

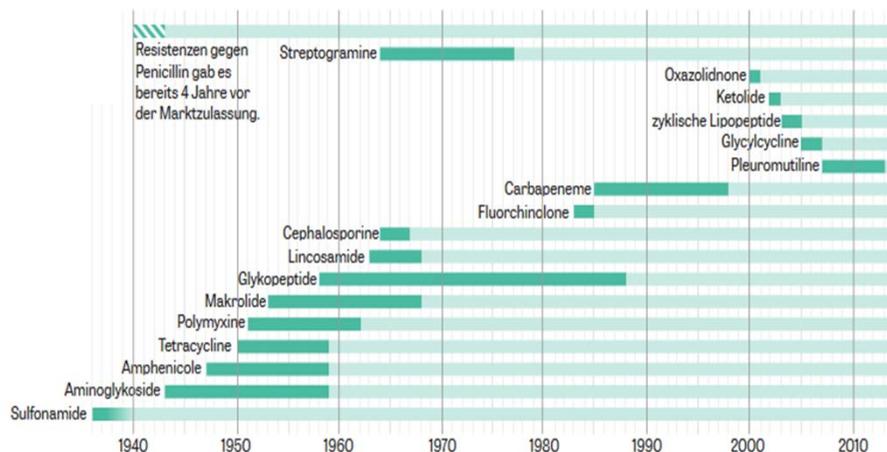
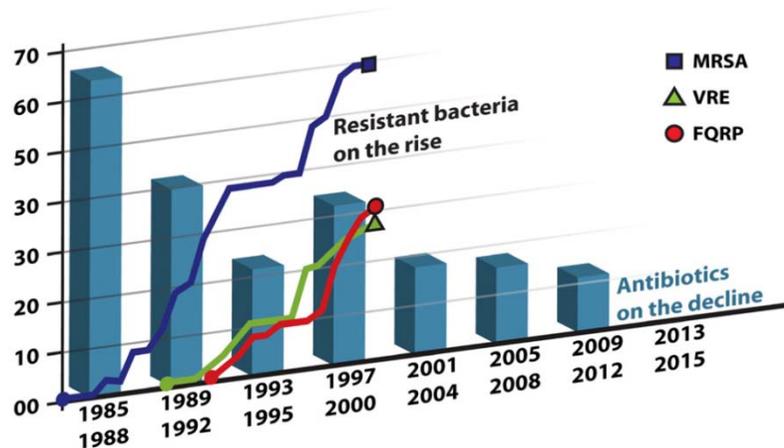
# Auftreten, Verbreitung und Elimination von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen in aquatischen Nutzungspfaden

Prof. Dr. Thomas Schwartz

Karlsruher Institut für Technologie (KIT, Campus Nord)  
Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)  
Abteilung Bioprozesstechnik und Biosysteme



# Antibiotikaresistenz-Situation



## Aussage der WHO:

Antibiotikaresistenzen sind ein **wachsendes Problem** im Bereich Wasser- und Abwassersysteme, sowie Hygiene:

„Als Resultat des jahrelangen Ge- und **Missbrauchs von Antibiotika** [...] sind resistente Bakterien sowie deren antimikrobiellen **Resistenzgene weit verbreitet** in der aquatischen Umwelt [...], in der sie auch über längere Zeiträume **persistieren** können.“

## Wissenslücken im Umweltbereich:

- mikrobielle Umweltbelastung **unklar**
- **keine** Vorschriften
- **keine** Grenzwerte
- **keine** Information über den Zusammenhang zwischen Infektionsereignissen und der aquatischen Umwelt

# Wichtige mikrobiologische Parameter

## Antibiotikaresistenzgene und Pathogene von medizinischer Bedeutung

**Methicillin**-Resistenz (*mecA*) in **Staphylokokken**

**21,7%** aller *S. aureus* Infektionen

**Ampicillin**-Resistenz (*ampC*) in **Enterobacteriaceae**

**51,2%** aller *E. coli* Infektionen

**Vancomycin**-Resistenz (*vanA*) in ***E. faecium/faecalis***

**18,5%** aller *E. faecium* Infektionen

**Imipenem**-Resistenz (*blaVIM*)

**11,6%** aller *P. aeruginosa* Infektionen

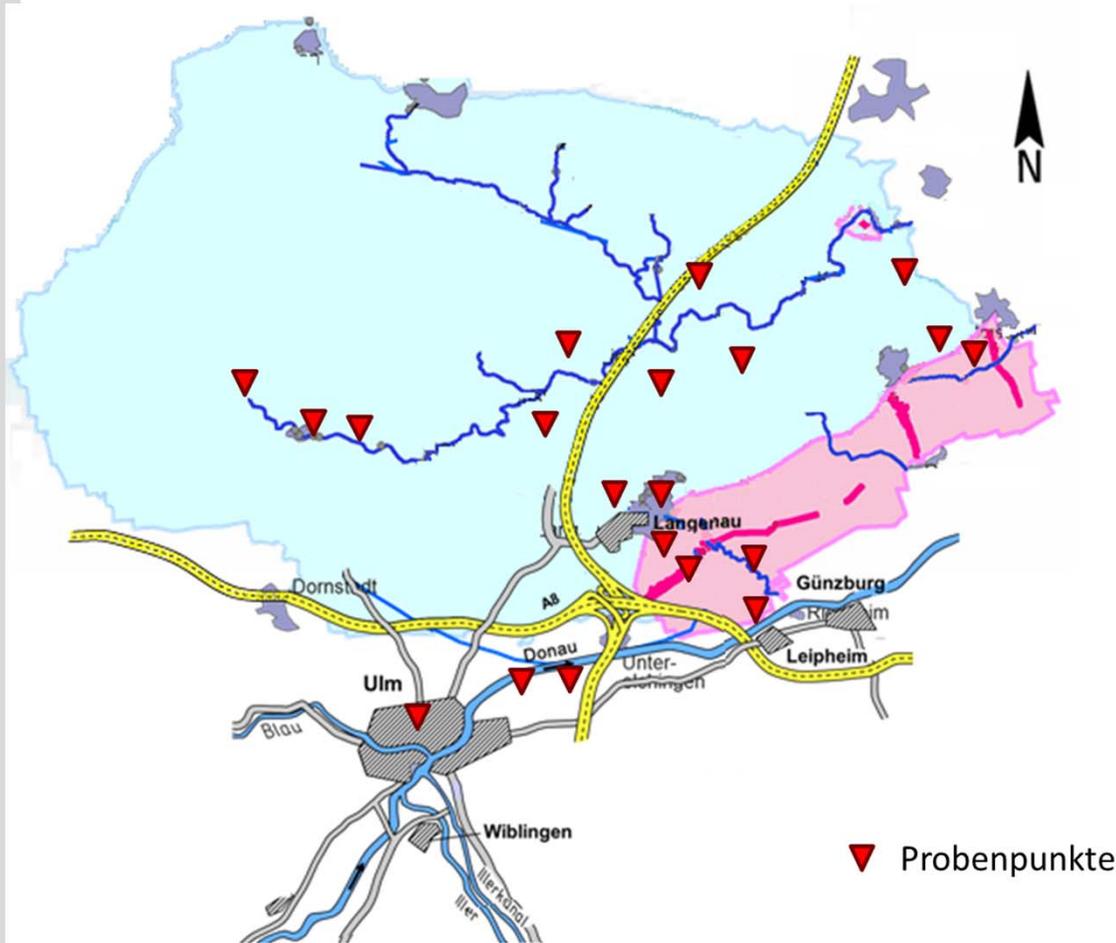
**Erythromycin**-Resistenz (*ermB*)

**62,9%** aller *S. pneumoniae* Infektionen



Robert Koch-Institut: ARS, <https://ars.rki.de>, Daten vom: 28.01.2014

# Modellregion: Wasser-Schutzgebiet Donauried



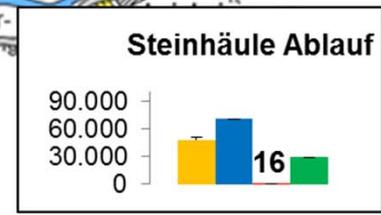
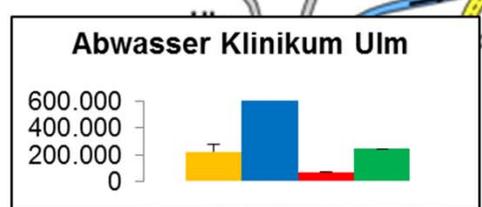
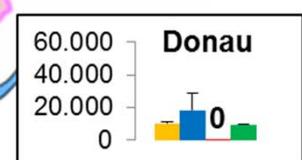
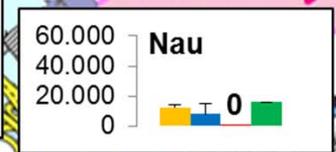
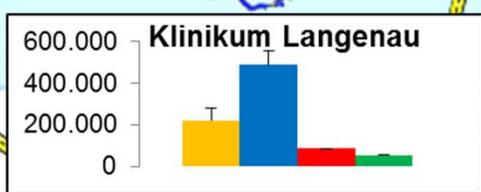
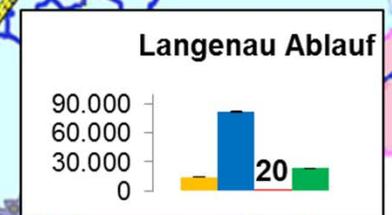
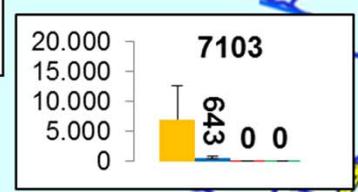
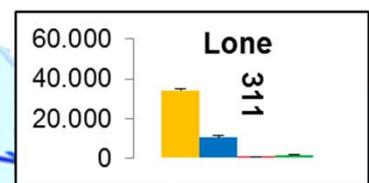
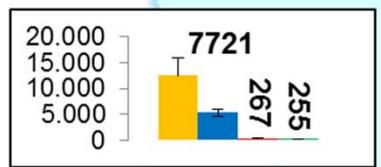
Untersucht werden:

- Hospitalabwässer
- Kläranlagen (Ein- und Auslauf)
- Vorfluter
- Regenüberlaufbecken
- Grundwasser

Alexander et al. (2015) Science of Total Environment

# Auftreten von fakultativ pathogenen Bakterien

**Zelläquivalente pro 100 ng Gesamt-DNA**  
**Enterobakterien**  
**Enterokokken**  
**Staphylokokken (Methicillin resistent)**  
**Pseudomonas aeruginosa**



Alexander et al., 2015)

# Antibiotikaresistenzlage

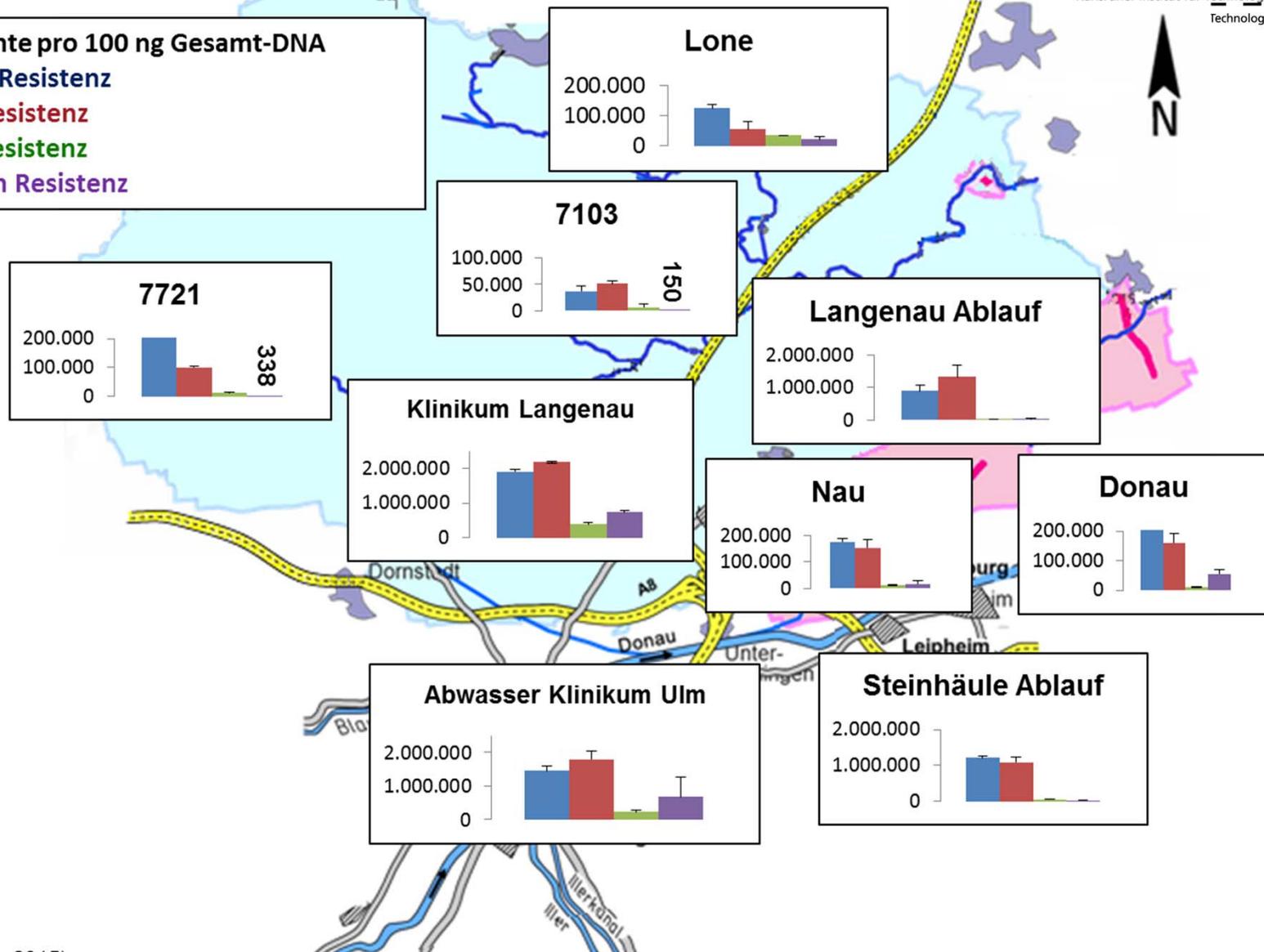
Zelläquivalente pro 100 ng Gesamt-DNA

Vancomycin Resistenz

Imipenem Resistenz

Ampicillin Resistenz

Erythromycin Resistenz



Alexander et al., 2015)

# Antibiotikaresistenzen und opportunistischen Bakterien: ein Populations-basierter Ansatz (in 100 ng DNA der Biomasse)

Gezeigt  $\log_{10}$  Werte aus 6 Probennahmen über 1,5 Jahre

<b>Antibiotikaresistenzgene</b>	<i>blaVIM</i>	<i>vanA</i>	<i>ampC</i>	<i>ermB</i>
<b>Krankenhausabwässer</b>	5.23 ±0.25	5.34 ±0.95	4.31 ±0.85	5.20 ±0.39
<b>Kläranlagen</b>				
KA 1, Zulauf	5.14 ±1.85	4.01 ±0.89	4.13 ±1.06	5.65 ±1.45
KA 1, Ablauf	5.35 ±1.52	4.87 ±0.76	4.49 ±0.98	3.91 ±1.47
KA 2, Zulauf	4.43 ±0.96	4.24 ±0.15	4.04 ±0.60	5.30 ±0.95
KA 2, Ablauf	5.59 ±0.06	5.30 ±0.15	4.87 ±0.50	4.50 ±0.98
<b>Oberflächengewässer</b>				
Gewässer 1	4.82 ±0.94	5.07 ±0.77	4.81 ±0.88	4.93 ±2.11
Gewässer 2	4.53 ±0.72	4.67 ±0.87	4.72 ±1.04	4.93 ±1.62
Gewässer 3	5.07 ±0.96	5.09 ±0.57	4.92 ±0.76	5.40 ±1.53
<b>Opportunistische Bakterien</b>	<i>P. aeruginosa</i>	Enterokokken	Enterobakterien	Staphylokokken
<b>Krankenhausabwasser</b>	4.75 ±0.29	4.93 ±0.17	4.30 ±0.95	4.58 ±1.08
<b>Kläranlagen</b>				
KA 1, Zulauf	4.28 ±1.25	5.62 ±0.79	4.13 ±1.06	1.57 ±0.03
KA 1, Ablauf	4.63 ±1.23	4.58 ±0.74	4.49 ±0.98	2.08 ±0.16
KA 2, Zulauf	3.46 ±0.14	5.47 ±0.79	4.04 ±0.60	2.45 ±0.13
KA 2, Ablauf	4.69 ±0.05	4.76 ±0.47	4.87 ±0.50	1.58 ±0.79
<b>Oberflächengewässer</b>				
Gewässer 1	4.84 ±1.17	4.99 ±1.13	4.81 ±0.88	0.43 ±0.12
Gewässer 2	4.62 ±1.13	5.04 ±0.73	4.72 ±1.04	1.86 ±0.93
Gewässer 3	4.78 ±0.65	5.45 ±0.53	4.92 ±0.76	1.28 ±0.53

# Mikrobielle Analysen:

Klinikabwasser

Kläranlagen

Oberflächenwasser

Regenklär- und  
Überlaufbecken

Grundwasser

Rohwasser

Antibiotikaresistenzen  
Fakultativ Pathogene

Klinik- und Kläranlagenabwässer: häufigster Nachweis von Antibiotikeresistenzen und fakultative Pathogenen

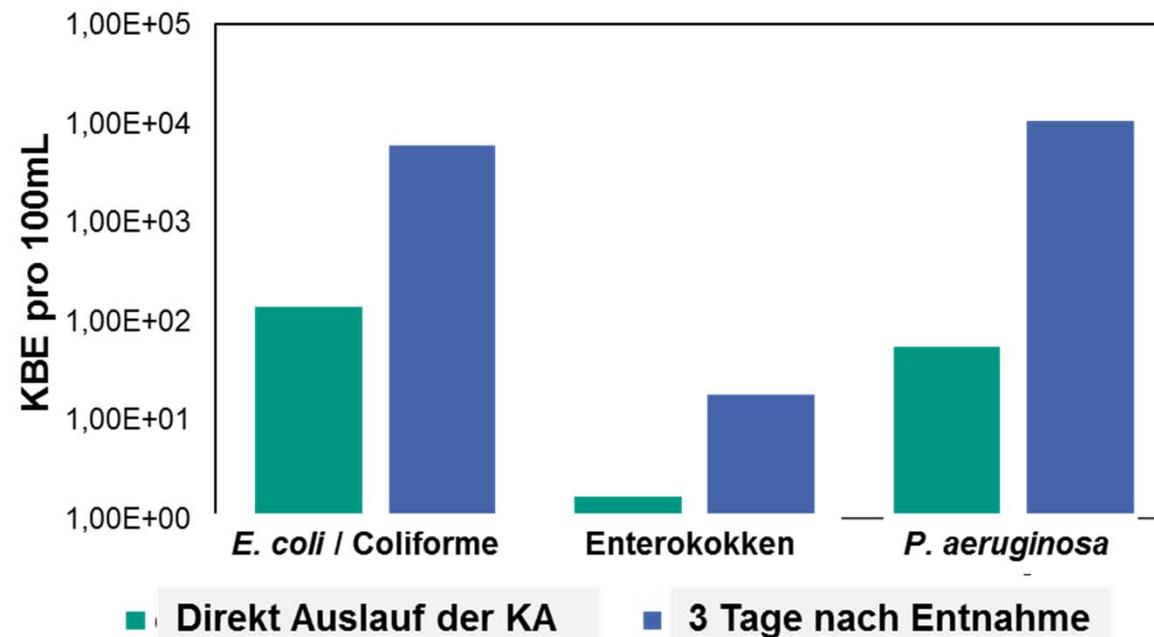
Donau: stärkster Kläranlageneinfluss erkennbar

Starkregenereignisse schwemmen Bakterien aus Gülle/Jauche von Feldern und Viehweiden

Einfluss von Sickerwasser?

nur Spuren von Enterokokken-DNA und vanA-Gen

## Anders als chemische Kontaminationen besitzen Bakterien ein Vermehrungspotential



„Regrowth“ im original Wasser ohne Zugabe von Nährstoffen

# Zusammenfassung 1

- Gerade **Population-basierte** Messungen zeigen, dass konventionell betriebene Kläranlagen **nicht dafür ausgelegt** sind, Antibiotika-resistenzen und pathogene Keime effektiv **zu reduzieren** .
- Potential zur **Wiederverkeimung** in nachfolgenden Bereichen.



# Antibiotikaresistenzen

Es ist daher wichtig, die Verbreitungswege von Antibiotikaresistenzen zu unterbrechen

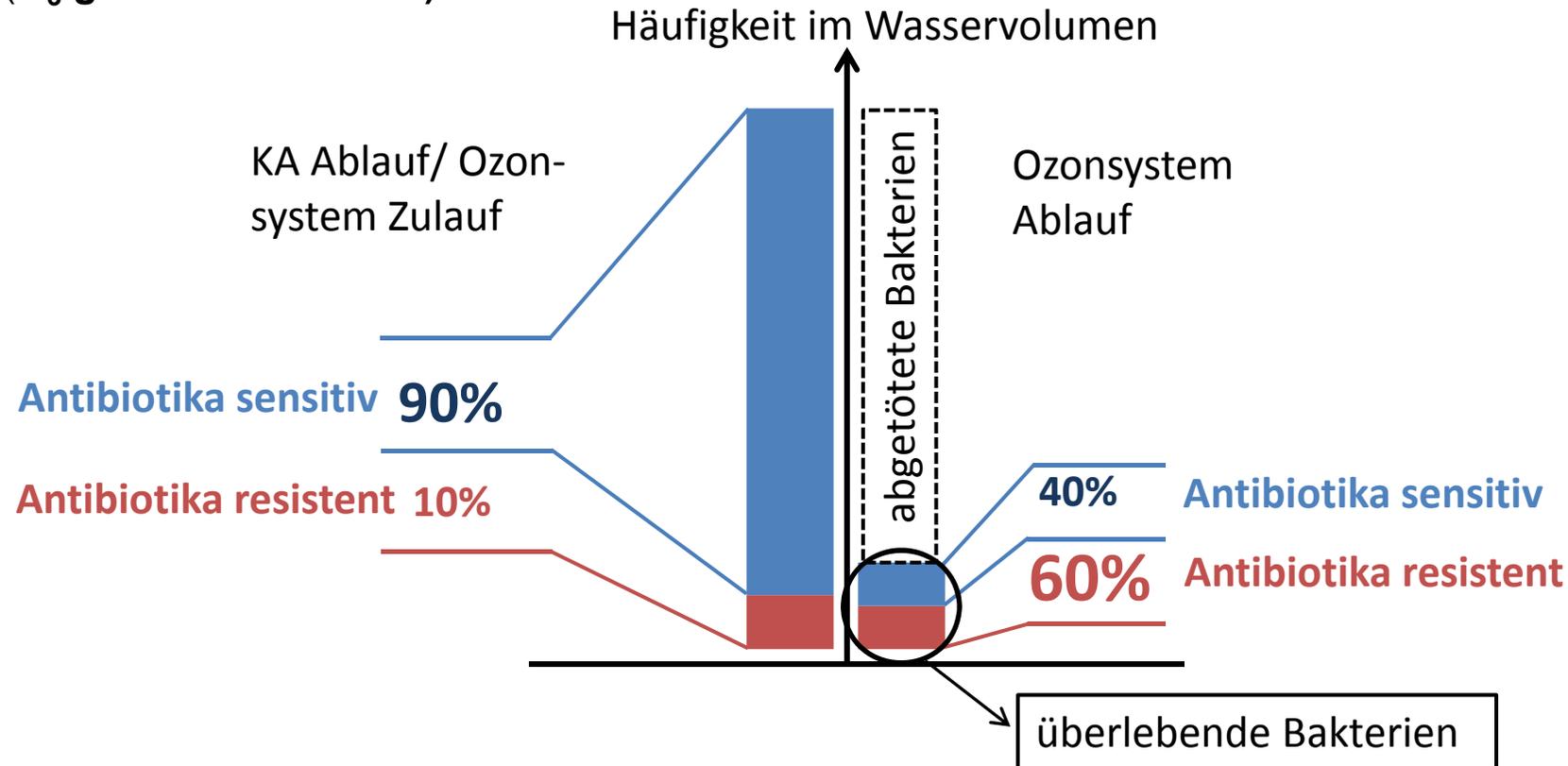
## Was können wir tun?

Antibiotika werden gebraucht, daher ist es wichtig,

- den **Kontakt** mit Antibiotika-resistenten Bakterien zu **vermeiden bzw. zu reduzieren** (Problem: Water reuse).
- eine **Elimination** von Antibiotika-resistenten Pathogenen in der Abwasseraufbereitung durch weiterführende Maßnahmen zu bewirken.
- den **Abbau von mikrobiologisch-aktiven Substanzen** zu verstärken, um den Selektionsdruck auf Antibiotika-resistente Bakterien zu vermindern.

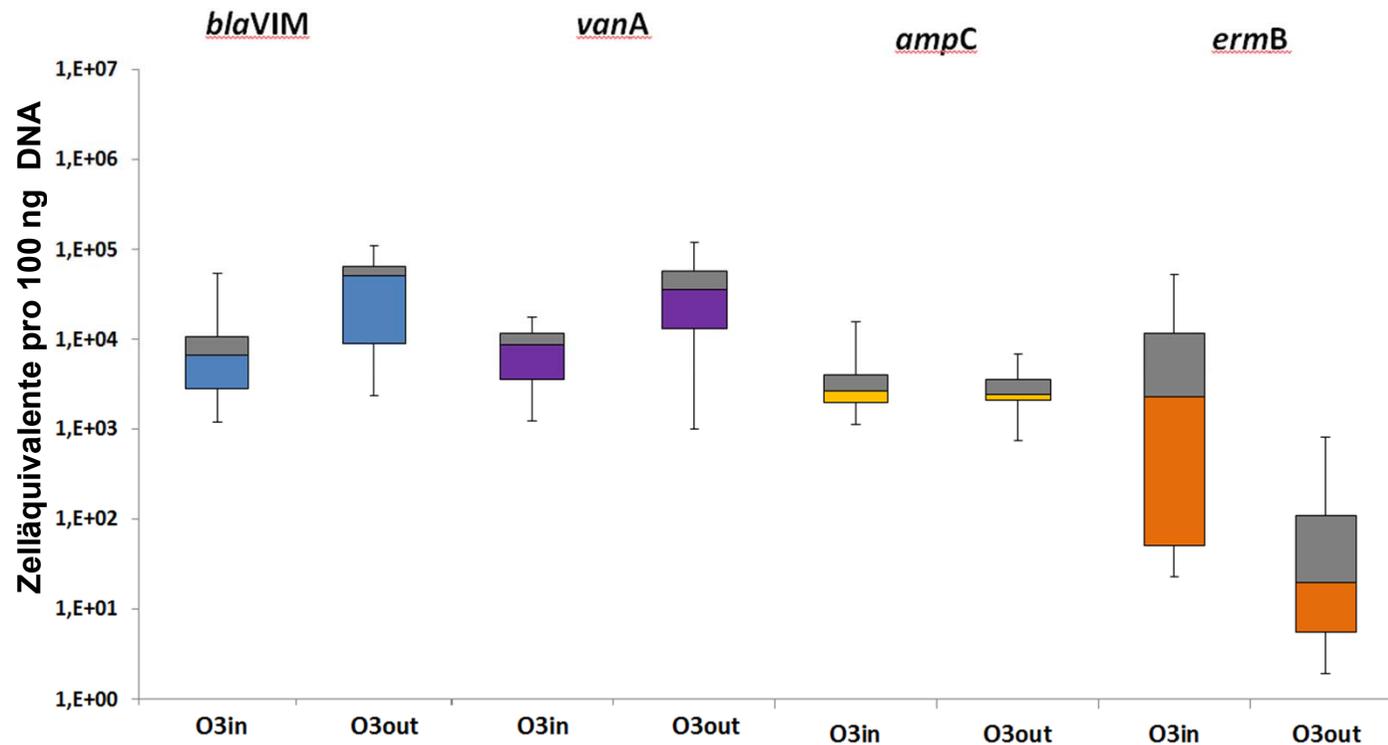
# Einfluss der Ozonbehandlung auf die bakterielle Abwasserpopulation

(O<sub>3</sub>/g DOC: 0.84 ± 0.15)



Einige **Antibiotika-resistente Bakterien** zeigen eine **erhöhte Widerstandsfähigkeit** gegenüber der **Ozonbehandlung** und reichern sich dadurch in der überlebenden mikrobiellen Population an.

# Einfluss der Ozonbehandlung auf Antibiotikaresistenzgene in der Abwasserpopulation



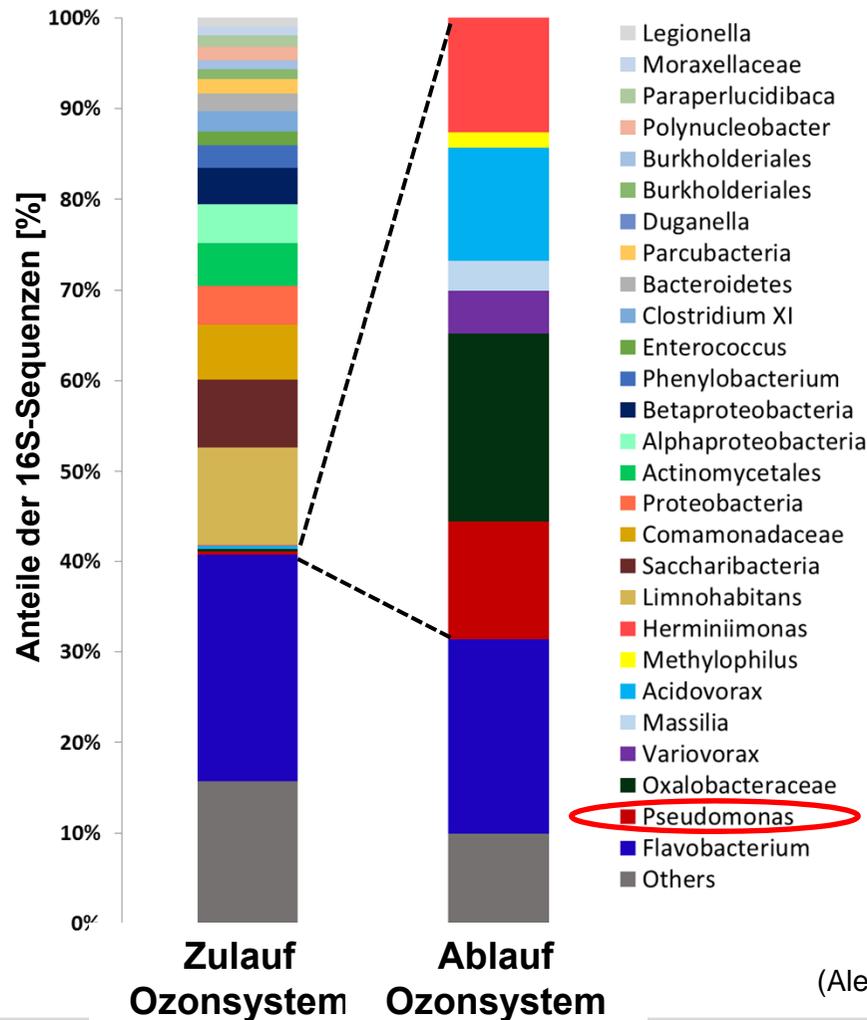
Lebend/Tot Diskriminierung (PMA)

- Die Antibiotikaresistenzgene *blaVIM* und *vanA* reichern sich in der überlebenden Population an
- Das *ermB* Antibiotikaresistenzgen verringert sich deutlich.
- **Jedes der gemessenen ARG zeigt eine individuelle Sensitivität gegenüber der Ozonbehandlung**

(Alexander et al., 2016, Science of the Total Environment)

# Populations-Analysen (Illumina 16S-Amplicon Sequenzierung)

Nur **Gattungen** mit einer Abundanz von  $\geq 1\%$  sind dargestellt.



Nach Ozonbehandlung:

- Verlust der mikrobiellen Diversität
- Anzeichen von Ozon robusten Bakterien wie *Pseudomonas*

Die 16S-Amplicon Sequenzierung bestätigt die Widerstandsfähigkeit von *Pseudomonas* aus der qPCR

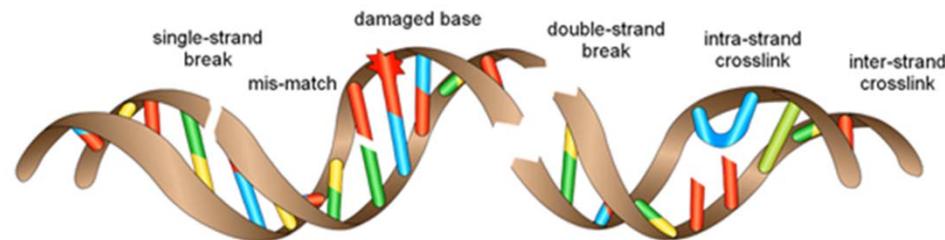
In Summe wurden 13.361 Sequenzen gemessen, mit einer Länge von 300 bp; Zulauf: 1,021 OTUs, Ablauf 482 OTUs; Sequenzabdeckung war > 95%

(Alexander et al., 2016, Science of the Total Environment)

# Zusammenfassung 2

- Die **Ozonbehandlung reduziert die Bakterienfracht und -diversität** von konventionell gereinigtem Abwasser
- Aber **selektiert** spezifische Mikroorganismen (z.B. *P. aeruginosa*) und Antibiotikaresistenzen (z.B. **Imipenem-Resistenz**)

➔ **Trotz Ozonung werden Antibiotika-resistente Bakterien mit klinischer Relevanz in die aquatische Umwelt entlassen**



- **Verstärkte Anstrengungen zur Reduktion der Verbreitung von ARB/ARG in Abwasserbereich:**
- **Anpassungen** der Ozonbehandlung sind erforderlich (Kombination UV?)
- **Andere oxidative Verfahren** (TiO<sub>2</sub> Photokatalyse, Photo-Fenton, etc.)
- Zuverlässige **Überwachungssysteme, Richtlinien** und **Grenzwerte** für Umwelthabitate, ähnlich wie im Gesundheitswesen (national/international).

## Veröffentlichungen:

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

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

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

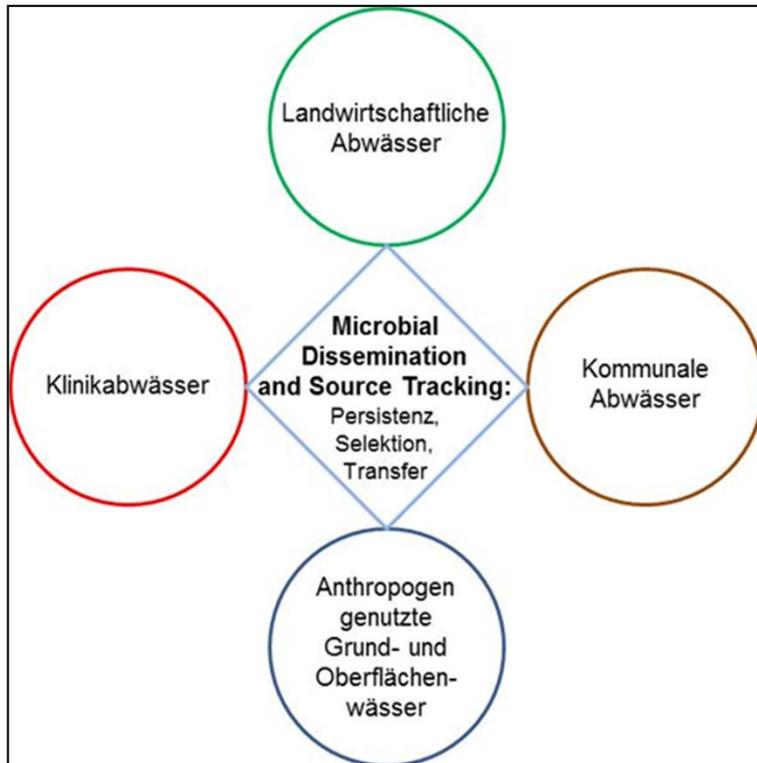
**Exner, M., Schwartz, T., Alexander, J., et al., (2015)** „Bewertungskonzepte in der Mikrobiologie“ mit dem Schwerpunkt Krankheitserreger und Antibiotikaresistenzen. DECHEMA e.V.

**Berendonk T, Manaia C., Merlin C., Fatta-Kassinos D, Cytryn E., Walsh F., Bürgmann H., Sørum H., Norström M., Pons MN, Kreuzinger N, Huovinen P, Stefani S., Schwartz T, Kisand V, Baquero F., Martinez JL. (2015)** Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *NATURE REVIEWS, MICROBIOLOGY* (13; 311)

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

**Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Fatta-Kassinos, D. (2013)**. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *The Science of the Total Environment*, 447, 345–60.

# HyReKA-Projekt: Beginn Februar 2016



Biologische bzw. hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern



Ozon-Behandlung



UV-Behandlung



Membran-Technologie



GEFÖRDERT VOM



**Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung**

# Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in HyReKA

## Antibiotika

**Methicillin**/Oxacillin (penicillinase resistant)

narrow-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotic

**Vancomycin** (antibiotic of last resort)

Glycopeptide antibiotic

**Erythromycin** (broad spectrum, gram +)

Macrolide antibiotic

**Imipenem** (broad spectrum, gram +/-)

$\beta$ -lactam antibiotic

**Carbapenem** (broad spectrum)

To treat multi-drug resistant infections

**Tetracycline** (broad spectrum)

**Sulfonamide** (frequently used)

Urinary tract infections

**Ampicillins** (broad spectrum, gram +/-)

**Cephalosporins** (broad spectrum, gram +)

from the 2nd generation also gram -

## Antibiotika-Resistenzgene

**Methicillin resistance** (*mecA*)

chromosomal, but also spread to MGE

**Vancomycin resistance** (*vanA*)

transposons e.g. Tn1546 encoded (MGE)

**Erythromycin resistance** (*ermB*)

plasmid encoded (MGE)

**Imipenem resistance** (*blaVIM*)

integrations associated (MGE)

**Metallo- $\beta$ -Lactamases** (*blaNDM-1*, *blaKPC-2*)

**Serin- $\beta$ -Lactamases** (*OXA48*)

plasmid encoded (MGE)

**Tetracyclin resistance** (*tetM*)

transposons e.g. Tn1545 encoded (MGE)

**Sulfonamid resistance** (*sul1*)

integrations associated (MGE)

**Serin- $\beta$ -Lactamases** (*blaTEM*)

plasmid encoded (MGE)

**Serin- $\beta$ -Lactamases** (*blaCTX-M*, *blaCMY-2*)

plasmid encoded (MGE)

## Danksagung:

Johannes Alexander, Andreas Dötsch (KIT)  
Gregor Knopp (TU Darmstadt),  
Arne Wieland (Xylem Services GmbH),  
Wolfram Seitz (Landeswasserversorgung Langenau);  
Thomas Ternes (BfG Koblenz, Koordinator von TransRisk)

# Danke für Ihre Aufmerksamkeit

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

NaWaM  
Nachhaltiges Wassermanagement



RiSKWa  
Informationsmanagement von Wasser, Schadstoffen und  
Klimafaktoren in Wasserwerken

