



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

HyReKA

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

Vorläufiger Synthese- und Abschlussbericht

Stand Juli 2020

Bonn, Karlsruhe, Dresden, Aachen, Bad Elster 2020

Verbundpartner**Projektleitung**

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

Projektkoordination

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 Universität
Bonn / Universitätsklinikum Bonn
Telefon: +49 228 287 13452; Fax: +49 228 287 15645
ricarda.schmithausen@ukbonn.de

Forschungspartner**Karlsruher Institut für Technologie (KIT)**

Hermann-von Helmholtz Platz 1
76344 Eggenstein-Leopoldshafen

Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)

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

**Universitätsklinikum Bonn**



**Institut für Hygiene und öffentliche Gesundheit
(IHPH)**

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Exner
Venusberg-Campus 1
53127 Bonn

Ansprechpartner: Dr. med. Dr. h.c. M. Exner
Tel: +49 228287-15520; Fax 49 228287-16545
martin.exner@ukbonn.de

Dr. C. Schreiber

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

Fax: +49 228 287-19516

Christiane.Schreiber@ukbonn.de (AG Med Geo)

Prof. Dr. T. Kistemann

Tel: +49 228 28714885 Fax: +49 228 287-19516

Thomas.Kistemann@ukbonn.de (AG Med Geo)

Dr. H. Färber

Tel: +49 228 2871-6864, Fax: +49 228 2871 -1144

Harald.Faerber@ukbonn.de (Wasserchemie)

Prof. Dr. med. S. Engelhart

Tel.: +49 228 2871-4434, Fax. + 48 228 2871-5645

Steffen.Engelhart@ukbonn.de (Abt.

Krankenhaushygiene)

IMMIP

**Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Immunologie und Parasitologie (IMMIP)**

Venusberg-Campus 1
53127 Bonn

Ansprechpartner: Prof. Dr. G. Bierbaum

Tel. 228-2871 9103; Fax 228-2871 4808

g.bierbaum@uni-bonn.de

Dr. M. Parcina

Tel.: +49 228 2871 5952

parcina@uni-bonn.de



Universität Bonn

food.net.center**bonn**



International FoodNetCenter (FNC)

Fokusgruppe „Food Waste“

Institut für Ernährungs- und
Lebensmittelwissenschaften (IEL),
Lebensmittelverfahrenstechnik

Katzenburgweg 7-9

53115 Bonn

Ansprechpartner: Prof. Dr. Judith Kreyenschmidt,

Tel.: +49 228 733886, Fax.: +49 228 732617

j.kreyenschmidt@uni-bonn.de

Fokusgruppe „One Health“

Institut für Tierwissenschaften (ITW), Präventives
Gesundheitsmanagement

Katzenburgweg 7-9

53115 Bonn

Ansprechpartner: Prof. Dr. Brigitte Petersen

Tel.: +49 228 732821, Fax.: +49 228 736517

b-petersen@uni-bonn.de

Dr. Julia Steinhoff-Wagner

Tel.: +49 228 731977, Fax.: +49 228 736517

jste@itw.uni-bonn.de



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: +49 351-463 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

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@xyleminc.com

Das Verbundprojekt „HyReKA“ wird vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) als Teil der Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf (RiSKWa)“ unter dem Förderkennzeichen 02WRS1377A-K gefördert. Es wird betreut vom Projektträger Karlsruhe (PTKA).

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



PTKA
Projektträger Karlsruhe

Karlsruher Institut für Technologie

Inhalt

Abkürzungen	X
Zusammenfassung	XII
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.....	16
2 Teilprojekt: Kommunale Kläranlagen, Eliminationsverfahren	18
2.1 Teilbereich: Kommunale Kläranlagen und Schlachthöfe	19
2.1.1 Ergebnisse aus: Kommunale Kläranlagen und Schlachthöfe	19
2.2 Teilbereich: Erweiterte Abwasserbehandlungsverfahren.....	20
2.2.1 Ergebnisse aus: Erweiterte Abwasserbehandlungsverfahren.....	21
2.3 Nachweis von fakultativ-pathogenen Bakterien im Vorfluter.....	21
2.4 Schlussfolgerung das Teilprojekt: Kommunale Kläranlagen, Elimination.....	22
2.5 Veröffentlichungen im Teilprojekt: Kommunale Kläranlagen, Eliminationsverfahren	22
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	37
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	42
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)	49
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: Risikoregulatorische Konsequenzen.....	53
7.1	Ausgangspunkt: Derzeitige regulatorische Maßnahmen	54
7.2	Zielstellung.....	56
7.3	Risikoregulatorische Konsequenzen	56
7.3.1	Risikoabschätzung und Risikobewertung im Verbundprojekt HyReKA ..	57
7.3.2	Risikomanagement: Maßnahmeoptionen, einschließlich der Ansätze zur möglichen rechtlichen Umsetzung	60
7.4	Literaturverzeichnis	67
8	Synthese aller Kernbotschaften und Indikatoren zur Bewertung von Belastungssituationen.....	71
8.1	Überblick und Zusammenfassung aller Kernbotschaften aus den Teilprojekten	72
8.2	Konsequenzen aus den Kernbotschaften des HyReKA-Forschungsprojekts..	77

8.3 Das Ampelprinzip zur Bewertung von Antibiotikaresistenzlagen ausgehend von den genannten Indikatoren 77

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> Typ	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A gene Typ
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 Eintragungspfade 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, einher geht (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 Erwerben 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 (Medizinern, Biologen, Geografen, Ingenieure, Agrarwissenschaftlern, Lebensmitteltechnologern 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 zur 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 Rohwasser 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) 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.
- 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., submitted).
- 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). Die Typisierung 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. Für Pseudomonaden war dies nicht über alle Stationen der Fall und die Art *E. coli* zeigte eine große Stammvielfalt.
- 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., submitted).

- 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 Testorganismus und die minimalen selektiven Konzentrationen von Ciprofloxacin und Clindamycin lagen im Bereich der gemessenen Höchstkonzentration in den Abflüssen.

1.1.2 Schlussfolgerung für das Teilprojekt Klinikabwasser

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

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., Zaccharias N., Müller H., Schmithausen R.M., Exner M.,

- Kreyenschmidt J., Schreiber C., Schwartz T, Parcina M.**, Bierbaum G.**: Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Science of the Total Environment*, Submitted. *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>secE</i>	5% aller klinischen Infektionen
<i>K. pneumoniae</i>	<i>gltA</i>	4,5% aller klinischen Infektionen
<i>P. aeruginosa</i>	<i>ecfX</i>	5,8% aller klinischen Infektionen
<i>E. coli</i>	<i>yccT</i>	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 Antibiotikaresistenzgen-trägern 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 Antibiotika-resistenten 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 HAMRSA 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, Polymixine) aufweisen, in Prozesswässern und Abwasser von Geflügel- und Schweineschlachthöfen ist besorgniserregend. Eine Kolonisierung bzw. abhängig von individuellem Gesundheitszustand und der Expositionsintensität 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 direkte leitende 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 Antibiotikaresistenten 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, 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, Schmogger 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.** (submitted): 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 Phenicole, 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-unbeeinflusstes, 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 (Erfurt).

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 Trennkanalesationen ist nicht frei von ARB und anderen Krankheitserregern. Ursache hierfür sind u.a. Fehlan schlüsse 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 die 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 Fehlan schlüssen 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. (submitted): Antibiotic-resistant bacteria in clams – as study on mussels in the river Rhine. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*.

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.** (submitted): Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Science of the Total Environment*. *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.

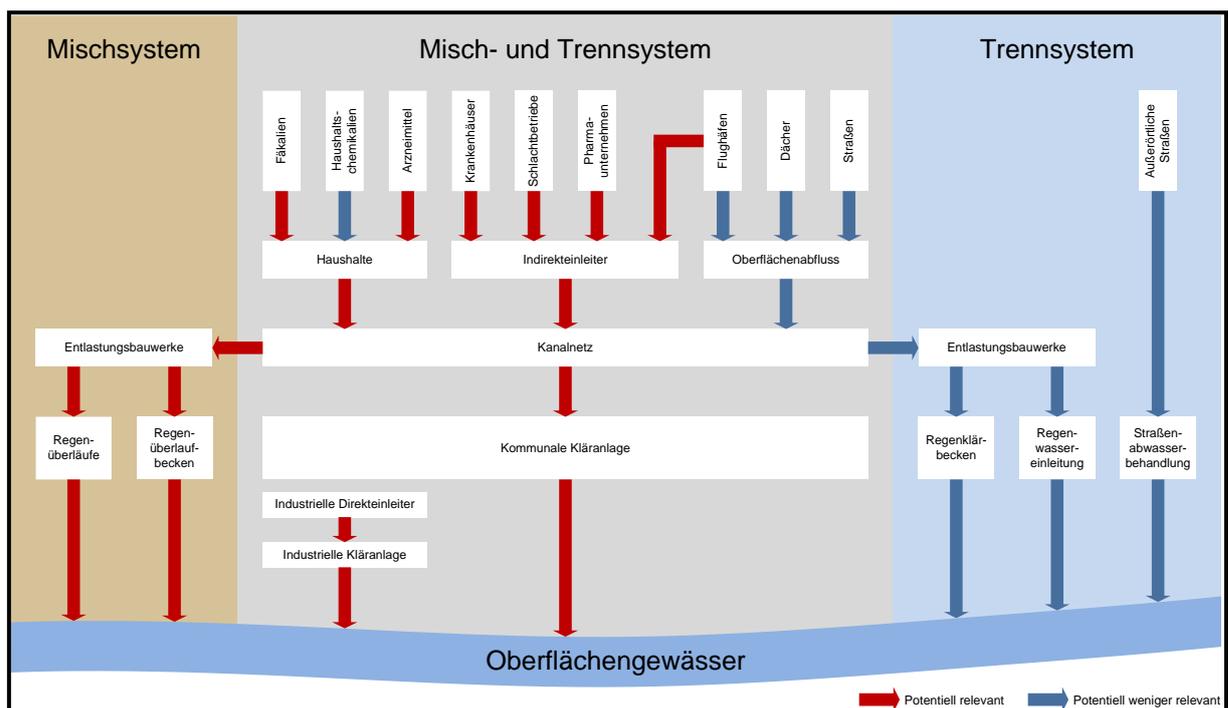


Abbildung 1: Urbane Eintragspfade von Antibiotikaresistenzen in Oberflächengewässer

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 Gewässereintragspfad (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 2 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 2: 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 Fehlschlussquote geachtet werden muss.

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

In Tabelle 3 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 3: 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: 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.

7.1 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. 2). 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.

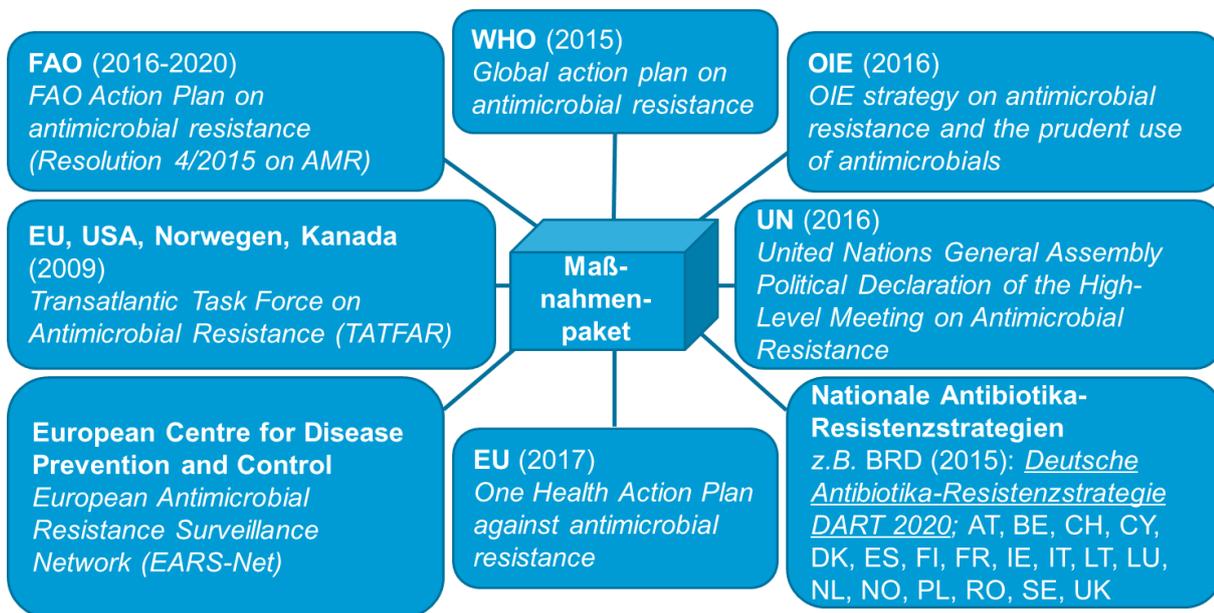


Abbildung 2: Auswahl an weltweiten Strategien zur Eindämmung von Antibiotikaresistenzen

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; Anwendung ab Dez. 2021/Jan. 2022) 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 Arzneifuttermitteln, 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; Anwendung ab Dez. 2021/Jan. 2022) 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 antimikrobieller Resistenzen wird durch den „Durchführungsbeschluss 2013/652/EU der Kommission vom 12. November 2013 zur Überwachung und Meldung von Antibiotikaresistenzen bei zoonotischen und kommensalen Bakterien“ (ABl. L 303 vom 14.11.2013, S. 26-39) geregelt.

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

Durch das eingeführte Antibiotikamonitoring inklusive der daraus abgeleiteten möglichen Konsequenzen (Maßnahmenplan) wird die Antibiotikaminimierung als Aufgabe des Tierhalters herausgestellt. Die aktuelle systematische Überprüfung des Antibiotikaeinsatzes ermöglicht zunehmend, Ursachen zu identifizieren und erweitert dafür die Befugnisse der Tierarzneimittelüberwachung

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.

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

7.2 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. Die wissenschaftlichen Erkenntnisse des Forschungsprojektes können dadurch letztendlich über das Element des Risikomanagements in den regulativen Bereich umgesetzt werden.

7.3 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. 3) 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 Maßnahmooptionen identifiziert und bewertet werden.

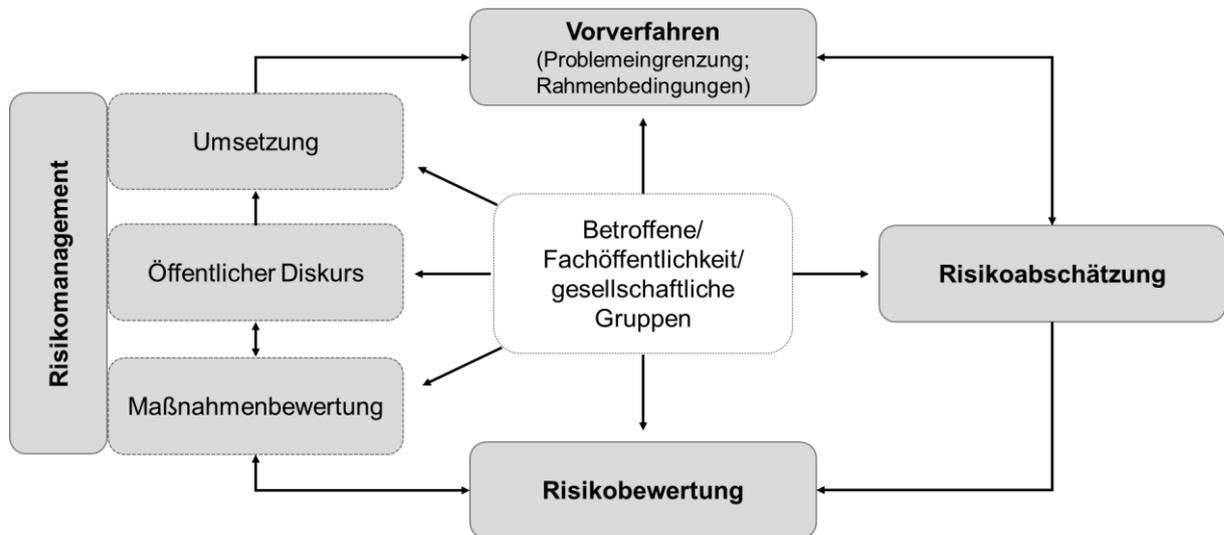


Abbildung 3: Prozess der Risikoregulierung (Risikokommission 2003).

7.3.1 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** stellt für zukünftige Untersuchungen und anstehende Monitoringprogramme eine fundierte Grundlage dar, 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 Fehlanschlüssen 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 in der Humanmedizin als Reserveantibiotika gelisteten Colistins zur Bestandsbehandlung (in drei der 40 Betrieben drei Monate vor der Probenahme) als auch der Einsatz des Fluorchinolons Enrofloxacin (in einem der 40 Betrieben drei Monate vor der Probenahme (siehe hierzu den Berichtsabschnitt „Landwirtschaftliche Nutztierhaltung und Abwässer aus Geflügel- und Schweineschlachthöfen“ des vorliegenden Synthese- und Abschlussberichtes)). Enrofloxacin, ein Antibiotikum der Veterinärmedizin mit breitem antibakteriellem Wirkspektrum 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 *Predicted No Effect Concentrations for resistance selection* (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 Ciprofloxacinkonzentration 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*)) in höheren Frachten als Siedlungsgebiete; hohe Erreger-Dichte; starke Korrelation zwischen fakultativ-

pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen gegen Reserveantibiotika (siehe Müller et al. 2018, Schreiber 2019, Alexander et al. 2019 und 2020, Sib et al. 2019 und 2020, Voigt et al. 2020)) 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)) / sowie **Abwässer weiterer lebensmittelverarbeitender Betriebe** (z. B. Molkerei; Alexander et al. 2019)

Schwerpunktemittenten darstellen, die zu einer erhöhten Belastung mit antibiotikaresistenten Bakterien in der nachgeschalteten Kanalisation und den Kläranlagen führen. Dies ist insbesondere von Bedeutung im Hinblick auf die unzureichende Eliminierung von antibiotikaresistenten Bakterien, deren 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 den Kläranlagenabläufen für einige untersuchte Antibiotika die detektierten Höchstkonzentrationen über den minimalen selektiven Konzentrationen lagen (Piperacillin, Meropenem) oder diese erreichten (Ciprofloxacin, Clindamycin; Voigt et al. 2020), 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 ebenfalls für einen bedeutenden Eintrag von Resistenzen, fakultativ-pathogenen Bakterien und Antibiotikarückständen in die Umwelt verantwortlich sind (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).

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.

7.3.2 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 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.

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).

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.

Hinsichtlich der Antibiotikarückstände sind die minimalen selektiven Konzentrationen bzw. *Predicted No Effect Concentrations for resistance selection* (PNEC_{resistance selection}) (siehe hierzu Bengtsson-Palme und Larsson 2016) in die Entscheidungen zur Festlegung von Grenzwerten einzubeziehen. 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*, optional *Acinetobacter baumannii* 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 (*vanA/B*).

Für ein regelmäßiges Monitoring eignen sich 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

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).

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 unzureichenden Eliminierung von antibiotikaresistenten Keimen, deren 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 wird, dass Gefahren für die menschliche Gesundheit durch Krankheitserreger nicht entstehen“. Hierbei sollten **Maßnahmen in den folgenden, priorisierten Fällen** getroffen werden:

- 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 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. Dabei sind für Antibiotikarückstände die minimalen selektiven Konzentrationen bzw. die *Predicted No Effect Concentrations for resistance selection* (PNEC_{resistance selection}; Bengtsson-Palme und Larsson 2016) in den Betrachtungen zur Festlegung von Grenzwerten einzubeziehen. Im Hinblick auf das Vorhandensein von Antibiotikarückständen sind anhand der Projektergebnisse Nachweise der folgenden Antibiotika im Abwasser anzuraten: 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 für Antibiotikaresistenzen die Mikroorganismen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *E. faecium*, optional *Acinetobacter baumannii* (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. Daher ist die Aufnahme dieser als Bewertungskriterien in der nationalen Abwasserverordnung (AbwV) zu empfehlen.

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.

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).

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).

Technische Aufrüstung/Verbesserungen der Mischkanalisation

Bei Vorliegen einer **Mischkanalisation** sind dringend 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 Eintragspfade 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 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

Anhand des im Projekt entwickelten **Methodenkompodiums** können die entsprechenden **Überwachungsbehörden der Bundesländer** 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.

Geeignete **Screeningindikatoren** hierfür sind die in HyReKA ermittelten:

- 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 (*vanA/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. Auf europäischer Ebene wäre eine zukünftige Einbeziehung der in HyReKA ermittelten priorisierten und bisher noch nicht in der EU-Beobachtungsliste adressierten Antibiotikawirkstoffe in den

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.

Aktualisierungsprozess der **EU Beobachtungsliste** („*Watch List*“; „Durchführungsbeschluss (EU) 2015/495 der Kommission“) wünschenswert; auf nationaler Ebene eine entsprechende Anpassung der Oberflächengewässerverordnung (OGewV)⁸.

Die hygienische Qualität von Badegewässern wird durch die **EG-Badegewässerrichtlinie**⁹ 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 Döhla et al. (2020) zwar fest, dass Badegewässer, die den Anforderungen der EG-Badegewässerrichtlinie entsprachen, keine hohe Belastung mit Antibiotikaresistenzen und Antibiotikarückständen aufwiesen. Jedoch sollten in einem systematischen Monitoring 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 eine Ergänzung 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: Untersuchung auf Resistenzgene, wenn coliforme Bakterien vorliegen

Im Trinkwasser waren einzelne Resistenzgene, aber keine kultivierbaren resistenten Bakterien nachweisbar (siehe Ergebnisse TZW). Aufgrund der Ergebnisse aus HyReKA ist im Trinkwasser die Testung auf Resistenzgene sinnvoll, sobald hier coliforme Bakterien vorhanden sind. Eine gesetzliche Verankerung hierfür wäre in der „Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV)“¹⁰ zu berücksichtigen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zum Schutz der Gesundheit, aufgrund der in HyReKA ermittelten Daten, die Umsetzung der vorgeschlagenen Maßnahmen (siehe auch Abb. 4) anzuraten ist, 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. Derartige Maßnahmen lassen sich nicht von einzelnen Interessenvertretern alleine umsetzen, viel mehr ist ein konstruktives

⁸ „Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer (Oberflächengewässerverordnung - OGewV)“, Oberflächengewässerverordnung vom 20. Juni 2016 (BGBl. I S. 1373), die durch Artikel 255 der Verordnung vom 19. Juni 2020 (BGBl. I S. 1328) geändert worden ist.

⁹ „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).

¹⁰ „Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV)“, Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459), die zuletzt durch Artikel 99 der Verordnung vom 19. Juni 2020 (BGBl. I S. 1328) geändert worden ist.

Miteinander aller Betroffenen anzustreben. Es erscheint daher ratsam, den Dialog zu suchen und beispielsweise mit der Einrichtung eines Runden Tisches für alle Interessenvertreter zu starten.

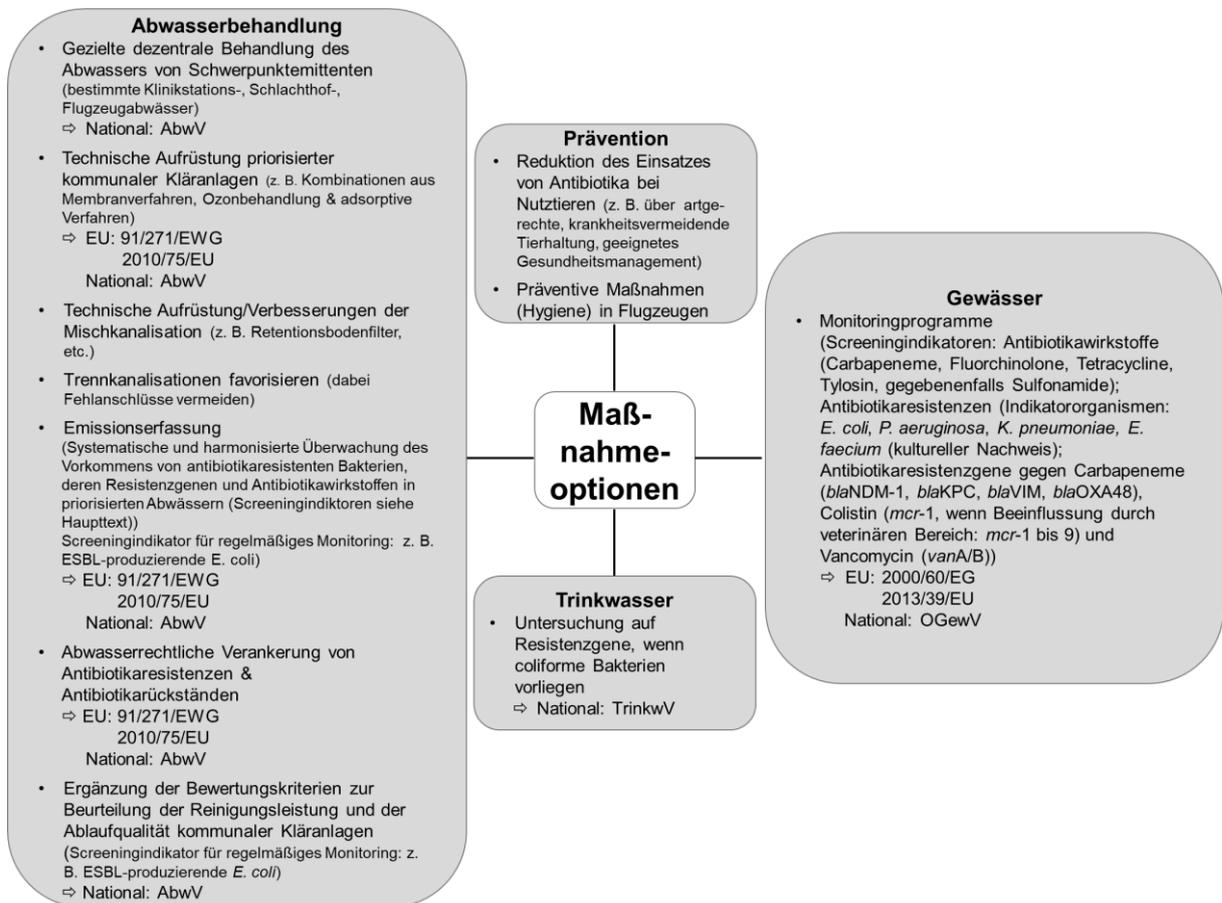


Abbildung 4: Übersicht zu den empfohlenen Maßnahmooptionen mit Angabe der Rechtsgrundlagen, über welche die vorgeschlagenen Maßnahmen in den regulativen Bereich umgesetzt werden können.

7.4 Literaturverzeichnis

- 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.
- 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.
- 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.

- 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-Liévana, 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.

- 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.; Parčina, M.; Bierbaum, G. (2020): Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Sci Total Environ.* 746:140894.
- 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-arzneimittelruetzen>), 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.
- 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.

8 Synthese aller Kernbotschaften und Indikatoren zur Bewertung von Belastungssituationen

8.1 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 Lebensmittel-verarbeitenden 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. 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 dem 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 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 Badegewässer 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 einige Wirkstoffe praktisch vollständig zurückgehalten, z.B. konnten Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Clarithromycin 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).

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 Phenicol, 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 (oder ggf. Schlachtbetriebe), 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 erforderlich, wie Behandlung dezentraler Abwasserströme und Maßnahmen zur Eintragsminderung aus Mischwasser-Entlastungen. Dabei ist die Identifikation besonders belasteter Indirekteinleiter z. B. Krankenhäuser, 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.

8.2 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 auf den Nachweis von Carbapenemen, Fluorchinolone, Tetracyclin und Tylosin fokussieren. Optional ist der Nachweis von Sulfonamiden. Für den Nachweis von Antibiotikarückständen sind im klinischen Abwasser zusätzlich Piperacillin, Tazobactam, Cefotaxim, Meropenem und Imipenem in das Untersuchungsspektrum aufzunehmen

8.3 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: Verifikation und erneute Überprüfung; Grün: kein positiver Befund in Kultur und Molekularbiologie, d.h. kein Handlungsbedarf.



Rot: Molekularbiologie + Kultur positiv:
Handlungsbedarf

Gelb: Nur Molekularbiologie positiv:
Verifikation und Überprüfung

Grün: keine positiver Befund in Kultur und Molekularbiologie
Kein Handlungsbedarf

Literatur zum Kapitel

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.; 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 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).