Aktionsplan von 2011 der neue "EU One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance" verabschiedet mit dem übergeordneten Ziel eine wirksame Behandlung von Infektionen aufrechtzuerhalten (https://ec.europa.eu/health/amr/antimicrobial-resistance_en). Dabei steht der Begriff "One Health" für eine ganzheitliche Betrachtung der Beziehungen zwischen Mensch, Tier und Umwelt unter Einbeziehung aller Akteure. In dessen Folge wurden die „EU-Leitlinien für die umsichtige Verwendung antimikrobieller Mittel in der Humanmedizin“ (Amtsblatt der Europäischen Union (ABl.) C 212 vom 1.7.2017, S. 1-12), die „Leitlinien für die umsichtige Verwendung von antimikrobiellen Mitteln in der Veterinärmedizin“ (ABl. C 299 vom 11.9.2015, S. 7-26) und die „Verordnung (EU) 2019/6 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. Dezember 2018 über Tierarzneimittel und zur Aufhebung der Richtlinie 2001/82/EG“ (ABl. L 4 vom 7.1.2019, S. 43-167; ABl. L 163 vom 20.6.2019, S. 112; L 326 vom 8.10.2020, S. 15; L 241 vom 8.7.2021, S. 17) sowie die „Verordnung (EU) 2019/4 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. Dezember 2018 über die Herstellung, das Inverkehrbringen und die Verwendung von Arzneimitteln, zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 183/2005 des

Europäischen Parlaments und des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 90/167/EWG des Rates“ (ABl. L 4 vom 7.1.2019, S. 1-23) verabschiedet. Die „Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht““ (ABl. L 84 vom 31.3.2016, S. 1-208) und der „Beschluss Nr. 1082/2013/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Oktober 2013 zu schwerwiegenden grenzüberschreitenden Gesundheitsgefahren und zur Aufhebung der Entscheidung Nr. 2119/98/EG“ (ABl. L 293 vom 5.11.2013, S. 1–15) finden für Antibiotikaresistenzen Anwendung. Die Überwachung und Meldung antimikrobieller Resistenzen wird durch den „Durchführungsbeschluss (EU) 2020/1729 der Kommission vom 17. November 2020 zur Überwachung und Meldung von antimikrobieller Resistenz bei zoonotischen und kommensalen Bakterien und zur Aufhebung des Durchführungsbeschlusses 2013/652/EU“ (ABl. L 387 vom 19.11.2020, S. 8-21) geregelt.

Durch das Projekt *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption* (ESVAC, Projektstart: 2009) erfolgt die jährliche Berichterstattung zur Antibiotikaverwendung in der Tiermedizin derzeit in 31 europäischen Ländern (EMA 2020).

Mit der Strategie „Vom Hof auf den Tisch“, welche 2020 von der Europäischen Kommission angenommen wurde, soll bis zum Jahr 2030 eine 50 %-ige Reduktion der Gesamtverkäufe an antimikrobiellen Mitteln für Nutztiere und in der Aquakultur erreicht werden (Europäische Kommission 2020).

Gemäß Artikel 12 Absatz 1 der Richtlinie 91/271/EWG¹, wonach „[...] gereinigtes Abwasser [...] nach Möglichkeit wiederverwendet werden [soll]“ und dabei „[...] Belastungen der Umwelt auf ein Minimum zu begrenzen [sind]“, werden für die Verwendung von behandeltem kommunalem Abwasser für die landwirtschaftliche Bewässerung in der „Verordnung (EU) 2020/741 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Mai 2020 über Mindestanforderungen an die Wasserwiederverwendung“ (ABl. L177 vom 5.6.2020, S. 32-55) Antibiotikaresistenzen unter Anhang II B. „Bedingungen für die zusätzlichen Anforderungen“ adressiert.

Auf nationaler Ebene wurde zur Minimierung von Antibiotikaresistenzen von den Bundesministerien für Gesundheit; für Ernährung und Landwirtschaft sowie für Bildung und Forschung die Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie „DART 2020“ erstellt, die im Jahr 2015 verabschiedet wurde (Beschluss des Bundeskabinetts vom 13. Mai 2015; <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/antibiotika-resistenzen/antibiotika-resistenzstrategie.html>). Im Zuge der Umsetzung von „DART 2020“ wurden die „Zweite Verordnung zur Änderung der Verordnung über tierärztliche Hausapotheken vom 21. Februar 2018“ (Bundesgesetzblatt (BGBl.) I S. 213-216; Inkrafttreten 01.03.2018) sowie das „16. Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes vom 10. Oktober 2013“ (BGBl. I S. 3813-3819; Inkrafttreten: 1. April 2014) erlassen.

Hierbei besteht für Tierärzte u. a. ein Umwidmungsverbot für bestimmte Antibiotika (Cephalosporine der dritten oder vierten Generation; Fluorchinolone), die Erstellungspflicht

¹ Richtlinie des Rates vom 21. Mai 1991 über die Behandlung von kommunalem Abwasser (91/271/EWG), geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1137/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Oktober 2008.

eines Antibiogramms und allgemeine Nachweispflichten vor dem Tierarzneimiteleinsetz. Auch die Methodik der Probennahme, die Isolierung bakterieller Erreger und die Empfindlichkeitsbestimmung werden geregelt.

Die verpflichtende Meldung der Therapiehäufigkeiten durch Mastbetriebe bei Mastferkeln, Mastschweinen, Mastputen, Masthühnern, Mastkälbern und Mastrindern wurde durch die 16. AMG-Novelle eingeführt. Durch das Antibiotikamonitoring inklusive der daraus abgeleiteten möglichen Konsequenzen (z. B. Maßnahmenplan bei Überschreitung der bundesweit ermittelten Kennzahlen (Benchmarking-System)) wird die Antibiotikaminimierung als Aufgabe des Tierhalters herausgestellt. Die systematische Überprüfung des Antibiotikaeinsatzes ermöglicht zunehmend, Ursachen zu identifizieren und erweitert dafür die Befugnisse der Tierarzneimittelüberwachung

(https://www.bmel.de/DE/Tier/Tiergesundheit/Tierarzneimittel/_texte/Antibiotika-Dossier.html?docId=2661834).

Aufgrund der Resultate aus der Evaluierung des Antibiotikaminimierungskonzeptes der 16. AMG-Novelle (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) 2019) wurden im „Siebzehnten Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes“ vom 10.08.2021 (BGBl. I 2021 S. 3519; Inkrafttreten: 01.11.2021) u. a. die Mitteilungsverpflichtungen der Nutztierhalter um die Meldung der Nichtanwendung antibakteriell wirksamer Arzneimittel ergänzt und die dem Bundesinstitut für Risikobewertung zu übermittelten Daten für eine Risikobewertung bezüglich der Antibiotikaresistenz sowie der hierzu jährlich zu erstellende Bericht geregelt (Deutscher Bundestag 2021).

Zur Durchführung der „Verordnung (EU) 2019/6 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. Dezember 2018 über Tierarzneimittel und zur Aufhebung der Richtlinie 2001/82/EG“ (ABl. L 4 vom 7.1.2019, S. 43; L 163 vom 20.6.2019, S. 112; L 326 vom 8.10.2020, S. 15; L 241 vom 8.7.2021, S. 17) wurde das „Gesetz über den Verkehr mit Tierarzneimitteln und zur Durchführung unionsrechtlicher Vorschriften betreffend Tierarzneimittel (Tierarzneimittelgesetz – TAMG)“ beschlossen und hierfür das „Gesetz zum Erlass eines Tierarzneimittelgesetzes und zur Anpassung arzneimittelrechtlicher und anderer Vorschriften vom 27. September 2021“ verabschiedet, welches am 28.01.2022 in Kraft getreten ist.

8.2 Zielstellung

Der "EU One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance" (https://ec.europa.eu/health/amr/antimicrobial-resistance_en) sieht eine stärkere Berücksichtigung der Rolle der Umwelt vor sowie die Entwicklung von Risikobewertungsmethoden bezüglich der humanen und tierischen Gesundheit. Bisher standen einer fundierten Entscheidungsfindung Wissenslücken, u. a. hinsichtlich des Eintrages und der Ausbreitung von Resistenzen über das Abwasser und der damit verbundenen Auswirkungen auf das Rohwasser, entgegen. Anhand der im Forschungsprojekt HyReKA gewonnenen Datenbasis zur Antibiotikaresistenz-Dynamik und dem damit verbundenen Erkenntnisgewinn ist es nun möglich, Risikopotenziale zu erkennen und hieraus entsprechende Konsequenzen für einen umweltbezogenen Gesundheitsschutz der Bevölkerung abzuleiten.

8.3 Risikoregulatorische Konsequenzen

Die Ergebnisse des Forschungsprojektes belegen die Notwendigkeit einer Strategie zur Minimierung und Vorbeugung des Eintrages von fakultativ-pathogenen Bakterien und deren Antibiotikaresistenzgenen, multiresistenten Bakterien und Antibiotikarückständen in die Umwelt. Dabei umfasst eine Risikoregulierung (Abb. 2) nach der von der Risikokommission (2003) vorgeschlagenen Verfahrensweise die folgenden Schritte:

- Das Vorverfahren, d. h. eine Problemeingrenzung zur Klärung der Rahmenbedingungen, welche u. a. die Früherkennung von Risiken und eine Prioritätensetzung beinhaltet;
- die Risikoabschätzung zur Identifizierung der Gefährdungspotenziale und zur quantitativen Erfassung des Risikos,
- die Risikobewertung als Schnittstelle zwischen Risikoabschätzung und Risikomanagement sowie
- das Risikomanagement, im Zuge dessen Maßnahmeoptionen identifiziert und bewertet werden.

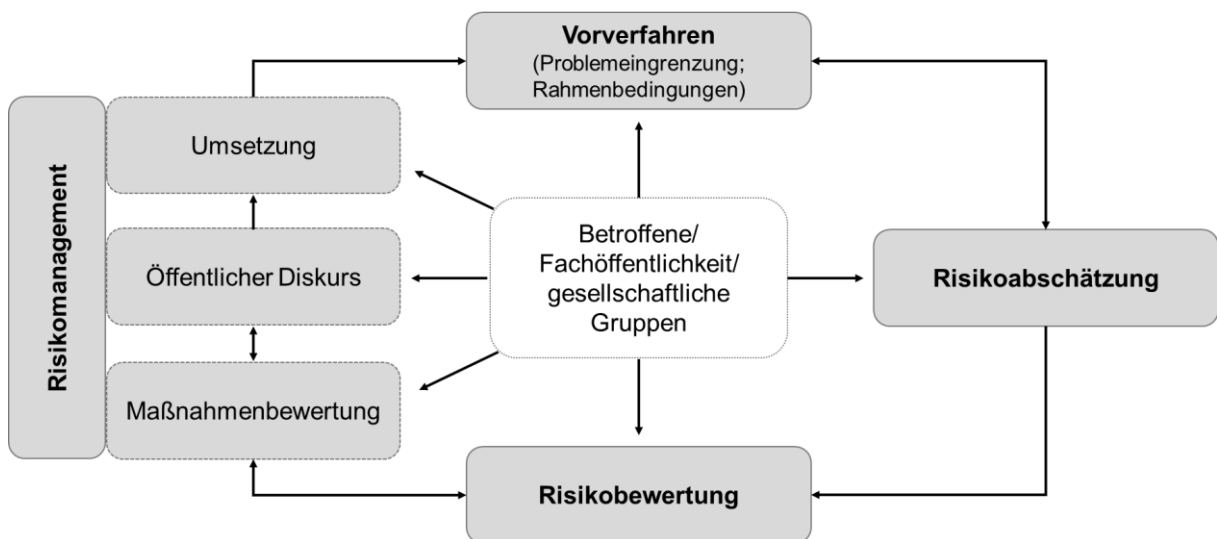


Abbildung 2: Prozess der Risikoregulierung (Risikokommission 2003).

8.3.1 Risikoabschätzung und Risikobewertung im Verbundprojekt HyReKA

Die Identifizierung von Gefährdungspotenzialen im Zuge der Risikoabschätzung erfolgte in HyReKA über die Detektion der Bakterienspezies, die Bestimmung der molekularen Resistenzmechanismen und die chemisch-analytische quantitative Bestimmung von Antibiotikarückständen. Dabei wurden zur Bestimmung der Resistenzen Kultivierungsverfahren sowie kulturunabhängige, molekularbiologische Nachweise verwendet. Das dabei in HyReKA entwickelte **Methodenkompodium** sollte nach Validierung der Methoden für zukünftige Untersuchungen und anstehende Monitoringprogramme eine Grundlage darstellen, um Gefährdungspotenziale zu erkennen.

Eine quantitative Risikobewertung ist anhand der Projektergebnisse nicht möglich, sondern eine Risikoabschätzung mit dem Ziel einer **Risikominimierung entsprechend dem sogenannten ALARA-Prinzip** (*As Low As Reasonably Achievable*).

An dieser Stelle sind vor allem präventive Maßnahmen, wie z. B. Aufklärung und Information bezüglich des sachgerechten Antibiotikaeinsatzes in der Human- und Veterinärmedizin, als auch der korrekten Entsorgung von Antibiotikaresten, und die Qualifizierung von Tierhaltern und Tierhalterinnen sowie Tierärzten und Tierärztinnen zur Gesunderhaltung von Nutztierbeständen wichtig, damit dort der Einsatz von Antibiotika und die Ausbreitung resistenter Mikroorganismen wirkungsvoll reduziert wird (Vidaurre et al. 2016).

Die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse zu den Hotspots und der Abundanz von antibiotikaresistenten Bakterien, deren Resistenzgenen und dem Vorhandensein von Antibiotikarückständen lassen eine **Prioritätensetzung für die Risikoregulierung** zu. Hierbei wurden als Eintragspfade für Antibiotikarückstände und multiresistente Keime bzw. deren Resistenzgene in das Kanalnetz:

- Klinikabwässer (Müller et al. 2018, Schreiber et al. 2019, Voigt et al. 2020)
- Schlachthofabwässer (Savin et al. 2020a, Savin et al. 2020b)
- kommunale Abwässer aus Siedlungsgebieten (häusliche Abwässer; Müller et al. 2018) sowie
- Flugzeugabwässer (Heß et al. 2019) ermittelt,

als direkte Eintragspfade in Oberflächengewässer:

- Kläranlagenabläufe (v. a. über konventionell behandeltes Abwasser (Alexander et al. 2019 und 2020, Hembach et al. 2017 und 2019, Müller et al. 2018)) (siehe hierzu auch „Teilprojekt: Kommunale Kläranlagen, Eliminationsverfahren“)
- Mischwasserentlastungen (über unbehandeltes Rohabwasser infolge von Starkregenereignissen (siehe hierzu die Berichtsabschnitte „Teilbereich: Kanalisationsüberläufe als Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien“, „Teilbereich: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung“ und „Teilbereich: Relevanz verschiedener urbaner Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt“ sowie unter Punkt „Maßnahmen zur Eintragsminderung aus Mischwasserentlastungen“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes)) und
- Niederschlagseinleitungen der Trennkanalisation (Regenbeckenauslass (infolge von Fehlan schlüssen und Abschwemmungen versiegelter Flächen); siehe „Teilbereich: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung“, Schreiber et al. 2019)).

Weiterhin wurden Tiermastbetriebe (Schweine und Geflügel) als Reservoir für Antibiotikaresistenzen aufgezeigt (23 % der untersuchten Proben waren kulturell auffällig, aber es wurden keine 4MRGN festgestellt (siehe hierzu den Berichtsabschnitt „Landwirtschaftliche Nutztierhaltung und Abwässer aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes)).

Als kritisch anzusehen ist sowohl die Verwendung des von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für die Humanmedizin als Reserveantibiotika gelisteten Polymyxins Colistin (WHO 2019) zur Bestandsbehandlung als auch der Einsatz des Fluorchinolons Enrofloxacin, da die Auswirkungen einer Resistenz gegen als besonders wichtig für die Humanmedizin klassifizierte Wirkstoffklassen besonders schwer wiegen (z. B. Polymyxine zur Behandlung besonders schwerer Infektionen mit multiresistenten gramnegativen Keimen, WHO 2019). Colistin wurde in drei der 40 Betrieben drei Monate vor der Probenahme verwendet (siehe hierzu den Berichtsabschnitt „Landwirtschaftliche Nutztierhaltung und Abwässer aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes) und ein Anteil an colistinresistenten Isolaten von 16,3 % wurde in den Gülleproben des FNC detektiert (siehe hierzu den Berichtsabschnitt „Antibiotikaresistenzgene, antibiotikaresistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern“). Enrofloxacin, ein Antibiotikum der Veterinärmedizin mit breitem antibakteriellem Wirkspektrum, kam drei Monate vor der Probenahme in einem der 40 Betrieben zum Einsatz (siehe hierzu den Berichtsabschnitt „Landwirtschaftliche Nutztierhaltung und Abwässer aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes) und wurde in 38 % der Schweinegülleproben nachgewiesen - in Konzentrationen oberhalb der nach Bengtsson-Palme und Larsson (2016) dargestellten minimalen selektiven Konzentration (*Predicted No Effect Concentrations for resistance selection* ($PNEC_{resistance\ selection}$)), Großteils auch oberhalb der minimalen Hemm-Konzentration (*Minimal Inhibitory Concentrations (lowest MIC)*); Bengtsson-Palme und Larsson 2016; siehe hierzu den Berichtsabschnitt „Antibiotikaresistenzgene, antibiotikaresistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern“). Enrofloxacin wird in mehreren Tierspezies zu Ciprofloxacin metabolisiert (López-Cadenas et al. 2013), welches, wie auch Enrofloxacin selbst, bereits in niedrigen Dosen aktiv ist. Nach Bengtsson-Palme und Larsson (2016) liegen die $PNEC_{resistance\ selection}$ für Enrofloxacin bei 1,0 µg/l bzw. für Ciprofloxacin bei 0,064 µg/l, sodass schon geringe Rückstände die Selektion resistenter Bakterien fördern. So wurde bei Voigt et al. (2020) eine positive Assoziation zwischen der Ciprofloxacin-Konzentration und dem Vorhandensein von multiresistenten Erregern in Abwässern ermittelt.

Aufgrund der im Verbundvorhaben ermittelten Ergebnisse lässt sich feststellen, dass

- insbesondere **Klinikabwässer** (Teilströme, Stationen mit hohem Antibiotikaverbrauch; stärkster Hotspot für 3MRGN und 4MRGN; Emission kritischer Antibiotikaresistenzen (z. B. gegen Carbapenem (*bla*NDM-1) oder Vancomycin (*vanA*)) sowie die höchsten Antibiotikarückstandskonzentrationen mit deutlicher Erhöhung des Selektionsdruckes für Antibiotikaresistenzen (Voigt et al. 2019) in höheren Frachten als Siedlungsgebiete; hohe Erreger-Dichte; starke Korrelation zwischen fakultativ-pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen gegen Reserveantibiotika; Nachweis von Colistin-resistenten Isolaten (siehe Müller et al. 2018, Schreiber 2019, Alexander et al. 2019 und 2020, Sib et al. 2019 und 2020, Voigt et al. 2020, Berichtsabschnitt „Antibiotikaresistenzgene, antibiotikaresistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes)) und auch

- **Schlachthofabwässer** (ubiquitäres Vorkommen der ESKAPE-Bakterien mit Resistenzen gegen „*Highest Priority Critically Important Antimicrobials*“ und der ESBL-produzierenden *E. coli*; Betriebe der Geflügelverarbeitung als stärkster Hotspot für Colistinresistenz (*mcr-1*) (siehe Savin et al. 2020a, Savin et al. 2020b))

Schwerpunktemittenten darstellen, die zu einer erhöhten Belastung in der nachgeschalteten Kanalisation und den Kläranlagen führen. Dies ist insbesondere von Bedeutung im Hinblick auf die teils unzureichende Eliminierung von Bakterien, Resistenzgenen und Antibiotikarückständen in **Kläranlagen mit konventioneller Abwasserbehandlung** und hinsichtlich des unmittelbaren Eintrages unbehandelten Rohabwassers in Gewässer infolge der Mischwasserentlastungen. Beispielsweise zeigte sich, dass in Abwässern für einige untersuchte Antibiotika die detektierten Höchstkonzentrationen über den minimalen selektiven Konzentrationen lagen (Piperacillin, Meropenem) oder diese erreichten (Chinolone; Schuster et al., submitted), Resistenzgene und fakultativ-pathogene Bakterien in signifikanten Konzentrationen sowie multiresistente Bakterien in den Kläranlagenabläufen nachweisbar waren (Müller et al. 2018, Hembach et al. 2019, Schreiber et al. 2019). Zudem lag eine erhöhte Abundanz an Resistenzen gegen Reserveantibiotika in gereinigtem Abwasser v. a. bei Klinikbeeinflussung, aber auch bei Schlachthofbeeinflussung vor (Hembach et al. 2017; Alexander et al. 2019 und 2020). Weiterhin waren fakultativ-pathogene Bakterien im aufnehmenden Oberflächengewässer langfristig nachweisbar (siehe Punkt „Nachweis von fakultativ-pathogenen Bakterien im Vorfluter“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes). Kläranlagen mit konventioneller Abwasserbehandlung stellen demnach direkte Emittenten für Antibiotikaresistenzen und Antibiotikarückstände in die Umwelt dar.

Mischwasserentlastungen können ebenfalls für einen bedeutenden Eintrag von Resistenzen, fakultativ-pathogenen Bakterien und Antibiotikarückständen in die Umwelt verantwortlich sein (siehe hierzu die Berichtsabschnitte „Teilbereich: Kanalisationsüberläufe als Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien“, „Teilbereich: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung“ und „Teilbereich: Relevanz verschiedener urbaner Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt“). Dies zeigen vor allem Modellierungen im Rahmen des HyReKA-Projektes.

Weiterhin wurden im Gewässerverlauf mit zunehmendem Siedlungseinfluss höhere Konzentrationen an resistenten Bakterien wie auch anderen Krankheitserregern detektiert (Müller et al. 2018, Schreiber et al. 2019).

In **kommunalen Abwässern aus Siedlungsgebieten (häusliche Abwässer)** waren die detektierten Werte für 4MRGN, MRSA und VRE deutlich geringer als in klinischen Abwässern (Müller et al. 2018, Schreiber et al. 2019). Jedoch sind die Gesamtfrachten in das Kanalnetz aufgrund der im Vergleich größeren Abwassermengen höher (siehe hierzu „Teilbereich: Relevanz verschiedener urbaner Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes).

Auch wenn im Fall der **Flugzeugabwässer** ein starker Verdünnungseffekt zu verzeichnen ist, sodass statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen Proben kommunaler Kläranlagenzuläufe mit und ohne Flugzeugabwasserbeeinflussung festgestellt wurden, sind diese aufgrund ihrer großen Vielfalt an Resistenzgenen als kritisch anzusehen, da hierdurch

zusätzliche Resistenzgene in das bereits vorhandene Abwasser-Resistom eingetragen werden (Heß et al. 2019).

In **Gülle** waren mittels Kulturverfahren zwar eher wenig antibiotikaresistente Bakterien nachweisbar (hinsichtlich multiresistenter Erreger insbesondere 3MRGN-Pip; aber keine 4MRGN; Berichtsabschnitt „Antibiotikaresistenzgene, antibiotikaresistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern“), jedoch wurden mittels molekularbiologischer Methoden das Vorhandensein von fakultativ-pathogenen Bakterien, u. a. intestinale Enterokokken, *P. aeruginosa* und *E. coli*, sowie das Vorliegen einer Vielzahl an Resistenzgenen detektiert (z. B. klinisch relevante Resistenzgene mit häufigem Nachweis: *bla*_{CTX-M-32} (Cephalosporin-Resistenz der 2. Generation), *vanA* (Vancomycin-Resistenz), *mcr-1* (Colistin-Resistenz), *bla*_{KPC-3} (Carbapenem-Resistenz), *mecA* (Methicillin-Resistenz), *qnrS* (Chinolon-Resistenz); weitere in hohen Abundanzen nachgewiesene Resistenzgene: *tetM* (Tetracyclin-Resistenz), *su1* (Sulfonamid-Resistenz), *ermB* (Erythromycin-Resistenz), *bla*_{TEM} (Ampicillin-Resistenz, *aac(6')Ie-aph(2'')*-Ia (Gentamicin-Resistenz); siehe hierzu den Berichtsabschnitt „Antibiotikaresistenzgene, antibiotikaresistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern“). Zudem wiesen die Gülleproben Antibiotikarückstände auf (insbesondere Doxycyclin, Enrofloxacin und Tetracyclin); teils in Konzentrationen oberhalb der jeweiligen nach Bengtsson-Palme und Larsson (2016) aufgeführten minimalen selektiven Konzentrationen (*PNEC_{resistance selection}*) oder minimalen Hemm-Konzentrationen (*Minimal Inhibitory Concentrations* (lowest MIC); siehe hierzu den Berichtsabschnitt „Antibiotikaresistenzgene, antibiotikaresistente Erreger und Antibiotikarückstände in Gülle aus der Schweinetiermast und in Drainagewässern“).

Somit handelt es sich bei Gülle, welche als Wirtschaftsdünger ausgebracht wird, um eine Quelle des direkten Eintrages von Antibiotikarückständen und Resistenzgenen in die Umwelt. Durch Abschwemmungen ist es möglich, dass diese auch in die aquatische Umwelt verbreitet werden (Barrios et al. 2020). In der Gesamtbetrachtung liegt ein Risikopotenzial vor.

Die untersuchten **Drainagewasser**proben wiesen ebenfalls Resistenzgene (u. a. *ermB*, *su1*, *tetM*, *bla*_{TEM}) und laut molekularbiologischem Nachweis fakultativ-pathogene Bakterien auf, jedoch in deutlich geringerer Abundanz als in den jeweiligen Gülleproben. Antibiotikarückstände wurden in den untersuchten Drainagewasserproben nicht detektiert. Aufgrund der geringen Probenanzahl an Drainagewässern in Folge der geringen Niederschlagsereignisse können keine allgemeingültigen Aussagen zu der Belastung von Drainagewässern und deren Einfluss auf die Antibiotikaresistenzverbreitung getroffen werden.

Aus dieser Sachlage heraus (Kenntnisse zu den Hotspots und der Abundanz von antibiotikaresistenten Bakterien, deren Resistenzgenen und dem Vorhandensein von Antibiotikarückständen) ergeben sich regulierungsbedürftige Parameter, mit der Konsequenz entsprechende Maßnahmen abzuleiten.

8.3.2 Risikomanagement: Maßnahmeoptionen, einschließlich der Ansätze zur möglichen rechtlichen Umsetzung

präventive Maßnahmen

Reduktion des Einsatzes von Antibiotika bei Nutztieren:

In Tiermastbetrieben wurden resistente Bakterien sehr selten isoliert, wenn in den drei Monaten vor der Probennahme kein Antibiotikaeinsatz erfolgte. Zudem beeinflussten die Haltungsform, das Betriebsmanagement und die Kenntnisse zur Gesunderhaltung / zu Hygienemaßnahmen die Antibiotikaverwendung (siehe hierzu Punkt „Landwirtschaftliche Nutztierhaltung und Abwässer aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes). Somit ist ein umsichtiger, sachgerechter, verantwortungsbewusster und somit restriktiver Einsatz von Antibiotika, wie auch eine artgerechte, krankheitsvermeidende Tierhaltung und ein geeignetes Gesundheitsmanagement notwendig, um der Entstehung und Verbreitung von Resistenzen vorzubeugen. Dies ist auch im Hinblick des Vorhandenseins von Antibiotikarückständen in der Gülle und des damit über die Gülleausbringung verbundenen direkten Eintrages von Antibiotikarückständen und Resistenzgenen in die Umwelt von Bedeutung.

Hierfür ist eine adressatengerechte Aufklärung, Information und Kommunikation notwendig (siehe in diesem Zusammenhang z. B. Vidaurre et al. 2016 und unter www.uba.de/tierarzneimittel).

Präventive Maßnahmen in Flugzeugen:

In Flugzeugen sind Maßnahmen angeraten, die zu einer Verbesserung der hygienischen Situation auf den Flugzeugtoiletten führen (Größe des Toilettenraumes, Vorhandensein von Toilettendeckel, Waschbeckenausstattung neben Seifenlösung auch Desinfektionslösung zur Händedesinfektion).

Maßnahmen zur Reduktion des Risikopotenzials von Gülle

Die restriktive, gezielte und verantwortungsvolle Anwendung von antibiotischen Wirkstoffen in der Nutztierhaltung und eine bedarfsgerechte Düngung sowie eine Hygienisierung der Gülle dürften zu einer Verringerung des Eintrages von Antibiotikarückständen, Resistenzgenen und antibiotikaresistenten Bakterien in die Umwelt beitragen.

Gezielte dezentrale Abwasserbehandlung

Für Abwasser von Schwerpunktemittenten (hochbelastete Abwasserteilströme von Kliniken [z. B. bestimmte Klinikstationen mit hohem Antibiotikaverbrauch], Schlachthofabwässer) und für hochbelastetes Flugzeugabwasser sollte, gerade bei Vorliegen des Mischsystems, eine effektive dezentrale Abwasserbehandlungen vor der Einleitung in das Kanalnetz erfolgen, um den Eintrag und die Verbreitung von Resistenzen in Kläranlagen und in Gewässern (direkte Einleitung durch Mischwasserentlastungen) möglichst zu unterbinden bzw. gering zu halten. Es konnte beispielsweise in Abwässern mit Klinikbeeinflussung eine positive Assoziation zwischen den vorhandenen Konzentrationen an Ciprofloxacin, Meropenem bzw. Ceftazidim und der Nachweiswahrscheinlichkeit von antibiotikaresistenten Bakterien (*P. aeruginosa* 3GCR) festgestellt werden (Voigt et al. 2020). Schlachtbetriebsinterne Kläranlagen führten

mitunter zu keiner ausreichenden Abwasserbehandlung, sodass hier zusätzliche bzw. alternative Verfahren notwendig sind (Savin et al. 2020a). Erfolgte z. B. für das Abwasser von Geflügelschlachthöfen eine Ultrafiltration und Ozonung, dann sank die Gesamtkeimbelastung um 4-6 log-Stufen (siehe Punkt „Landwirtschaftliche Nutztierhaltung und Abwässer aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes).

Die geringeren zu behandelnden Abwasservolumina im Vergleich zu einer zentralen Weiterbehandlung sind vorteilhaft, da hier Kostenersparnisse bezogen auf die Gesamtkosten erzielt werden können (siehe Punkt „Behandlung dezentraler Abwasserströme (Krankenhausabwasser)“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes).

Für eine regulative Umsetzung müssten hierfür Screening-Indikatoren und entsprechende Grenzwerte für Antibiotikarückstände, antibiotikaresistente Bakterien bzw. Resistenzgene bezüglich der Einleitung des dezentral gereinigten Abwassers in das öffentliche Kanalnetz konsentiert werden.

Als Screening-Indikatoren für Antibiotikarückstände eignen sich nach den Ergebnissen aus HyReKA z. B.

- für klinische Abwässer Carbapeneme (insbesondere Meropenem), Fluorchinolone (insbesondere Ciprofloxacin), Tetracycline, Tylosin, Sulfonamide, Piperacillin, Ceftazidim und Vancomycin (Voigt et al. 2019, Voigt et al. 2020),
- für Schlachthofabwässer z. B. Tetracycline;

für Resistenzen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *E. faecium* sowie die Antibiotikaresistenzgene gegen Carbapeneme (*bla*NDM-1, *bla*KPC, *bla*VIM, *bla*OXA48), Colistin (*mcr*-1 bzw. *mcr*-1 bis 9 für den veterinären Bereich) und Vancomycin (*van*A/B).

Laut den HyReKA-Untersuchungen eignen sich für ein regelmäßiges Monitoring ESBL-produzierende *E. coli* aufgrund ihres häufigen Vorkommens. Die Aufnahme entsprechender Bestimmungen wäre dabei in der „Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung – AbwV)“² zu berücksichtigen. Vorschläge zu geeigneten dezentralen Verfahren sind dem Synthesebericht unter dem Punkt „Behandlung dezentraler Abwasserströme (Krankenhausabwasser)“ zu entnehmen (Membranbioreaktor, Dosierung von Pulveraktivkohle (PAK), nachgeschaltete Ozonung oder eine nachgeschaltete Filtration mittels granulierter Aktivkohle) wie auch unter „Kliniken und andere medizinische Einrichtungen“ (z. B. thermische Siphons).

Zentrale Abwasserbehandlung – Kläranlagen

Aufgrund der im Projekt ermittelten teils unzureichenden Eliminierung von Keimen, Resistenzgenen und Antibiotikarückständen in Kläranlagen mit konventioneller Abwasserbehandlung sind Maßnahmen angezeigt, die zu einer Minimierung der entsprechenden Last führen; gemäß § 41 des IfSG, wonach „[d]ie Abwasserbeseitigungspflichtigen [...] darauf hinzuwirken [haben], dass Abwasser so beseitigt

² „Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung – AbwV)“ (vom 17. Juni 2004, BGBl. I S. 1108-1184, zuletzt geändert am 6. März 2020, BGBl. I S. 485-486).

wird, dass Gefahren für die menschliche Gesundheit durch Krankheitserreger nicht entstehen“.

Maßnahmen wären **in den folgenden, priorisierten Fällen** zutreffen:

- Die Abwässer werden durch Schwerpunktemittenten (wenn keine entsprechende, effektive dezentrale Abwasserbehandlung vorliegt) signifikant beeinflusst:
 - 1) Klinikabwässer (Teilströme; Kliniken mit hoher Bettenzahl; Universitätskliniken)
 - 2) Schlachthofabwässer
 - 3) Flugzeugabwässer,
- Der Vorfluter stellt ein sensibles Gewässer dar, gerade wenn Schutzgüter wie Badegewässer, Freizeitaktivitäten, Trinkwassergewinnung, Landwirtschaft (Bewässerung) betroffen sind.
- Es liegt eine sehr große Kläranlage vor, da auch häusliche Abwässer aufgrund des hohen Volumenstroms zur Belastung mit antibiotikaresistenten Bakterien bzw. Antibiotikarückständen beitragen (auch für Kläranlagen ohne Beeinflussung durch Klinikabwässer oder Abwässer lebensmittelverarbeitender Betriebe wurde ein Zusammenhang zwischen Kläranlagenausbau und der Fracht an Antibiotikaresistenzen und Bakterien festgestellt (höchste Emission an fakultativ-pathogenen Bakterien bei Kläranlage mit dem größten Ablaufvolumen (Alexander et al. 2019 und 2020))
- oder es zeigen sich Kläranlagen mit hohen Belastungen an fakultativ-pathogenen Bakterien, Multiresistenzen und Resistenzen gegen Reserveantibiotika im Auslauf (Hembach et al. 2017, Alexander et al. 2020). Handlungsbedarf besteht insbesondere, bei Vorliegen von Resistenzen gegen Carbapeneme, Colistin und Vancomycin in Bakterien der ESKAPE-Gruppe sowie bei Multiresistenz (4MRGN).

Als **Handlungsoption** für eine verbesserte Reduktion der Last an Resistenzen und Antibiotikarückständen ist eine **technische Aufrüstung** solcher, priorisierter Kläranlagen anzuraten, wobei insbesondere Maßnahmen zu empfehlen sind, die zugleich zu einer Reduktion von Spurenstoffen/Mikroplastik führen. Anhand der Projektergebnisse sind dies Kombinationen aus Membranverfahren (Ultrafiltration), Ozonbehandlung und adsorptive Verfahren (z. B. Kombination aus Ozonung mit Aktivkohlefiltration und anschließender Membranfiltration (Jäger et al. 2018, Hembach et al. 2019, Hiller et al. 2019) (wobei zu beachten ist, dass das Retentat eine erhöhte Belastung an Antibiotikaresistenzen und fakultativ-pathogenen Bakterien aufweist (Hembach et al. 2019, Hiller et al. 2019)).

Hierzu wäre eine Verankerung entsprechender Maßgaben zu Antibiotikaresistenzen und Antibiotikarückständen auf EU-Ebene in der „Richtlinie 91/271/EWG über die Behandlung von kommunalem Abwasser“³ und national in der „Verordnung über Anforderungen an das

³ „Richtlinie 91/271/EWG des Rates vom 21. Mai 1991 über die Behandlung von kommunalem Abwasser“ (ABl. L 135 vom 30.5.1991, S. 40-52).

Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung – AbwV)⁴ ratsam, sodass deren Emission zukünftig in den abwasserrechtlichen Vorschriften geregelt sind.

Hierfür müssten entsprechende Grenzwerte für antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotikarückstände sowie Indikatoren festgesetzt werden. Im Hinblick auf das Vorhandensein von Antibiotikarückständen eignen sich anhand der Projektergebnisse Nachweise der folgenden Antibiotika im Abwasser: Carbapeneme (im klinischen Abwasser insbesondere Meropenem), Fluorchinolone (im klinischen Abwasser insbesondere Ciprofloxacin), Tetracycline und Tylosin, optional Sulfonamide. Die HyReKA-Resultate zeigen, dass im klinischen Abwasser weiterhin Piperacillin, Ceftazidim und Vancomycin von Bedeutung sind (Voigt et al. 2019, Voigt et al. 2020).

Zur regelmäßigen **Beurteilung der Reinigungsleistung und der Ablaufqualität kommunaler Kläranlagen** sind nach den Ergebnissen aus HyReKA ESBL-produzierende *E. coli* aufgrund ihres häufigen Vorkommens geeignet. Als weitere Überwachungsparameter für eine detailliertere Untersuchung bieten sich laut den Resultaten aus HyReKA für Antibiotikaresistenzen die Mikroorganismen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *E. faecium* (kultureller Nachweis) sowie die Antibiotikaresistenzgene gegen Carbapeneme (*bla*NDM-1, *bla*KPC, *bla*VIM, *bla*OXA48), Colistin (*mcr*-1; wenn Beeinflussung durch veterinären Bereich: *mcr*-1 bis 9) und Vancomycin (*van*A/B; molekularbiologische Screening-Indikatoren) an.

Weiterhin sind die HyReKA-Ergebnisse bezüglich des gereinigten kommunalen Abwassers im Hinblick auf dessen Verwendung für die landwirtschaftliche Bewässerung von Bedeutung. Gemäß der „Verordnung (EU) 2020/741 über Mindestanforderungen an die Wasserwiederverwendung“ unter Anhang II, B.6.f⁵ sollten dementsprechend zusätzliche Anforderungen an die Wasserqualität des gereinigten kommunalen Abwassers für die landwirtschaftliche Bewässerung und an die entsprechende Überwachung formuliert werden.

Technische Aufrüstung/Verbesserungen der Mischkanalisation

Nach den Ergebnissen von HyReKA sind bei Vorliegen einer **Mischkanalisation** technische Maßnahmen angezeigt, die zu einer Verringerung des Eintrages an Antibiotikaresistenzen, Bakterien und Antibiotikarückständen in die Umwelt infolge des direkten Eintrages von unbehandelten Rohabwässern in Gewässer führen. Im reinen Mischsystem liegt infolge dessen ein höherer Eintrag für Resistenzgene und resistente Bakterien vor als infolge von Kläranlagenabläufen (siehe „Teilbereich: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung“ und „Teilbereich: Relevanz verschiedener urbaner Eintragungspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes). Die Ausstattung mit **Retentionsbodenfiltern** ist als technische Maßnahme geeignet, um eine Frachtreduktion (Bakterien inklusive antibiotikaresistente Bakterien) um ein bis zwei log-Stufen zu erreichen (Zacharias et al. 2020). Als weitere mögliche Maßnahmen sind z. B. eine integrale Abflusssteuerung, Vergrößerung

⁴ „Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung – AbwV)“ (vom 17. Juni 2004, BGBl. I S. 1108-1184, zuletzt geändert am 6. März 2020, BGBl. I S. 485-486).

⁵ „Verordnung (EU) 2020/741 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Mai 2020 über Mindestanforderungen an die Wasserwiederverwendung“ (ABl. L177 vom 5.6.2020, S. 32-55).

des Retentionsvolumens und Verringerung der Entlastungswassermengen zu nennen, damit möglichst viel Rohabwasser in der anschließenden Kläranlage behandelt wird (siehe „Teilbereich: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung“ sowie „Teilbereich: Relevanz verschiedener urbaner Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes). Für eine rechtliche Umsetzung müssten entsprechende Vorschriften formuliert und in der Abwasserverordnung aufgenommen werden.

Trennkanalisationen

Insgesamt ist in jedem Fall eine Trennkanalisation einer Mischkanalisation vorzuziehen, sodass diese in Neubaugebieten umgesetzt werden sollte. Es konnte generell gezeigt werden, dass bei Vorliegen einer Trennkanalisation weniger Krankheitserreger und antibiotikaresistente Bakterien in Gewässer eingetragen werden. Der ermittelte Eintrag resultierte insbesondere aus dem Vorliegen von Fehllanschlüssen und aus Abschwemmungen von versiegelten Flächen (siehe „Teilbereich: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung“, Schreiber et al. 2019). Da bei einer Fehllanschlussrate über 2 % von einer hohen Frachtemission ausgegangen werden muss (siehe hierzu „Teilbereich: Relevanz verschiedener urbaner Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes), sollten im Trennsystem ebenfalls Maßnahmen zur Eintragsminderung forciert werden (siehe dazu „Teilprojekt: Kommunale Abwässer und Oberflächenwässer ohne Klinik- und Industrie-Beeinflussung“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes).

Monitoringprogramme

Sobald eine Validierung der Methoden erfolgt ist, können die entsprechenden **Überwachungsbehörden der Bundesländer** anhand des im Projekt entwickelten **Methodenkompodiums** Monitoringleitfäden entwickeln, indem diese auf der vorhandenen Methodenbasis aufbauen, d. h. diese weiterentwickeln und verifizieren, sodass eine systematische und harmonisierte Überwachung des Vorkommens (Menge und Art) von antibiotikaresistenten Bakterien, deren Resistenzgenen und Antibiotikawirkstoffen in priorisierten Abwässern (z. B. Klinikabwässer, Schlachthofabwässer und die in HyReKA nicht untersuchten Abwässer von Antibiotikaproduktionsstandorten), im Ablauf priorisierter Kläranlagen und in bestimmten Gewässern (z. B. Nutzung als Badegewässer, zur Trinkwassergewinnung oder landwirtschaftlichen Bewässerung) erfolgen kann. Hierdurch können Gefährdungspotenziale aufgedeckt, weiterer Handlungsbedarf abgeleitet sowie die Effektivität ergriffener Maßnahmen und die Einhaltung der umzusetzenden Maßgaben überwacht werden.

Nach den Ergebnissen aus HyReKA wären geeignete **Screeningindikatoren** hierfür:

- priorisierten Antibiotikawirkstoffe (Carbapeneme, Fluorchinolone, Tetracycline, Tylosin, gegebenenfalls Sulfonamide; im klinischen Abwasser als Fluorchinolone insbesondere Ciprofloxacin und als Carbapeneme insbesondere Meropenem, weiterhin Piperacillin, Ceftazidim und Vancomycin) und
- Antibiotikaresistenzen (Indikatororganismen (mit humanmedizinischer Relevanz): *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *E. faecium* (kultureller Nachweis);

Antibiotikaresistenzgene gegen Carbapeneme (*bla*NDM-1, *bla*KPC, *bla*VIM, *bla*OXA48), Colistin (*mcr*-1, wenn Beeinflussung durch veterinären Bereich: *mcr*-1 bis 9) und Vancomycin (*van*A/B)). Das in HyReKA vorgeschlagene **Ampelprinzip** zur Beurteilung der bestehenden Antibiotikaresistenzlage wird hierfür als sinnvoll erachtet, d. h. bei Vorliegen eines positiven Ergebnisses in den molekulargenetischen Untersuchungen bei gleichzeitigem kulturellem Nachweis ist dringender Handlungsbedarf angezeigt, da hier unter Umständen eine Gesundheitsgefährdung nicht ausgeschlossen werden kann. Erfolgt ein Nachweis von Resistenzgenen (molekulargenetischer Nachweis), aber kein kultureller Befund, dann muss eine Verifikation und erneute Überprüfung stattfinden. Liegt weder ein molekulargenetischer noch ein kultureller Nachweis vor, dann besteht kein Handlungsbedarf.

Dabei ist eine Berücksichtigung von Antibiotikawirkstoffen und Antibiotikaresistenzen in der **Wasserrahmenrichtlinie**⁶ als sinnvoll anzusehen.

Zurzeit werden unter den Antibiotikawirkstoffen die Antibiotika Amoxicillin und Ciprofloxacin sowie das Sulfonamid-Antibiotikum Sulfamethoxazol und das Diaminopyrimidin-Antibiotikum Trimethoprim auf der „**Beobachtungsliste von Stoffen für eine unionsweite Überwachung**“⁷ geführt. Die Makrolid-Antibiotika Azithromycin, Clarithromycin und Erythromycin standen seit 2015 auf der Beobachtungsliste, sodass für diese nun die Überwachungsverpflichtung, die maximal für vier Jahre besteht, auslief.

Die hygienische Qualität von Badegewässern wird durch die **EG-Badegewässerrichtlinie**⁸ geregelt. Derzeit enthält diese als Qualitätsindikatoren *E. coli* und intestinale Enterokokken. Dabei wird je nach Menge an koloniebildenden Einheiten pro 100 ml die Qualität des Badegewässers als „ausgezeichnet“, „gut“, „ausreichend“ oder „mangelhaft“ eingestuft. Antibiotikaresistenzen und Antibiotikawirkstoffe werden nicht adressiert. In diesem Zusammenhang stellte z. B. Döhla et al. (2020) zwar fest, dass Badegewässer, die den Anforderungen der EG-Badegewässerrichtlinie entsprachen, keine hohe Belastung mit Antibiotikaresistenzen und Antibiotikarückständen aufwiesen. Durch ein systematisches Monitoring könnten jedoch weitere Daten zum Vorhandensein von Antibiotikaresistenzen und Antibiotikarückständen sowie zu den Konzentrationen an *E. coli* und intestinalen Enterokokken und der jeweiligen Korrelation erhoben werden, gerade im Hinblick auf Flussbadegewässer, deren Qualität stärkere Schwankungen aufweist als stehende Gewässer (z. B. infolge von Starkregenereignissen). Hieraus ließe sich ableiten, ob und inwieweit z. B. eine Ergänzung

⁶ „Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik“; „Richtlinie 2013/39/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. August 2013 zur Änderung der Richtlinien 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik“.

⁷ „Durchführungsbeschluss (EU) 2020/1161 der Kommission vom 4. August 2020 zur Erstellung einer Beobachtungsliste von Stoffen für eine unionsweite Überwachung im Bereich der Wasserpolitik gemäß der Richtlinie 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rates“ (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen C(2020) 5205; Abl. L 257 vom 6.8.2020, S.32-35).

⁸ „Richtlinie 2006/7/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. Februar 2006 über die Qualität der Badegewässer und deren Bewirtschaftung und zur Aufhebung der Richtlinie 76/160/EWG“ (ABl. L 64 vom 4.3.2006, S. 37-51).

der EG-Badegewässerrichtlinie hinsichtlich der Antibiotikaresistenzen und Antibiotikawirkstoffen vorzunehmen wäre.

Bei Vorliegen entsprechender Verdachtsmomente (z. B. Beeinflussung durch Einleitung gereinigten Abwassers; Starkregenereignisse) wird ein engmaschiges Monitoring für Badegewässer sowie eine Quellensuche (*source tracking*) als sinnvoll erachtet.

Trinkwasser

Im Trinkwasser waren zwar einzelne Resistenzgene, aber keine kultivierbaren resistenten Bakterien nachweisbar (siehe Ergebnisse TZW). Von Seiten des Umweltbundesamtes wird nach derzeitiger Datenlage diesbezüglich kein regulatorischer Handlungsbedarf gesehen. Es wird hierzu auf die „Mitteilung des UBA nach Anhörung der TWK: Bedeutung von antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgenen im Trinkwasser“ vom 25.04.2018 verwiesen (Umweltbundesamt 2018).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl national als auch international Aktivitäten erfolgen, um die Entwicklung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen zu minimieren. National ist hier beispielsweise die bereits unter dem Berichtsabschnitt „Ausgangspunkt: Derzeitige regulatorische Maßnahmen“ genannte „Zweite Verordnung zur Änderung der Verordnung über tierärztliche Hausapotheken vom 21. Februar 2018“ (Bundesgesetzblatt (BGBl.) I S. 213-216; Inkrafttreten 01.03.2018) aufzuführen, deren Bestimmungen auf einen verantwortungsvollen und restriktiven Einsatz von Antibiotika in der Tiermedizin hinwirken. Mit dem „16. Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes vom 10. Oktober 2013“ wurde das Antibiotikaminimierungskonzept eingeführt. Der Evaluierungsbericht zum Antibiotikaminimierungskonzept zeigt eine Reduktion der Gesamtverbrauchsmenge antibiotischer Wirkstoffe in der Tiermast um 31,6 % im Zeitraum vom 2. Halbjahr 2014 bis zum 2. Halbjahr 2017 (BMEL 2019). Im Zeitraum 2011 bis 2020 ist eine Reduktion der an Tierärzte abgegebenen Antibiotika um 59 % zu verzeichnen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) 2021). Jedoch hat sich im Zeitraum von 2019 zu 2020 die Gesamtabgabemenge (um 4,6 %) und die Abgabemenge der Fluorchinolone (um 6,7 %) leicht erhöht (BVL 2021).

Seit Januar 2022 ist die Verordnung (EU) 2019/6 über Tierarzneimittel anzuwenden. Diese sieht u. a. die Möglichkeit vor, bestimmte antibiotische Wirkstoffe der Humanmedizin vorzubehalten. Weiterhin beinhaltet sie Beschränkungen bezüglich der prophylaktischen und metaphylaktischen Antibiotikaaanwendung bei Tieren.

Zum Schutz der Gesundheit sollten aufgrund der in HyReKA ermittelten Daten weitere Maßnahmen ergriffen werden, um die Last an Antibiotikaresistenzen und Antibiotikawirkstoffen in der Umwelt zu minimieren und die Entstehung und Verbreitung resistenter Mikroorganismen und deren Gene einzudämmen. Dabei spielen neben regulativen Maßnahmeoptionen auch nicht-regulative (z. B. Information; Kommunikation) eine Rolle (Zusammenfassung der vorgeschlagenen Maßnahmen siehe Abb. 3). Derartige Maßnahmen lassen sich nicht von einzelnen Interessenvertretern alleine umsetzen, viel mehr ist ein konstruktives Miteinander aller Betroffenen anzustreben und natürlich sind in den zu treffenden Entscheidungen auch die Ergebnisse anderer Forschungsprojekte einzubeziehen.

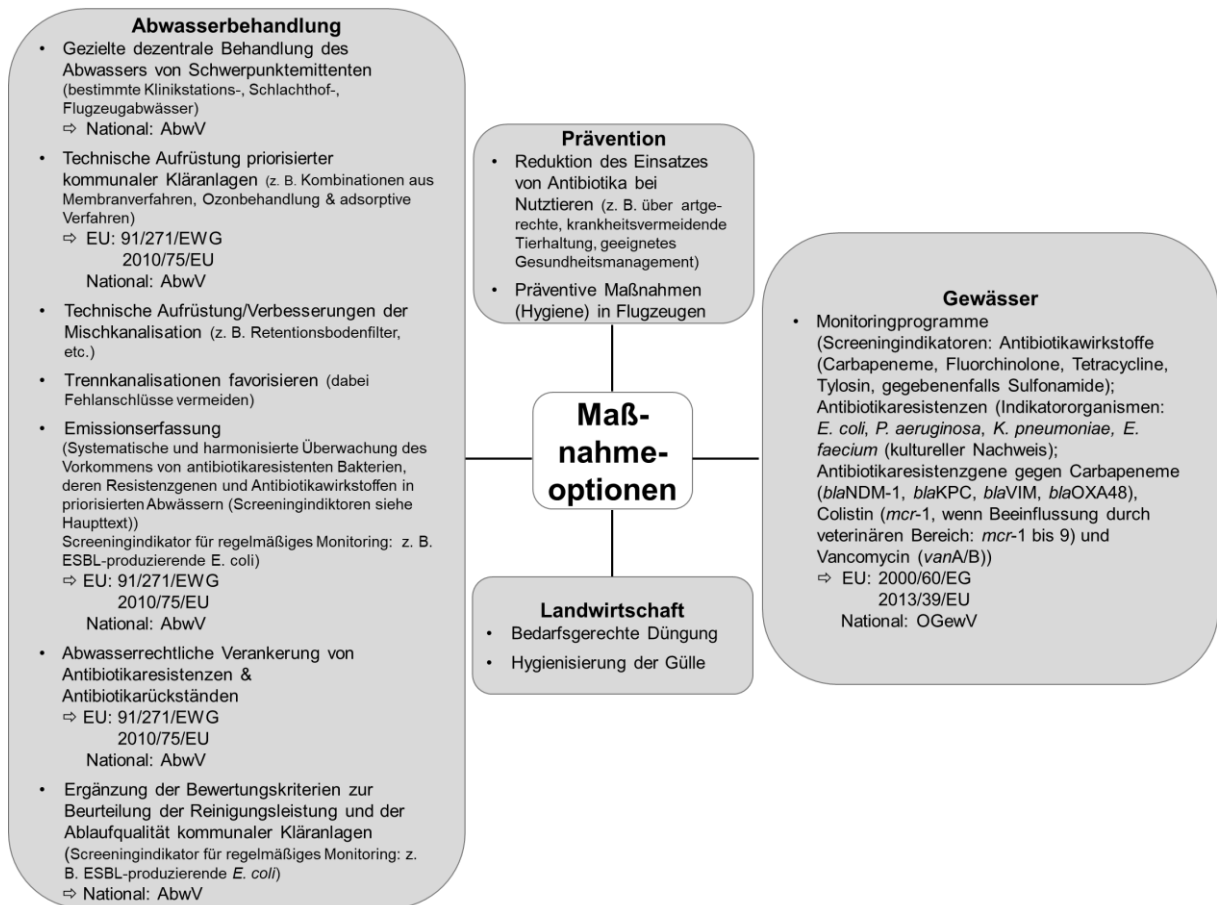


Abbildung 3: Übersicht zu den empfohlenen Maßnahmooptionen mit Angabe der Rechtsgrundlagen, über welche die vorgeschlagenen Maßnahmen in den regulativen Bereich umgesetzt werden könnten.

Literatur

- Alexander, J., Hembach, N., Schwartz, T. (2019): Die Problematik der Antibiotika-resistenten Bakterien. wwt Sonderausgabe Modernisierungsreport 2019/20, 52-57.
- Alexander, J.; Hembach, N.; Schwartz, T. (2020): Evaluation of Antibiotic Resistance Dissemination by Wastewater Treatment Plant Effluents With Different Catchment Areas in Germany. Sci Rep 10(1):8952.
- Barrios, R.E.; Khuntia H.K.; Bartelt-Hunt S.L.; Gilley J.E.; Schmidt A.M.; Snow D.D.; Li X. (2020): Fate and transport of antibiotics and antibiotic resistance genes in runoff and soil as affected by the timing of swine manure slurry application. Science of The Total Environment 712 (2020): 136505.
- Bengtsson-Palme, J.; Larsson, D.G.J. (2016): Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. Environment International 86 (2016):140–149.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2021): Abgabemengen von Antibiotika in der Tiermedizin leicht gestiegen. Mengen für Polypeptidantibiotika und Cephalosporine der 3. Und 4. Generation auf niedrigstem Wert seit 2011, leichter Anstieg bei Fluorchinolonen. Pressemitteilung, 12.10.2021.

- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) (2019): Bericht des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft über die Evaluierung des Antibiotikaminimierungskonzepts der 16. AMG-Novelle. Evaluierung auf Grund des § 58g des Arzneimittelgesetzes. Bonn. 83 S.
- Deutscher Bundestag (2021), 19. Wahlperiode: Beschlussempfehlung und Bericht des Ausschusses für Ernährung und Landwirtschaft (10. Ausschuss) zu dem Gesetzentwurf der Bundesregierung – Drucksache 19/23159 – Entwurf eines Siebzehnten Gesetzes zur Änderung des Arzneimittelgesetzes. Drucksache 19/30484.
- Döhla, M.; Sib, E.; Dericks, B.; Grobe, S.; Behringer, K.; Frechen, M.; Simon, K.; Faerber, H. A.; Lenz, F.; Parcina, M.; Skutlarek, D.; Voigt, A. M.; Felder, C.; Exner, M.; Schmithausen, R. M. (2020): Assessment of the prevalence of antibiotic-resistant bacteria and the concentration of antibiotics in EU bathing waters in Western Germany. *Expos Health* 12:323–334.
- Europäische Kommission (2020): Mitteilung der Kommission an das Europäische Parlament, den Rat, den Europäischen Wirtschafts- und Sozialausschuss und den Ausschuss der Regionen; „Vom Hof auf den Tisch“ – eine Strategie für ein faires, gesundes und umweltfreundliches Lebensmittelsystem; Brüssel, 20.5.2020; COM(2020) 381 final.
- European Medicines Agency (EMA) (2020): European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2020. ‘Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018’. (EMA/24309/2020)
- 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. *Front Microbiol* 8:1282.
- 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, *Sci Rep* 9:12843.
- Heß, S.; Kneis, D.; Österlund, T.; Li, B.; Kristiansson, E.; Berendonk, T.U. (2019): Sewage from Airplanes Exhibits High Abundance and Diversity of Antibiotic Resistance Genes. *Environ Sci Technol*. 53(23):13898-13905.
- Hiller, C.X.; Hübner, U.; Fajnorova, S.; Schwartz, T.; Drewes, J.E. (2019): Antibiotic Microbial Resistance (AMR) Removal Efficiencies by Conventional and Advanced Wastewater Treatment Processes: A Review. *Sci Total Environ* 685:596-608.
- Jäger, T.; Hembach, N.; Elpers, C.; Wieland, A.; Alexander, J.; Hiller, C.; Krauter, G.; Schwartz, T. (2018): Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment, *Front Microbiol* 9:2599.
- López-Cadenas, C.; Sierra-Vega, M.; García-Vieitez, J.J.; Díez-Liébaná, M.J.; Sahagún-Prieto, A.; Fernández-Martínez, N. (2013): Enrofloxacin: pharmacokinetics and metabolism in domestic animal species. *Curr Drug Metab*. 14(10):1042-58.
- 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. & G. Bierbaum (2018): Dissemination of

multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiol Ecol* 94(5).

Risikokommission (2003): ad hoc-Kommission "Neuordnung der Verfahren und Strukturen zur Risikobewertung und Standardsetzung im gesundheitlichen Umweltschutz der Bundesrepublik Deutschland". Abschlussbericht der Risikokommission.

Savin, M.; Bierbaum, G.; Hammerl, J. A.; Heinemann, C.; Parcina, M.; Sib, E.; Voigt, A.; Kreyenschmidt, J. (2020a): ESKAPE Bacteria and Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Wastewater and Process Water from German Poultry Slaughterhouses. *Appl Environ Microbiol* 86(8) e02748-19.

Savin, M.; Bierbaum, G.; Hammerl, J. A.; Heinemann, C.; Parcina, M.; Sib, E.; Voigt, A.; Kreyenschmidt, J. (2020b): Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment* 727:138788.

Schreiber, C. (2019): Antibiotikaresistenzen in Abwasser und Gewässern - Einträge, Vorkommen, Verbreitung und gesundheitliche Bedeutung antibiotikaresistenter Bakterien in der aquatischen Umwelt. *Geographische Gesundheitsforschung - Geographical Health Research*, Band 4, Bonn/Berlin: Shaker Verlag.

Schreiber, C.; Zacharias, N.; Müller, H.; Essert, S.; Timm, C.; Kistemann, T.; Sib, E.; Gajdiss, M.; Parcina, M.; Voigt, A.; Färber, H.; Exner, M.; Schmithausen, R.M.; Bierbaum, G. (2019): Einfluss von Krankenhausabwasser auf die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in der aquatischen Umwelt, In: Pinnekamp, J. (Hrsg.): 52. Essener Tagung für Wasserwirtschaft (=Gewässerschutz - Wasser - Abwasser 250): 19/1-19/15.

Schuster, D.; Hostein, N.; Axtmann, K.; Felder, C.; Voigt, A.; Färber, H.; Ciorba, P.; Szekat, C.; Schallenberg, A.; Neidhöfer, C.; Smalla, K.; Exner, M.; Bierbaum, G. (submitted): Antibiotic concentrations in raw hospital wastewater surpass minimal selective and minimal inhibitory concentrations of resistant *Acinetobacter baylyi* strains. *Environ Microbiol*.

Sib, E.; Voigt, A. M.; Wilbring, G.; Schreiber, C.; Faerber, H. A.; Skutlarek, D.; Parcina, M.; Mahn, R.; Wolf, D.; Brossart, P.; Geiser, F.; Engelhart, S.; Exner, M.; Bierbaum, G.; Schmithausen R. M. (2019): Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in biofilms in clinical wastewater networks. *Int J Hyg Environ Health* 222(4): 655-662.

Sib, E.; Lenz-Plet, F.; Barabasch, V.; Klanke, U.; Savin, M.; Hembach, N.; Schallenberg, A.; Kehl, K.; Albert, C.; Gajdiss, M.; Zacharias, N.; Müller, H.; Schmithausen, R.M.; Exner, M.; Kreyenschmidt, J.; Schreiber, C.; Schwartz, T.; Parcina, M.; Bierbaum, G. (2020): Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Sci Total Environ*.746:140894.

Umweltbundesamt (2018): Bedeutung von antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgenen im Trinkwasser. Mitteilung des UBA nach Anhörung der TWK. 3 S., 25.04.2018.
https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/374/dokumente/mitt_eilung_antibiotikaresistente_keime_trinkwasser_0.pdf

- Vidaurre, R., Lukat, E., Steinhoff-Wagner, J., Ilg, Y., Petersen, B., Hannappel, S., Möller, K. (2016): Fachbroschüre: Konzepte zur Minderung von Arzneimittelrückständen aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung in die Umwelt, Umweltbundesamt: Dessau-Roßlau (<https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/konzepte-zur-minderung-von-arzneimittelruetruenen>), 215 S.
- Voigt, A. M.; Faerber, H. A.; Wilbring, G.; Skutlarek, D.; Felder, C.; Mahn, R.; Wolf, D.; Brossart, P.; Hornung, T.; Engelhart, S.; Exner, M., Schmithausen, R. M. (2019): The occurrence of antimicrobial substances in toilet, sink and shower drainpipes of clinical units: A neglected source of antibiotic residues. *Int J Hyg Environ Health* 222(3):455-467.
- 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. (2020): Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater – An evaluation of clinical influences. *Chemosphere* 241: 125032.
- World Health Organization (WHO) (2019): Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision 2018, Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. 45 S., ISBN 978-92-4-151552-8.
- Zacharias, N.; Essert, S.M.; Brunsch, A.F.; Christoffels, E.; Kistemann, T.; Schreiber, C. (2020): Performance of retention soil filters for the reduction of hygienically-relevant microorganisms in combined sewage overflow and treated wastewater. *Water Sci Technol.* 81(3):535-543.

9 Synthese aller Kernbotschaften und Indikatoren zur Bewertung von Belastungssituationen

9.1 **Überblick und Zusammenfassung aller Kernbotschaften aus den Teilprojekten**

Interdisziplinäre Forschungspartner haben sich im vom BMBF geförderten Verbundvorhaben zum Ziel gemacht, die „Biologische bzw. hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern“ (HyReKA) zu untersuchen und damit Eintragspfade von Antibiotika-resistenten Bakterien, Antibiotika-Resistenzgenen und Antibiotika-Rückständen von Mensch oder Tier in die Umwelt qualitativ und quantitativ zu charakterisieren (*Source Dissemination*), um so die Ausbreitung in die Umwelt mit geeigneten technischen Verfahren zu unterbrechen. Ebenso wurde die Rückkopplung zurück zum Menschen durch Kontakt mit Wasser (*Microbial Dissemination*) einbezogen. Schließlich wurde die Rückverfolgbarkeit von Antibiotika-resistenten Erregern und Resistenzgenen aus Abwässern auf deren Ursprungsorte im Sinne des *Microbial Source Tracking* geprüft.

Die Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang zwischen Antibiotika-Wirkstoffkonzentrationen und der Abundanz resistenter fakultativ pathogener Bakterien im Abwasser aus verschiedenen Quellen (Schreiber & Kistemann 2013; Hembach et al. 2017; Müller et al. 2018). Auch in den Abläufen von Kläranlagen wurden resistente Bakterien und Resistenzgene nachgewiesen (Schwartz et al. 2018; Pärnanen et al. 2019). Dabei gilt es jedoch, die Kläranlagenabläufe aus einem ländlich-urbanen Kontext von denen aus einem rein urbanen Kontext mit Einfluss von Klinikabwasser zu unterscheiden, denn der Anteil an 4MRGN (von der WHO priorisierte multi-resistente Erreger, die gegen die vier wichtigsten klinischen Antibiotikaklassen resistent sind) war im Klinikabwasser wesentlich höher als im ländlichen Abwasser (Schreiber & Kistemann 2013; Hembach et al. 2017; Müller et al. 2018), während diese Bakterien im Abwasser von Geflügel-Schlachthöfen gar nicht nachgewiesen wurden (Savin et al., 2020). In den Abläufen kommunaler Kläranlagen mit und ohne Einfluss von Klinikabwasser wurden jeweils unterschiedliche antibiotische Wirkungsspektren nachgewiesen (Voigt et al., 2019; Sib et al. 2019). Kläranlagen-Zu- und Abläufe mit Klinikeinfluss wiesen zudem im Vergleich komplexere und kritischere Resistenzmuster auf (höhere Häufigkeit von Bakterien mit Resistenz gegen Carbapeneme, Colistin und weitere Reserveantibiotika) (Alexander et al., 2020; Pärnanen et al. 2019; Müller et al., 2018). In Abwässern aus der Geflügelverarbeitung wurden zudem häufiger Resistenzgene (*mcr-1*) gegen Colistin (Reserveantibiotikum) nachgewiesen (Savin et al. 2020).

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse gewinnen die im Infektionsschutz-gesetz definierten regulatorischen Anforderungen an die Abwasserentsorgung eine neue Bedeutung. In § 41 des IfSG - Abwasser - heißt es:

„Die Abwasserbeseitigungspflichtigen haben darauf hinzuwirken, dass Abwasser so beseitigt wird, dass Gefahren für die menschliche Gesundheit durch Krankheitserreger nicht entstehen.“

Im Folgenden werden aus Teilbereichen des Verbundvorhabens Kernbotschaften dargestellt, zu denen bereits Veröffentlichungen vorliegen. Bezüglich der detaillierten Ergebnisse wird auf den zukünftigen Synthesebericht zu dem Verbundvorhaben verwiesen.

Es wurden folgende Teilbereiche untersucht:

- Ein Krankenhaus der Maximalversorgung: Ausgehend von einer Station, in der ein besonders hoher Antibiotikaverbrauch vorlag, wurden die Abwässer durch die Stadt über die Kläranlage bis in den Vorfluter verfolgt und mit der Belastung anderer Zuflüsse in die Kläranlage verglichen und Antibiotikarückstände gemessen.
- Kommunale Abwässer: Ein ländliches Flusssystem ohne Viehzucht mit vier kleinen Orten ohne Krankenhäuser und die angeschlossenen Kläranlagen sowie dem Vorfluter und Gewässer. In diesem Bereich wurde auch die Wirkung von Retentionsbodenfiltern getestet.
- Weitere 24 Kläranlagen unterschiedlichster Größen, Einzugsgebiete und Ausbaustufen wurden untersucht und miteinander bzgl. Resistenzverbreitung verglichen. Ein Großteil der Kläranlagen (11 Stück) behandelte vor allem kommunales Abwasser, 7 Kläranlagen hatten Krankenhäuser im Einzugsgebiet und 6 Kläranlagen behandelten größere Mengen an Abwässern aus Lebensmittelverarbeitenden Betrieben.
- Gezielt wurden an einer Großkläranlage erweiterte Verfahrenstechniken und Kombinationen zur Reduktion fakultativ-pathogener Bakterien und von Antibiotikaresistenzgenen untersucht (Adsorptive Filtration, Ozonung, UV und Membranfiltration).
- Landwirtschaft: Die Abwässer und Prozesswässer aus mehreren Geflügel- und Schweineschlachthöfen sowie den angeschlossenen hauseigenen und kommunalen Kläranlagen
- Flugzeuge und ihre Toiletten als Hotspots für den Eintrag von Resistenzgenen
- Rohwässer und Trinkwasser wurden ebenfalls untersucht.
- Die Ergebnisse des HyReKA-Projekts wurden dann aus Sicht des Umweltbundesamtes (UBA) und der Siedlungswasserwirtschaft bewertet.

Kernbotschaft 1: Krankenhäuser stellen die stärkste Quelle für multiresistente Bakterien und Antibiotikarückstände dar

In Proben aus der Sanitärinstallation der Patientenzimmer konnten hohe und z.T. persistierende Kontaminationen mit Antibiotika-resistenten Erregern und Antibiotika-Rückständen nachgewiesen werden. Diese zum Teil sehr hohen Konzentrationen, vor allem in den Waschbecken, - Dusch- und Toilettensiphons begünstigen die Selektion und Vermehrung von entsprechend resistenten Mikroorganismen und bedingen aufgrund der unmittelbaren Nähe zum Patienten und zu Materialien zur Patientenpflege ein erhebliches nosokomiales Infektionsrisiko (Voigt et al, 2019). Die Berücksichtigung der bis dahin vorliegenden Ergebnisse aus dem HyReKA Verbundvorhaben führten daher auch zu der 2020 veröffentlichten Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO): *Anforderung der Hygiene an die Abwasserentsorgung in medizinischen Einrichtungen.*

Dennoch wird weiterhin erheblicher Forschungsbedarf gesehen, die im direkten Umfeld des Patienten festgestellten Reservoirs für Antibiotika-resistente Erreger und

Antibiotikarückstände mit erheblichem Infektionsrisikopotential durch geeignete baulich-funktionelle und betrieblich-organisatorische Maßnahmen und Strategien besser unter Kontrolle zu bringen, was allein durch Reduktion des Einsatzes von Antibiotika bzw. Antibiotic Stewardship Strategien nicht gelingt.

Rohabwasser aus Klinikbereichen mit hohem Antibiotikaverbrauch erschien hochbelastet mit 4MRGN, teilweise waren diese Bakterien nur noch gegen eine oder zwei Substanzen empfindlich und sind damit als hochkritisch zu bewerten (Sib et al. 2019, Müller et al. 2018). Für einzelne Stämme war ein Nachweis über die gesamte Laufzeit möglich, so dass von einer konstanten Besiedlung der klinischen Abwassersysteme ausgegangen werden sollte. Diese hohe und z.T. persistierende Kontamination des Abwassers ließ sich über die angeschlossene Kanalisation bis zum Kläranlageneinfluss nachweisen (Müller et al. 2018, Schreiber et al. 2019, Voigt et al. 2020). In der untersuchten nachgeschalteten Kläranlage wurden ARB wie auch andere hygienisch-relevante Mikroorganismen zwar um im Median 3 log-Stufen (Spannweite: 2-4 log-Stufen) reduziert, aber es wurden dennoch multiresistente Isolate im Kläranlagen-Ablauf nachgewiesen (Müller et al. 2018, Schreiber et al. 2019). **ESBL-(extended spectrum β -lactamases) produzierende Bakterien sind im Gewässer bereits regelmäßig vorzufinden, sind jedoch seltener gegen 3 oder 4 klinisch bedeutsame Wirkstoffgruppen multi-resistent.** Im Vergleich zu anderen resistenten Erregern (ESBL, VRE) sind MRSA in Abwasser und Gewässern relativ selten nachweisbar (Schreiber et al. 2019).

Kernbotschaft 2: Kommunale Kläranlagen können nur unzureichend Antibiotikaresistenzen und Antibiotikarückstände reduzieren. Dazu sind zusätzliche kombinatorische Verfahren bereits einsetzbar. Indikatoren zur biologischen Überwachung werden zum Schutz von empfindlichen aquatischen Bereichen vorgeschlagen.

Es ließen sich aus kommunalem bzw. häuslichem Abwasser deutlich weniger 4 MRGN, MRSA und VRE isolieren, als aus klinischem Abwasser (Müller et al. 2018, Schreiber et al. 2019). Einige Antibiotika-Resistenzgene (ARG) waren nahezu ubiquitär in Abwasser und Gewässern nachweisbar. Andere seltene Gene, wie z.B. *mcr-1* (übertragbare Colistinresistenz), oder *vanA* (Resistenz gegen Vancomycin, Reserveantibiotikum), sowie Resistenzen gegen Carbapeneme (*blaOXA48*, *blaNDM-1*, *blaKPC*, *blaVIM*) wurden jedoch im Rohabwasser, als auch im konventionell behandelten Kläranlagenablauf nachgewiesen (Hembach et al., 2017; Hembach et al., 2019; Alexander et al., 2020). Im Oberflächengewässer wurden diese Resistenzgene bisher nur vereinzelt gefunden. Der Einfluss von Kläranlagenausläufen war aber immer sichtbar. Kommunale Kläranlagen konnten resistente Bakterien im Abwasser analog zu "normalen" Bakterien um im Mittel rund 3 log-Stufen (99,9%) reduzieren, in den Kläranlagenausläufen waren multiresistente Bakterien aber nachweisbar (Müller et al., 2018, Schreiber et al., 2019). Dies ist jedoch unter Berücksichtigung der täglichen Emission von 10^{12} bis 10^{15} ARGs im gereinigten Kläranlagenablauf nicht ausreichend (Hembach et al., 2017; Alexander et al., 2020). Zum Schutz der Trinkwassergewinnung, Badegewässer und

Bewässerung in der Landwirtschaft müssen an als belastet eingestuften Kläranlagen Maßnahmen zur Gesundheitsvorsorge getroffen werden.

Favorisiert werden technische Maßnahmen an Kläranlagen, bei denen die Verfahren zur Bakterienreduktion Synergieeffekte mit der Spurenstoff-/Mikroplastikreduktion besitzen. Dies wird durch Verfahrenskombinationen aus Membranverfahren (Ultrafiltration, MBR, Fokus: Bakterien) und Ozonung und/oder adsorptive Verfahren (Fokus: Spurenstoffe und Mikroplastik) ermöglicht (Jäger et al., 2018, Hembach et al., 2019).

Weiterer Forschungsbedarf besteht darüber hinaus aufgrund der bakteriellen Belastungssituation im Retentat einer Membrananlage, das durch den erzeugten Rückhalt an der Membran selbst entsteht, sowie dessen weitere Behandlung.

Eine Reduktion der Bakterien und Antibiotika-Rückstände in Mischwasser über Retentionsbodenfilter vor Einleitung ins Gewässer um 1 bis 2 log-Stufen konnte nachgewiesen werden (Zacharias et al., submitted). In Fließgewässern mit hohem Abwasseranteil waren trotzdem Antibiotika-resistente Bakterien in Konzentrationen nachweisbar, die eine Gesundheitsgefährdung, z. B. durch Aufnahme beim Baden in Freibadegewässern, nicht ausschließen lassen.

Die Bedeutung einzelner Schwerpunkt-Emittenten muss für jedes Gewässer-Einzugsgebiet gesondert bewertet werden. Für ausgewiesene und genehmigte Wassernutzungen (z.B. Badegewässer, Beregnungswasser) sind bereits Vorgaben hinsichtlich der Bakterienbelastung einzuhalten. Ein weiterer sensibler Bereich sind Oberflächenwässer, die zur Trinkwasseraufbereitung genutzt werden. Für Badewässer und damit auch Beregnungswasser sind bereits Qualitätsziele definiert (Exner et al., 2018).

Regularien und Grenzwerte für sensible Bereiche zum Nachweis bzw. zur Reduktion von Antibiotika-resistenten Bakterien sind notwendig: Als Screening-Indikator wird seitens des HyReKA-Verbundes der kulturelle Nachweis von *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *E. faecium* empfohlen. Optional ist der Nachweis von *Acinetobacter baumannii*. Als molekularbiologische Screening-Indikatoren werden Antibiotikaresistenzgene gegen Carbapeneme (*bla*NDM-1, *bla*KPC, *bla*VIM, *bla*OXA48), Colistin (*mcr*-1) und Vancomycin (*vanA/B*) empfohlen. Für die genannten Indikatoren wurde ein Ampelsystem zur Beurteilung entwickelt und wurde bereits für Badegewässer dargestellt (Döhla et al., 2019).

Bei der Eliminierung von Antibiotikarückständen werden viele Wirkstoffe praktisch vollständig zurückgehalten oder abgebaut, jedoch konnten Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Clarithromycin noch regelmäßig in den Kläranlagen-Abläufen nachgewiesen werden (Voigt et al 2020). In den Gewässern war i. d. R. neben Makroliden nur noch Sulfamethoxazol regelmäßig nachweisbar (erst unterhalb der ersten KA-Einleitstelle).

Kernbotschaft 3: Die Prozessabwässer auf den Schlachthöfen enthielten Antibiotika-resistente Bakterien (ESBL-Bildner), die aber die geringste Multi-Resistenz aufwiesen. Antibiotika-Rückstände sind hier sehr gering.

In den untersuchten Geflügel- und Schweineschlachthöfen konnte ein ubiquitäres Vorkommen von den Erregern der ESKAPE-Gruppe sowie ESBL-produzierenden *E. coli* in Abwässern, die in Anlieferungsbereichen und in unreinen (schwarzen) Produktionsbereichen der untersuchten Schlachthöfe anfallen festgestellt werden sowie in den Vorflutern der kommunalen Kläranlagen. Alle Isolate waren Carbapenem-sensibel, d.h. 4MRGN konnten in den Schlachthöfen nicht nachgewiesen werden (Savin et al. 2020).

In Geflügelschlachthöfen konnten auch Ciprofloxacin- und Colistin-resistente Gram-negative Bakterien und gerade hier das mobile *mcr*-Resistenzgen nachgewiesen werden (Savin et al. 2020). Die Partner des Verbundprojektes sind der Auffassung, dass wie in Australien Fluorchinolone und entsprechend der Empfehlung der WHO Colistin in der Tierzucht nicht mehr eingesetzt werden sollten.

Insbesondere betriebseigene Kläranlagen von den Geflügelschlachthöfen, die das Abwasser mittels Ultrafiltration und Ozon aufbereiten, reduzierten die Gesamtkeimbelastung um 4-6 log-Stufen, sodass die ausgewählten Erreger in nahezu allen Ablauf-Proben nicht mehr nachweisbar waren (Savin et al., 2020).

Kernbotschaft 4: Flugzeugabwasser enthielten die größte Vielfalt von Resistenzgenen

Die relative Abundanz von Resistenzgenen war im Flugzeugabwasser signifikant höher als im gewöhnlichem kommunalen Rohabwasser. Dies betrifft insbesondere Gene, die Resistenzen gegen Antibiotika aus den Gruppen der Phenicole, Sulphonamide oder Tetracycline vermitteln. Dagegen wurden genotypische Resistenzen gegen β -Lactame im Flugzeugabwasser ähnlich häufig wie im kommunalen Abwasser gefunden (Heß et al., 2019).

Im Flugzeugabwasser wurden im Durchschnitt mehr unterschiedliche Resistenzgene pro bakterieller DNA gefunden, was die o. g. Hypothese bzgl. der Gendiversität unterstützt.

Multiresistente Isolate von *E. coli* wurden im Flugzeugabwasser signifikant häufiger als im kommunalen Abwasser gefunden. Proben aus Zuläufen kommunaler Kläranlagen mit und ohne Anschluss an Flughäfen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede bzgl. der relativen Abundanz von Resistenzgenen (Heß et al., 2019).

Die genannten Ergebnisse legen nahe, dass Abwässer aus Flugzeugtanks eine außergewöhnliche Quelle von Resistenzgenen und resistenten Bakterien darstellen. Fazit: Hygienische Maßnahmen im Flugzeug (Desinfektion auf Toiletten) und am Gate sind angeraten, um eine Ver-/Einschleppung von kritischen Antibiotikaresistenzen und fakultativ pathogenen Erregern zu vermeiden.

Kernbotschaft 5: Die zu ergreifenden Maßnahmen für dezentrale und zentrale Kläranlagen müssen anhand von einheitlichen Kriterien priorisiert werden:

Die Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen sieht z.B. bei knapp 2000 Krankenhäusern eine flächendeckende Behandlung von Krankenhausabwässern als unrealistisch an. Bei knapp 100 Millionen m³ Abwasser/Jahr würden hiermit Kosten von ca. 200 Millionen € pro Jahr

anfallen. Aus diesem Grunde ist eine Priorisierung notwendig. Hierzu könnten nachfolgende Kriterien zählen:

- Der Vorfluter der Kläranlage hat eine besondere Schutzbedürftigkeit, z. B. Verwendung als Badegewässer, Rohwässer zur Trinkwasseraufbereitung
- Besonders große Kläranlagen (>500.000 Einwohner)
- Abwasseranteil der Kläranlagen im Abstrom, der größer als 50 % des Gesamtabflusses des Vorfluters ist.
- Kläranlagen mit hohem Klinikeinfluss und/oder mit hohem Antibiotikaeinsatz (oder ggf. Schlachtbetrieben), wenn keine dezentrale Behandlung vorhanden ist bzw. in Frage kommt. Ein Schwellenwert muss noch definiert werden.

Wenn Maßnahmen zur 4. Reinigungsstufe (Spurenstoffelimination) geplant sind, sollten auch Antibiotikaresistenzen in der Planung mitberücksichtigt werden, um Synergieeffekte zu nutzen. Zusätzlich sind weitere Maßnahmen im Kläranlageneinzugsgebiet - insbesondere bei Vorhandensein von Krankenhäusern mit hohem Antibiotikaeinsatz erforderlich, wie Behandlung dezentraler Abwasserströme und Maßnahmen zur Eintragsminderung aus Mischwasser-Entlastungen. Dabei ist die Identifikation besonders belasteter Indirekteinleiter z. B. Krankenhäuser, (ggfls. Schlachtbetriebe) von Bedeutung.

Kernbotschaft 6: Im Falle eines Befundes von coliformen Bakterien sollte das Trinkwasser auch auf Resistenzgene getestet werden.

Auch im Rahmen von HyReKA konnten vom Projektpartner TZW bereits einzelne Resistenzgene im Trinkwasser nachgewiesen werden, ohne dass resistente Bakterien im Roh- und aufbereiteten Trinkwasser kultiviert werden konnten. Aus Gründen des vorsorgenden Gesundheitsschutzes sollte unter Berücksichtigung der Bedeutung von Trinkwasser für den öffentlichen Gesundheitsschutz bei systemischen Auftreten von Coliformen im Trinkwasser eine Antibiotikaresistenzbestimmung durchgeführt werden.

Kernbotschaft 7: Gülle ist mit Antibiotikaresistenzgenen deutlich belastet. Diese molekularbiologischen Ergebnisse sind vergleichbar mit Belastungen aus Klinikabwässer. Kulturelle Nachweise waren nur vereinzelt möglich.

Gülleproben zeigen sich als deutlich mit Antibiotikaresistenzgenen auch gegen Reserveantibiotika belastet. Auch DNA-Marker fakultativ-pathogener Bakterien waren in signifikanten Abundanzen nachweisbar. Die Lagerdauer der Gülle betrug betriebsabhängig 3-7 Monate. Teilweise waren die Gülleproben molekularbiologisch sogar höher belastet als das Abwasser aus klinischen Bereichen (Publikation in Bearbeitung) und sind somit als kritisch für Belastung der Umwelt (Oberflächen-, Grundwässer, Bodenmikrobiologie) zu bewerten.

- Es konnten keine Korrelationen zwischen Tierbestand bzw. Betriebsgrößen und Belastungssituationen mit Genen fakultativ-pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen unterschiedlicher Kategorien nachgewiesen werden.
- Es zeigen sich unterschiedliche Risikopotentiale bei den untersuchten Mastbetrieben, gerade bei der Erfassung von Resistenzgenen gegen die Reserveantibiotika.

Rückstände von Tetracyclinen und Fluorchinolonen (Ciprofloxacin) waren in einigen Proben chemisch-analytisch nachweisbar, wobei die PNEC-Werte fast immer überschritten wurden.

- Die molekularbiologischen Ergebnisse konnten bislang nur sehr vereinzelt durch Anzucht von Antibiotika-resistenten Erregern verifiziert werden. Die isolierten Stämme zeigten eine geringere Multiresistenz als jene aus dem klinischen Abwasser.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass aus Risiko-regulatorischer Sicht weitere Untersuchungen notwendig sind, bevor weitergehende Konsequenzen aus den Ergebnissen gezogen werden können. Ein besonderer Fokus sollte auf den Einfluß auf die Bodenmikrobiologie, Auswirkungen von Run-off Ereignissen auf Oberflächenwässer und Sickerwässer, sowie eine Optimierung der Güllebehandlungen bei erhöhten Antibiotika- und Resistenzgen-Belastungen gelegt werden, um Risikopotentiale zu reduzieren.

9.2 Konsequenzen aus den Kernbotschaften des HyReKA-Forschungsprojekts

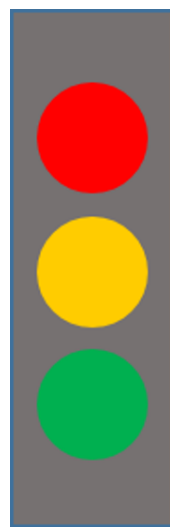
Es konnten Indikatoren für besonders kritisch zu wertende mikrobiologische Parameter festgelegt werden, bei deren Nachweis Maßnahmen zur Reduktion der Belastungen veranlasst werden sollten. Zentrale und/oder dezentrale Maßnahmen sind vor allem dann notwendig, wenn nachfolgend Schutzgüter (Badegewässer, Trinkwasserentnahmestellen, Entnahmestellen für landwirtschaftliche Bewässerung) betroffen sind.

- Als Screening-Indikatoren wird der kulturelle Nachweis von *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *E. faecium* festgelegt. Optional ist der Nachweis von *Acinetobacter baumannii*.
- Für den Nachweis von Multiresistenten Erregern wird eine Vorselektion auf „ESBL-Agarplatten“ festgelegt. Positive Befunde werden anschließend auf ihre Resistenz gegen die Präparatkombinationen Piperacillin + Tazobactam, Cefotaxim, Ceftazidim, Ciprofloxacin und Kombination aus Imipenem + Meropenem, unter Berücksichtigung Erreger-spezifischer intrinsischer Antibiotikaresistenzen überprüft.
- Als molekularbiologische Screening-Indikatoren werden Antibiotikaresistenzgene gegen Carbapeneme (*bla*NDM-1, *bla*KPC, *bla*VIM, *bla*OXA48), Colistin (*mcr*-1 bzw. *mcr*-1 bis 9 für den veterinären Bereich) und Vancomycin (*vanA/B*) festgelegt. Zusätzlich wurden qPCR-Nachweise für ausgewählte fakultativ-pathogene Bakterien durchgeführt: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* und *Enterococcus faecium* für ein Monitoring Verfahren festgelegt.
- Das Spektrum an Antibiotikarückständen sollte sich matrixabhängig (Abwasser oder Gülle) auf den Nachweis von Carbapenemen, Fluorchinolone, Tetracyclinen und Tylosin fokussieren. Optional ist der Nachweis von Sulfonamiden. Für den Nachweis von Antibiotikarückständen sind im klinischen Abwasser zusätzlich Piperacillin, Meropenem und Vancomycin in das Untersuchungsspektrum aufzunehmen. Wegen der Bedeutung der Metabolisierung von Enrofloxacin zu

Ciprofloxacin bei Zuchttieren wird der Nachweis von Fluorchinolonen in Abwässern aus der Tierzucht oder von Schlachtbetrieben empfohlen.

9.3 **Das Ampelprinzip zur Bewertung von Antibiotikaresistenzlagen ausgehend von den genannten Indikatoren**

Ein positiver molekularbiologischer Befund zu den genannten Resistenzgenen muss durch Kulturverfahren bestätigt werden, um einen Handlungsbedarf anzuzeigen. Hier wird ein Ampelprinzip vorgeschlagen mit Rot: Molekularbiologie + Kultur positiv; Gelb: Nur Molekularbiologie positiv; Grün: kein positiver Befund in Kultur und Molekularbiologie, d.h. kein Handlungsbedarf.



Rot: Molekularbiologie und Kultur positiv:
Handlungsbedarf

Gelb: Nur Molekularbiologie positiv:
Verifikation und Überprüfung

Grün: kein positiver Befund in Kultur und Molekularbiologie:
Kein Handlungsbedarf

Literatur

- Alexander, J.; Hembach, N.; Schwartz, T. Evaluation of antibiotic resistance situations in wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. (2020) Nature Sci. Rep. 10:8952
- Döhla, M.; Sib, E.; Dericks, B. et al. Assessment of the Prevalence of Antibiotic-Resistant Bacteria and the Concentration of Antibiotics in EU Bathing Waters in Western Germany. Expo Health (2019). <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00313-z>
- Exner, M.; Schmithausen, R.; Schreiber, C.; Bierbaum, G.; Parcina, M.; Engelhart, S.; Kistemann, T.; Sib, E.; Walger, P. & Schwartz, T. (2018): Zum Vorkommen und zur vorläufigen hygienisch-medizinischen Bewertung von Antibiotika-resistenten Bakterien mit humanmedizinischer Bedeutung in Gewässern, Abwässern, Badegewässern sowie zu möglichen Konsequenzen für die Trinkwasserversorgung. Hyg Med 43(5):46-54.
- 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, 2012-2015 Front Microbiol 8:1282.
- 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, *Sci Rep* 9:12843

- Heß, S.; Kneis, D.; Österlund, T.; Li, B.; Kristiansson, E.; Berendonk, T.U. (2019) Sewage from Airplanes Exhibits High Abundance and Diversity of Antibiotic Resistance Genes. *Environ Sci Technol.* 2019 Dec 3;53(23):13898-13905. doi: 10.1021/acs.est.9b03236.
- Jäger, T.; Hembach, N.; Elpers, C.; Wieland, A.; Alexander, J.; Hiller, C.; Krauter, G.; Schwartz, T. (2018): Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment, *Front Microbiol* 9:2599
- Kistemann, T.; Rind, E.; Rechenburg, A.; Koch, C.; Claßen, T.; Herbst, S.; Wienand, I.; Exner, M. (2008): A comparison of efficiencies of microbiological pollution removal in six sewage treatment plants with different treatment systems. *Int J Hyg Environ Health* 211:534–545.
- Müller, H.W.; Zacharias, N.; Timm, C.; Schreiber C.; Sib, E. et al. (in preparation): Antibiotic-resistant bacteria in the wastewater of clinical patient's wet rooms. (Arbeitstitel)
- Müller, H.; Sib, E.; Gajdiss, M.; Klanke, U.; Lenz-Plet, F.; Barabasch, V.; Albert, C.; Schallenberg, A.; Zacharias, N.; Schmithausen, R.; Engelhart, S.; Exner, M.; Parcina, M.; Schreiber, C. & G. Bierbaum (2018): Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiol Ecol* 94(5).
- Pärnänen, K.M.M.; Narciso-da-Rocha, C.; Kneis, D.; Berendonk, T.U.; Cacace, D.; Do, T.T.; Elpers, C.; Fatta-Kassinos, D.; Henriques, I.; Jaeger, T.; Karkman, A.; Martinez, J.L.; Michael, S. G.; Michael-Kordatou, I.; O'Sullivan, K.; Rodriguez-Mozaz, S.; Schwartz, T.; et al. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci Adv.* 2019 Mar 27;5(3):eaau9124. doi: 10.1126/sciadv.aau9124.
- Savin, M.; Bierbaum, G.; Hammerl, J. A.; Heinemann, C.; Parcina, M.; Sib, E.; Voigt, A.; Kreyenschmidt, J.: Isolation and characterization of ESKAPE-bacteria and ESBL-producing *E. coli* from waste- and process water of German poultry slaughterhouses *J.AEM.02748-19* [pii] 10.1128/AEM.02748-19
- Schreiber, C.; Essert, S. M.; Zacharias, N.; Schmithausen, R. et al. (in preparation): Adaption and Advancement of Clinical Detection Systems by Cultural Report of VRE, MRSA and ESBL-Producers in Aquatic-Environmental Samples. (Arbeitstitel)
- Schreiber, C.; Heinkel, S.-B.; Zacharias, N.; Mertens, F.M.; Christoffels, E.; Gayer, U.; Koch, C.; Kistemann, T. (submitted): Infectious rain? – Evaluation of human pathogens' concentrations in stormwater collected by separate sewer systems. *Water Sci Tech.*
- Schreiber, C. (2019): Antibiotikaresistenzen in Abwasser und Gewässern - Einträge, Vorkommen, Verbreitung und gesundheitliche Bedeutung antibiotikaresistenter Bakterien in der aquatischen Umwelt. (= Geographische Gesundheitsforschung - Geographical Health Research Band 4), Shaker Verlag, Bonn/Berlin.
- Schreiber, C.; Rechenburg, A.; Koch, C.; Christoffels, E.; Claßen, T.; Willkomm, M.; Mertens, F. M.; Brunsch, A. F.; Herbst, S.; Rind, E. & T. Kistemann (2016): Two decades of system-based hygienic–microbiological research in Swist river catchment (Germany). *Environ Earth Sci* 75: 1393.

- Schreiber, C.; Rechenburg, A.; Rind, E. & T. Kistemann (2015): The impact of land use on microbial surface water pollution. *Int J Hyg Environ Health* 218:181-187.
- Schreiber, C.; Kistemann, T. (2013): Antibiotic resistance among autochthonous aquatic environmental bacteria. *Water Sci Tech* 67:117–123.
- Sib, E.; Voigt, A. M.; Wilbring, G.; Schreiber, C.; Faerber, H. A.; Skutlarek, D.; Parcina, M.; Mahn, R.; Wolf, D.; Brossart, P.; Geiser, F.; Engelhart, S.; Exner, M.; Bierbaum, G.; Schmithausen R. M. (2019): Antibiotic-resistant bacteria and resistance genes in biofilms in clinical wastewater networks. *Int J Hyg Environ Health*. 222: 655-662.
- Stange, C.; Yin, D.; Xu, T.; Guo, X.; Schäfer, C.; Tiehm, A. (2019): Distribution of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China. *Sci. Total Environ*. 655:337-346.
- Stott, R.; Tondera, K.; Blecken, G.-T.; Schreiber, C. (2018): Chapter IV - Microbial loads and removal efficiency under varying flows. Tondera, K.; Blecken, G.-T.; Chazarenc, F.; Tanner, C.C. (Hrsg.) *Ecotechnologies for the treatment of variable wastewater and stormwater flows*. Springer Verlag.
- Tondera, K.; Ruppelt, J. P.; Pinnekamp, J.; Kistemann, T.; Schreiber C. (2019): Reduction of micropollutants and bacteria in a constructed wetland for combined sewer overflow treatment after 7 and 10 years of operation. *Sci Total Environ* 15; 651(1): 17-927.
- Voigt, A.M.; Faerber, H.A.; Wilbring, G.; Skutlarek, D.; Felder, C.; Mahn, R.; Wolf, D.; Brossart, P.; Hornung, T., Engelhart, S.; Exner, M., Schmithausen, R.M. (2019): The occurrence of antimicrobial substances in toilet, sink and shower drainpipes of clinical units: A neglected source of antibiotic residues. *nt J Hyg Environ Health*. 222(3):455-467. doi: 10.1016/j.ijheh.2018.12.013..
- Voigt, A.M.; Ciorba, P.; Döhla, M.; Exner, M.; Felder, C.; Lenz-Plet, F.; Sib, E.; Skutlarek, D.; Schmithausen, R.M.; Faerber, H.A. The investigation of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and antibiotic-resistant organisms in a drinking water reservoir system in Germany. *Int J Hyg Environ Health*. 2020 Mar;224:113449. doi: 10.1016/j.ijheh.2020.113449.
- WHO (2014): Antimicrobial resistance: global report on surveillance. URL: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>, (abgerufen 09.01.2019).