

„Charakterisierung landwirtschaftlicher Abwässer im Hinblick auf mikrobiologische Risikofaktoren zur Beurteilung des Einflusses von Biogasanlagen, insbesondere ihrer Barrierefunktion, auf Förderung und Verbreitung von Resistenzgenen sowie resistenter und pathogener Bakterien.“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin Tina Katrin Wings

aus

Aachen

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Dott
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jan Schirawski

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2017

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

Für Mama

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	i
KURZFASSUNG	v
ABSTRACT	vi
I EINLEITUNG	1
1.1 Veterinärantibiotika und metallhaltige Futtermittelzusätze	3
1.1.1 Antibiotika in der Umwelt	6
1.1.2 Schwermetalle in der Umwelt	9
1.2 Resistenz und Resistenzgene in der Landwirtschaft	10
1.2.1 Antibiotikaresistenz in der natürlichen Umwelt	10
1.2.2 Verbreitung und Persistenz von Resistenzgenen und resistenten Bakterien in Landwirtschaftlichen Abwässern und der Umwelt	11
1.2.3 Verknüpfung mit der Klinik	12
1.3 Biogasanlagen als technologische Barriere	13
1.3.1 Die Biogasproduzierende bakterielle Gemeinschaft	14
1.3.2 Hygienisierendes Potenzial landwirtschaftlicher Abwasserbehandlung	16
ZIELSETZUNG	18
II MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material	19
2.1.1 Probenahme und Kennung	19
Screening 2012 und Jahresgang 2013	19
Fermenterstudie 2013	20
2.1.2 Oligonukleotide	21
2.1.3 Versuchsstämme	22
2.1.4 Kulturmedien	22
2.1.5 Lösungen und Puffer	24
2.1.6 Enzyme	25
2.1.7 Kits und Marker	25
2.1.8 Chemikalien	25
2.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien	26
2.1.10 Software und Webseiten	28
2.2 Mikrobiologische Methoden	28
Tetranatriumpyrophosphat-Extraktion	28
Bestimmung von koloniebildenden Einheiten (KBE)	28
Membranfiltration zur Detektion von ESBL	29
Selektive Anreicherung von MRSA	29
Selektive Anreicherung von Salmonella spp. und Shigella spp.	29
Anlage von Reinkulturen	30
Kultivierungsbedingungen	30
Anlage von Dauerkulturen	30
Bestimmung der Minimalen-Hemmstoff-Konzentration (MHK) ausgewählter Isolate mittels Mikrobouillondilutionsverfahren (MID)	30
Identifizierung von Mikroorganismen über MALDI-TOF MS	31

2.3	Molekularbiologische Methoden	31
	Klonierung	31
	Plasmidisolation	32
	Plasmidaufreinigung	32
	Gesamt-DNA Extraktion	32
	In vitro Amplifikation von DNA durch PCR	32
	Größenauftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese	33
	Nukleinsäurekonzentrationsmessung mittels Spektrophotometer	33
	Quantitative Real-Time PCR	34
	Größenauftrennung von DNA mittels DNA-Gelelektrophorese	35
	Standard DNA-Sequenzierung	35
2.3	Chemische und physikalische Methoden	35
	Bestimmung der Trockensubstanz	35
	Bestimmung der organischen Trockensubstanz	35
	Bestimmung von Schwermetallen mit ICP-Massenspektrometrie	36
	Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs	37
	Bestimmung von Abwasserparametern	37
III	ERGEBNISSE	38
3.1	Chemische und analytische Charakterisierung landwirtschaftlicher Abwässer in Deutschland	38
3.1.1	Chemische Charakterisierung von Substrat und Gärrest 15 deutscher Biogasanlagen	36
3.1.2	Wässrige Verfügbarkeit und Persistenz von Metallen in landwirtschaftlichen Abwässern	41
3.2	Erfassung des mikrobiellen Spektrums in Substrat und Gärrest deutscher Biogasanlagen über kultivierungsabhängige Populationsuntersuchungen	45
3.2.1	Zusammensetzung der bakteriellen Population in Substrat und Gärrest von Biogasanlagen.	46
	Quantitative Erfassung physiologischer und funktioneller bakterieller Gruppen	46
	Bakterielle Diversität der häufigsten Isolate	50
3.2.2	Eignung verwendeter Selektivmedien zur Isolation von Schlüsselorganismen aus Substrat und Gärrest	54
3.3	Abundanz und Diversität von resistenten und Resistenzgen-tragenden Schlüsselorganismen in landwirtschaftlichen Abwässern unter Berücksichtigung des Rückhaltungspotentials einer biotechnologischen Barriere	59
3.3.1	Distribution der Minimalen-Hemmstoff-Konzentration veterinärmedizinisch relevanter Antibiotika in Biogasanlagen	60
3.3.2	Vorkommen und Verbleib von Antibiotikaresistenzgenen in Umweltproben und auf Isolatebene	64
	Screening nach Tetrazyklin- und Sulfonamide-Resistenzgenen ausgewählter Isolate aus landwirtschaftlichen Abwässern	66
	Screening nach Tetrazyklin- und Sulfonamide-Resistenzgenen ausgewählter Isolate aus Proben der Fermenterstudie	69

3.4	Ermittlung des Einflusses biotechnologischer Verfahren auf das Vorkommen und die Persistenz von Antibiotikaresistenzgenen in landwirtschaftlichen Abwässern	72
3.4.1	Labormaßstabsversuche zur mikrobiologischen Populationsverschiebung sowie Entwicklung und Persistenz von Antibiotikaresistenzgenen über den Prozess der Biogasproduktion	73
3.4.2	Quantitative Erfassung von Antibiotikaresistenzgenen in Substrat und Gärrest deutscher Biogasanlagen	79
	Deutschlandweites screening von Biogasanlagen zur Evaluierung des Prozesseinflusses auf den Verbleib von Antibiotikaresistenzgenen	79
	Jahresgang dreier ausgewählter Biogasanlagen zur näheren Bestimmung des Antibiotika- und Fermentationseinflusses auf Antibiotikaresistenzgene	80
IV	DISKUSSION	83
4.1	Chemisch-analytische Charakterisierung landwirtschaftlicher Abwässer in Deutschland	83
4.1.1	Chemische Charakterisierung von 15 Biogasanlagen	83
4.1.2	Bewertung der Kupfer- und Zink- Belastung von Umwelt und Acker durch Abwässer aus Biogasanlagen	84
4.2	Erfassung des mikrobiellen Spektrums in Substrat und Gärrest deutscher Biogasanlagen über kultivierungsabhängige Populationsuntersuchungen	86
4.2.1	Mikrobielle Diversität des kultivierbaren bakteriellen Spektrums in Substrat und Gärrest von Biogasanlagen	86
	Bakterielle Diversität der Isolate	88
4.2.2	Bewertung der Selektionseffizienz diagnostischer Wachstumsmedien zur Charakterisierung komplexen Probenmaterials	91
4.3	Abundanz und Diversität von resistenten Schlüsselbakterien und Resistenzgenen in landwirtschaftlichen Abwässern unter Berücksichtigung des Rückhaltungspotentials durch eine biotechnologische Barriere	92
4.3.1	Verteilung der Minimalen-Hemmstoff-Konzentration veterinärmedizinisch relevanter Antibiotika in Biogasanlagen	92
4.3.2	Vorkommen und Verbleib von Antibiotikaresistenzgenen	95
	Screening nach Tetrazyklin- und Sulfonamide-Resistenzgenen ausgewählter Isolate aus landwirtschaftlichen Abwässern	96
4.4	Ermittlung des Einflusses biotechnologischer verfahren auf vorkommen und die Persistenz von Antibiotikaresistenzgenen in landwirtschaftlichen Abwässern	98
4.4.1	Grundlegender Status von Verteilung und Persistenz von Antibiotikaresistenzgenen in landwirtschaftlichen Abwässern	98
4.4.2	Beurteilung des Rückhaltungspotentials von Biogasanlagen für Antibiotikaresistenzgene in landwirtschaftlichen Abwässern	99
4.4.3	Bewertung der Übertragbarkeit von labormaßstabsversuchen und realen Anlagen	101

V	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	105
VI	ZUSAMMENFASSUNG	107
VII	LITERATURVERZEICHNIS	109
VIII	ANHANG	137
IX	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	148
X	TABELLENVERZEICHNIS	150
XI	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	152

KURZFASSUNG

Stetige Expansion und Intensivierung der Massentierhaltung lassen große Mengen landwirtschaftlicher Abwässer entstehen die als Wirtschaftsdünger in die Umwelt entlassen werden. Die Ausbringung nicht aufbereiteter Gülle auf landwirtschaftlich genutzten Flächen stellt jedoch, neben einer wertvollen Nährstoffzufuhr, einen direkten Eintragspfad für veterinärpharmakologische Spurenstoffe, Schwermetallreste, sowie mikrobielle Risikofaktoren in Boden, Grund- und Oberflächengewässer dar.

Diese Studie untersucht die Verteilung und Persistenz von Antibiotikaresistenzgenen (ARG), resistenter und potentiell pathogener Mikroorganismen und antimikrobiell-wirksamer Schwermetalle in landwirtschaftlichen Abwässern zur Erfassung des Risikos der Ausbringung auf Ackerland und des hygienisierenden bzw. rückhaltenden Potentials von Biogasanlagen.

15 Biogasanlagen wurden in einem *screening* 2012 stichprobenhaft untersucht und drei dieser Anlagen über den Jahresgang 2013 zu fünf Probenahmezeitpunkten weiter betrachtet. Kontinuierliche Durchflussfermenter wurden unter definierter Zugabe von Antibiotika (AB) in der ersten Versuchshälfte gegenüber eines Kontrollfermenters über einen Gesamtzeitraum von 60 Tagen untersucht.

Mikro- und molekularbiologische Ergebnisse zeigen keine Förderung anaerober Sporenbildner sowie eine generell niedrige Prävalenz pathogener Bakterien einschließlich klinisch relevanter Organismen der Enterobacteriaceae und Enterococcaceae, bedingt durch den Einfluss der Prozessbedingungen der Biogasproduktion. Isolate zeigen eine abnehmende Diversität und die Reduktion gramnegativer Bakterien in Ausgangsproben sowie die Verschiebung der bakteriellen Gemeinschaft zugunsten des Phylums Firmicutes.

Obwohl Antibiotikaresistenzgene (ARG) sowohl ubiquitär in Gülle, als auch Gärrest quantifiziert werden, kann ein Rückgang resistenter Bakterien und ARG nach der Fermentation nachgewiesen werden. Die quantitative Analyse verdeutlicht jedoch auch Anlagen- und ARG-spezifische Niveaus und Reduktionseffizienzen zwischen 80 % und 30 %. Mit abnehmender Häufigkeit und einer entsprechend verminderten Reduktion treten *sul2*, *tetM*, *tetA* und das kopienschwächste *tetO* in allen Anlagen auf. Schwermetalle mit antimikrobieller Wirkung werden im Feststoff von Eingangs- und Ausgangsproben gleichermaßen mit einer deutlichen Prävalenz von Kupfer und Zink bestimmt. Während Kupfer zu 30 % im überwiegenden Teil der Proben im wässrigen Eluat nachweisbar ist, zeigt Zink kaum wässrige Verfügbarkeit.

Letztlich zeigt der Prozess der Biogasproduktion eine vielversprechende hygienisierende Wirkung zur Eindämmung mikrobiologischer und pharmakologischer Schadstoffe in landwirtschaftlichen Abwässern, wenn auch weitere Maßnahmen wie eine wirkungsvolle Veränderung und Kontrolle der landwirtschaftlichen Praxen nötig sind, um ökologische und umweltmedizinische Risiken aus dem landwirtschaftlichen Sektor zu eliminieren.

ABSTRACT

Continuous expansion and intensification of livestock farming facilitates large quantities of agricultural waste which in turn are released into the environment. The application of untreated manure on agricultural land, however, in addition to a valuable nutrient supply, constitutes a direct pathway for veterinary pharmacological trace substances, heavy metal residues, pathogenic and resistant microorganisms and into soil, groundwater and surface water.

This study examines the distribution and persistence of antimicrobial resistance genes (ARG), resistant and potentially pathogenic microorganisms and heavy metals with antibiotic properties in agricultural effluents ascertaining the risk of manure spreading on farmland and the sanitizing or rather retaining potential of biogas plants.

15 biogas plants were examined in a screening of random samples in 2012 of which three plants were monitored over the annual cycle in 2013 with five sampling times. Continuous flow fermenters were investigated under defined addition of antibiotics (AB) in the first half of the experiment against a control fermenter over a total period of 60 days.

Micro- and molecular biological approaches show a generally low prevalence of anaerobic pathogenic bacteria as well as a reduction of cultivatable bacteria through the process of biogas production, including clinically relevant organisms of Enterobacteriaceae and Enterococcaceae without promoting anaerobic spore forming pathogens. Isolates show a decreasing diversity and the reduction of gram negative bacteria in the output samples and a shift of the bacterial community in favor of the phylum Firmicutes.

Although antibiotic resistance genes (ARG) can be quantified both ubiquitous in manure and digestate, a decline of resistant bacteria and ARG can be detected after fermentation. However, the quantitative analysis also illustrates biogas plant and ARG specific levels and reduction efficiencies between 80 % and 30 %. With decreasing frequency and a correspondingly decreased reduction *sul2*, *tet M*, *tetA* and lowest in copy number *tetO* occur in all systems.

Heavy metals with antimicrobial activity are equally determined in solid samples of input and output with a significant prevalence of copper and zinc. While copper is detectable with 30 % in the aqueous effluent of most samples zinc hardly shows aqueous availability.

Ultimately, the process of biogas production demonstrates a promising sanitizing effect for the containment of microbiological and pharmacological pollutants in agricultural effluent even if further measures like the effective change and control of agricultural practices are needed to eliminate environmental and health hazards from the agricultural sector.

I. EINLEITUNG

Als größter Flächennutzer Deutschlands, mit 52,2% und 16,7 Millionen Hektar, hat die Landwirtschaft einen wesentlichen Einfluss auf Umweltkompartimente wie Boden, Grundwasser, Oberflächenwasser und Luft (UBA 2015; Wings and Dott 2015). Abgesehen von der Rückführung wertvoller Nährstoffe in Ackerland, eröffnet die Applikation von Wirtschaftsdünger einen direkten Eintragspfad für eine Reihe biologischer und klinisch relevanter Verunreinigungen wie veterinärpharmakologische Spurenstoffe, Schwermetallrückstände und pathogene und Antibiotikaresistenzen-tragende Mikroorganismen in die Umwelt (Abbildung 1). Seit dem EU-weiten Verbot der prophylaktischen und leistungsfördernden Anwendungen im Jahr 2006 hat der Einsatz von Antibiotika sich bis 2012 verdoppelt und die Verwendung von Kupfer- und Zinkverbindungen als Futtermittelzusatzstoffe aufgrund ihrer antimikrobiellen Aktivität kontinuierlich zugenommen (GERMAP 2012; Casewell et al. 2003; EU 2006; Zethner 2007; GfK 2005). Schwermetalle und Antibiotika werden weitgehend unverändert ausgeschieden und akkumulieren in den oberen Bodenhorizonten für Monate, wo sie durch die Pflanzen aufgenommen werden können und Eintritt in nachgelagerte Umweltbereiche sowie die Nahrungskette finden (Fernando Baquero, Martínez, and Cantón 2008; Martinez 2009; Seiler and Berendonk 2012; Xiong et al. 2015).

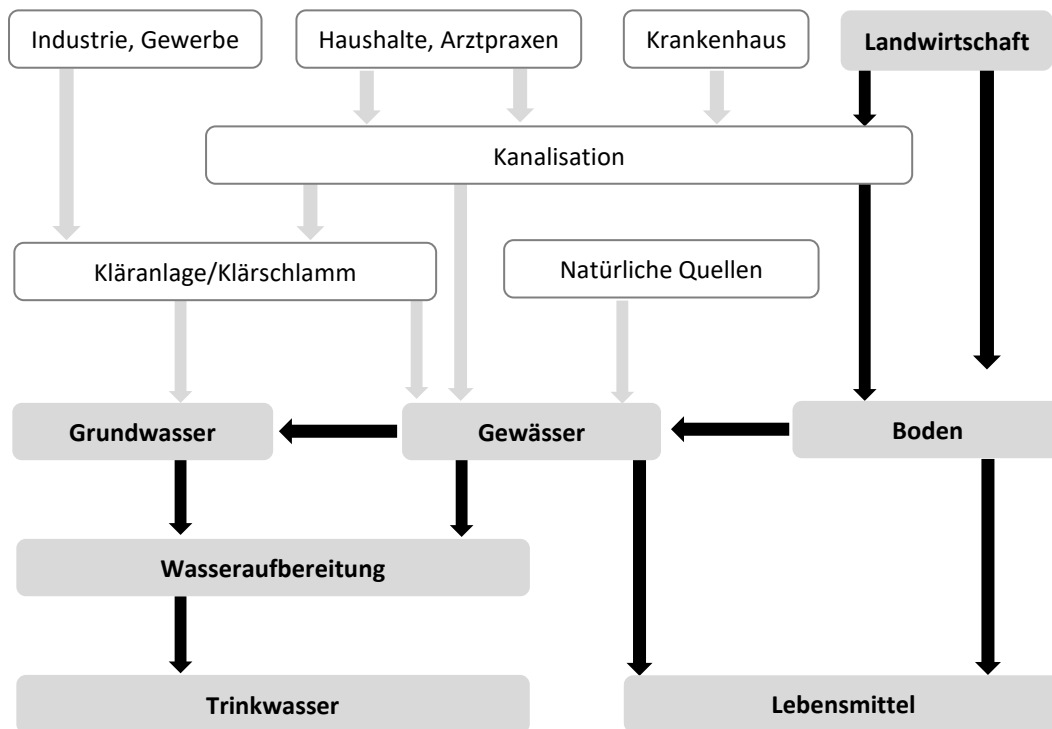


Abbildung 1 Eintragungspfade landwirtschaftlich generierter Kontaminanten in Umwelt und Lebensmittel (Dott and Ahmad 2002).

Wie Abbildung 2 zeigt, fördert die Gegenwart antibiotisch wirksamer Substanzen in Dünger, auf landwirtschaftliche Flächen und in der Umwelt auch die Persistenz und Verbreitung mikrobiologischer Verunreinigungen mit ökologischer und klinischer Relevanz. Pathogene Bakterien, insbesondere Enterobakterien und Enterokokken, Resistenzgenträger- und resistente Organismen verändern die Bodenökologie und verdrängen Umweltbakterien (Chee-Sanford and Mackie 2009).

Obwohl die Humanmedizin versucht ist, eine Trennung zwischen veterinär- und humanmedizinisch verwendeten Substanzen zu etablieren, untergraben mikrobiologische Phänomene, wie die Koselektion verschiedener Resistenzgene aufgrund ihrer genetischen Lokalisierung, die Verwendung von Strukturanaloga der Antibiotika und fitnessneutrale und sogar -förderliche Resistenzfaktoren, auch ohne selektiven Druck, die Wirksamkeit solcher Maßnahmen (Kemper 2008; Essen-Zandbergen, Smith, and Veldman 2009; Allen et al. 2010; Kazimierczak et al. 2009; Luo et al. 2005; Enne et al. 2005). Aber nicht nur Krankheitserreger, sondern auch kommensale und Umwelt-Mikroorganismen entwickeln Resistenzen und tragen Gene, die als ein übertragbares Reservoir in landwirtschaftlichen Abfällen und Umwelt verbleiben (Witte 2000). Eine deutliche Zunahme resistenter Bakterien durch Anwendung von Dünger kann im Ackerboden beobachtet werden, die wiederum das Risiko der Rekombination von resistenten und pathogenen Organismen zu steigern vermag und somit eine Gefahr für Mensch und Umwelt darstellt (Rahube and Yost 2012; Forsberg et al. 2012; Heuer et al. 2009; Heuer, Schmitt, and Smalla 2011). Obwohl eine Infektion durch direkten Kontakt mit kontaminiertem Material möglich ist, prägt sich das Risiko für die menschliche Gesundheit durch die Landwirtschaft deutlicher in der Verbreitung und Übertragung von Resistenzeigenschaften auf humane Krankheitserreger aus (Perry and Wright 2013; Wright 2010; Teuber 2001; Chang et al. 2015).

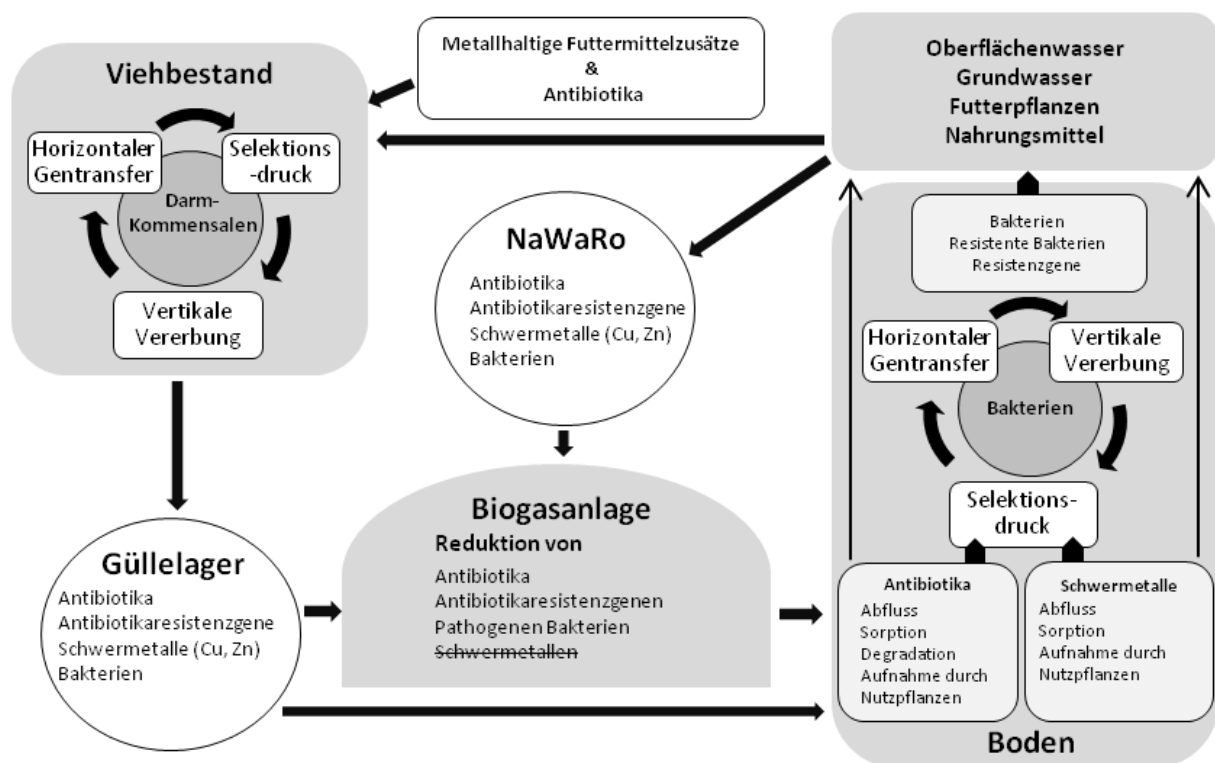


Abbildung 2 Ausbreitung von Antibiotika, Mikroorganismen, Resistenzgenen und Resistenzen aus der Intensiv-Tierhaltung und deren Minimierung in Biogasanlagen (Wings and Dott 2015; J. Chee-Sanford and Mackie 2009).

Als Maßnahme zur Eindämmung der Umwelt- und Gesundheitsbelastung durch landwirtschaftliche Abwässer geraten biotechnologische Aufbereitungssysteme wie Biogasanlagen zunehmend in den Fokus. Seit der Einführung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) im Jahr 2000 und der Novellierungen des Gesetzes hat sich die Anzahl der Biogasanlagen in Deutschland von 2050 im Jahr 2004 auf 8856 im Jahr 2015 erhöht (EEG 2014; Statista 2015). In landwirtschaftlich genutzten Anlagen entsteht Biogas als Produkt anaerober Fermentation organischen Substrats wie

Gülle, Festmist und nachwachsenden Rohstoffen (NaWaRo) (Kröber et al. 2009a; F. H. Liu et al. 2009; FNR 2014). Doch obwohl ein hygienisierender Effekt der Prozessbedingungen auf Antibiotikarückstände und pathogene Bakterien vielfach beschrieben werden kann, wird auch die Anreicherung anaerober Krankheitserreger wie pathogener *Clostridium spp.* resistenter Bakterien und Resistenzgene unterstellt (Sahlström 2003b; Watcharasukarn et al. 2009; Fliegerová et al. 2012; Eikmeyer et al. 2013). Literaturangaben zum Einfluss von Biogasanlagen auf die Abwassermikrobiologie sind jedoch meist ausschnittshaft auf Einzelanlagen und Momentaufnahmen bezogen, weisen große Schwankungsbreiten auf und sind aufgrund sehr unterschiedlicher Bezugsgrößen und Prozessbedingungen wie Temperatur und Substratbeschaffenheit nicht übertragbar und schwer zu generalisieren.

Ein stichprobenhaftes *screening* 15 deutscher Biogasanlagen (BGA) in 2012 und die weiterreichende Untersuchung dreier Anlagen über den Jahresgang 2013 zu fünf Probenahmezeitpunkten soll anhand einer umfassenden Studie der Verteilung und Persistenz von Antibiotikaresistenzgenen (ARG), resistenter und potentiell pathogener Mikroorganismen, sowie antibiotisch wirksamer Schwermetalle im Zulauf und Ablauf deutscher Biogasanlagen, ein Bild des Belastungszustandes sowie der Zusammenwirkung der Einzelparameter ermöglichen und somit die Risikobewertung der Ausbringung landwirtschaftlicher Abwässer und das hygienisierende bzw. rückhaltende Potential von Biogasanlagen herausstellen.

1.1 VETERINÄRANTIBIOTIKA UND METALLHALTIGE FUTTERMittelZUSÄTZE

Seit den Fünfzigerjahren werden antibiotische Substanzen in der Viehwirtschaft eingesetzt (Kemper 2008). Neben der Behandlung akuter Infektionserkrankungen sowohl individueller Tiere als auch metaphylaktisch zur Verhinderung der Infektionsverbreitung, ist auch der prophylaktische Einsatz unter anderem zur Prävention von Mastitis in Milchvieh und Enteritis entwöhnter Ferkel, sowie zur Leistungsförderung in der Mast gängig (GERMAP 2012; Horton et al. 2011; Cromwell 2002). Lauter werdende Stimmen aus Bevölkerung und Politik sowie wissenschaftliche Bedenken zu steigender Resistenz und einem Risiko für die menschliche Gesundheit kumulierten letztlich in einem EU-weiten Verbot aller leistungsfördernden Antibiotika in 2006 (Cromwell 2002; EU 2006). Seit dem Verbot des leistungsfördernden Einsatzes hat sich der jährliche Absatz von Veterinärantibiotika in Deutschland von 784 t in 2005 auf 1619 t in 2012 mehr als verdoppelt und liegt europaweit an erster Stelle (Tabelle 1) (GERMAP 2012; Casewell et al. 2003; EU 2006; GfK 2005). Meyer et al. (2013) zeigen, dass nach wie vor 85 % der verkauften Antibiotika in Deutschland veterinärmedizinisch verabreicht werden. Zusätzlich hat die Applikation metallhaltiger Futtermitteladditive, insbesondere Kupfer- und Zinkverbindungen, aufgrund ihrer antibiotischen Wirkung stark zugenommen (Zethner 2007; Hartung et al. 2001; Bednorz et al. 2013).

Viele Antibiotika werden sowohl in Human- als auch Veterinärmedizin eingesetzt (Kemper 2008; Jjemba 2002). Insbesondere Tetracykline und Sulfonamide finden in der Landwirtschaft Einsatz in großen Mengen (Tabelle 2) und verlassen Gastrointestinaltrakt und ableitende Harnwege der Nutztiere zu 30 % bis 90 % in unmetabolisierter Form und verbleiben in Gülle und Festmist mit Rückständen von über 100 mg/kg (Sarmah, Meyer, and Boxall 2006; Kümmerer 2003; Kemper 2008; Jjemba 2002; Keen and Montforts 2012). Aber auch Metaboliten der Substanzen können antibiotisch wirksam sein oder in Fäzes wieder zu der mikrobiologisch aktiven Ausgangssubstanz reagieren (Kemper 2008; Christian et al. 2003).

Tabelle 1 Vergleich der Abgabemengen antimikrobieller Substanzen [t] für Lebensmittel liefernde Tiere in 25 europäischen Mitgliedsstaaten (GERMAP 2012).

Mitgliedsstaat	Abgegebenen Menge 2011	Mitgliedsstaat	Abgegebenen Menge 2011
Österreich	53	Italien	1.672
Belgien	299	Lettland	6
Bulgarien	42	Litauen	14
Zypern	52	Niederlande	364
Tschechische Republik	61	Norwegen	7
Dänemark	107	Polen	473
Estland	8	Portugal	164
Finnland	14	Slowakei	11
Frankreich	913	Slowenien	8
Deutschland	1.826	Spanien	1.781
Ungarn	148	Schweden	13
Island	0,7	Vereinigtes Königreich	357
Irland	89	Summe	8.481

Tetrazykline sind Breitspektrumantibiotika die eine Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese an den Ribosomen grampositiver, gramnegativer und zellwandloser Bakterien durch die Anlagerung der Aminoacyl-t-RNA an die 30S-Untereinheit der Ribosomen verhindern (Chopra and Roberts 2001; Schnappinger and Hillen 1996). In Folge dessen können Peptidketten nicht weiter verlängert werden und eine Bakteriostase stellt sich ein. Im Jahr 2012 wurden in Deutschland 566 t Tetrazykline von Tierärzten abgegeben, was Tetrazyklin zum häufigsten Wirkstoff macht (Chopra and Roberts 2001; GERMAP 2012). Sulfonamide gehören zu den ersten eingesetzten Breitspektrumantibiotika. Im Jahr 2011 wurden 185 t veterinärmedizinisch in Deutschland verabreicht (GERMAP 2012). Als Strukturanaloga der p-Aminobenzoesäure (PABA) inhibieren sie bei ausreichender Konzentration die Dihydropterat-Synthetase (DHPS), die zur Folsäuresynthese und dadurch zur Nukleotidsynthese beiträgt (Sköld 2000). Sulfonamide werden meist in Kombination mit Trimethoprim verabreicht um eine synergistische Wirkung auf den Folsäurestoffwechsel zu erzielen (Hollenbeck and Rice 2012).

Tabelle 2 Abgegebene Menge antimikrobiell wirksamer Grundsubstanz je Wirkstoffklasse [t] an in Deutschland ansässige Tierärzte mit einer Hausapotheke in 2011 und 2012 (GERMAP 2012).

Wirkstoffklasse	Abgegebenen Menge 2011	Abgegebenen Menge 2012	Differenz
Tetrazykline	564	566	+2
Penicilline	527,5	498	-29,5
Sulfonamide	185	162	-23
Makrolide	173	145	-28
Polypeptid-Antibiotika	127	124	-3
Aminoglycoside	47	40	-7
Trimethoprim	30	26	-4
Lincosamide	17	15	-2
Pleuromutiline	14	18	+4
Fluorchinolone	8	10	+2
Fenicole	6	6	0
Cephalosporine 1. + 2. Generation	2	5	+3
Cephalosporine 3. Generation	2	2,5	+0,5
Cephalosporine 4. Generation	1,5	1,5	0
Summe	1.706	1.619	-87

Schwermetalle wie Kupfer und Zink werden in der Viehwirtschaft und Biogasproduktion als Nährstoffe für Vieh und Mikroorganismen eingesetzt (Mudhoo & Kumar 2013; Monteiro et al. 2010; Yazdankhah et al. 2014; Hartung et al. 2001). Sie sind essentielle Spurenelemente, die wichtige Strukturkomponenten oder regulatorische Co-Faktoren einer breiten Palette an Enzymen in verschiedenen Stoffwechselwegen in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen darstellen (Yazdankhah

et al. 2014). Zu hohe extrazelluläre Konzentrationen haben jedoch eine toxische Wirkung (Moghaddam & Jahanian 2009). Aufgrund seiner bakteriziden und fungiziden Wirkung wird Kupfer neben dem Einsatz in Futtermitteln auch in Desinfektionsmitteln für die Klauenbehandlung, mineralischen Einstreumittel, Güllezusatzstoffen bzw. Trägermaterialien von Fütterungsarzneimitteln verwendet (Zethner 2007; Schultheiss et al. 2003).

Tabelle 3 Kupfer und Zink als Futtermittelzusatzstoffe (VO (EG) Nr. 1334/2003 2003).

Element	Zugelassene Verbindungen	Tierart	Höchstgehalt [mg/kg Alleinfutter]	
Kupfer	-acetat,	Ferkel	170	
	-carbonat,	(bis 12. Woche)		
	-chlorid,	Wiederkäuer	15	
	-methionat,	Sonstige Tierarten	25	
	-oxid,			
	-sulfat,			
	-aminosäurenchelat			
Zink	-lactat,	Kälber	(Mil-	200
	-acetat,	chaustauscher)		
	-carbonat,	Sonstige Tierarten		150
	-chlorid,			
	-oxid,			
	-sulfat,			
	-aminosäurenchelat			

Insbesondere in der Schweinemast werden Futtermittel mit Kupfergehalt in großem Überfluss mit fünfzig- bis hundertfacher Dosis des physiologischen Bedarfs eingesetzt um den leistungsfördernden Effekt, der dem Wirkmuster antibiotischer Leistungsförderer gleicht, zu nutzen (Hartung et al. 2001; Mudhoo and Kumar 2013; Zethner 2007).

Tabelle 4: Einsatz von Kupfer und Zink als Tierarzneimittel (VO (EU) Nr. 37/2010 2009).

Element	Zugelassene Verbindungen	Tierart	Höchstgehalte [µg/kg]
Kupfer	-chlorid,	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	Keine Rückstands-höchstmenge(n) erforderlich
	-gluconat,		
	-heptonat,		
	-methionat,		
	-oxid,		
	(II)-oxid,		
	-sulfat		
Zink	-acetat,	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	Keine Rückstands-höchstmenge(n) erforderlich
	-aspartat,		
	-chlorid,		
	-gluconat,		
	-oleat,		
	-oxid,		
	-stearat,		
	-sulfat		

Zinkhaltige Futtermittelzusätze finden ebenfalls den Haupteinsatz in der Schweinezucht, da sie neben einem gesteigerten Wachstum der Tiere, auch prophylaktische und in höheren Dosen therapeutische Effekte z. B. bei Absatzdiarrhoe zeigen. Der wissenschaftliche Futtermittel-Ausschuss der EU kam im Jahr 2003 zu dem Schluss, dass geltende Höchstgehalte von Kupfer und Zink in Futtermitteln den physiologischen Bedarf des Viehs deutlich übersteigen und angepasste Gehalte wurden in der Futtermittelverordnung (VO (EG) Nr. 1334/2003 2003) vom 25. Juli 2003 umgesetzt. Der Kupfergehalt von Futtermitteln wird für Schweine und Geflügel auf 25 mg/kg Futtermittel (Ausnahme Ferkel bis zu zwölf Wochen: 170 mg/kg) begrenzt (Tabelle 3). Der Zinkgehalt von Futtermitteln wird z. B. für Schweine und Geflügel auf 150 mg/kg Futter begrenzt. Eine Ausnahme bilden die Milchaustauschfuttermittel mit einem erlaubten Zn-Gehalt von 200 mg/kg (Tabelle 3).

Doch auch der pharmazeutische Einsatz der Schwermetalle erfordert Konzentrationen weit über den physiologischen Bedarf hinaus und wird wie Tabelle 4 zeigt, nicht durch die Festlegung von Höchstgehalten begrenzt (VO (EU) Nr. 37/2010 2009). Insbesondere der Einsatz von Kupfersulfat („Kupfervitriol“) in der Klauenbehandlung kann in einzelnen Betrieben bis zu 70 % des gesamten Kupfereintrages darstellen (Thomas Hillenbrand and (UBA) 2005).

1.1.1 Antibiotika in der Umwelt

Sowohl Schwermetalle als auch Antibiotika können über diverse Eintragspfade in die Umwelt gelangen, unter anderem während der Herstellung der pharmazeutischen Präparate, der Entsorgung, sowie durch die Nutzung und Ausbringung belasteter, insbesondere landwirtschaftlicher Abwässer auf Nutzflächen (J. Chee-Sanford and Mackie 2009). Die Substanzen haben eine limitierte Resorption im Körper und werden im überwiegenden Teil als ursprünglicher Wirkstoff oder Metaboliten dessen über die Exkretion weidender Tiere und vor allem die Ausbringung von Gülle in die Umwelt entlassen (Crane, Boxall, and Barrett 2008; Bailey et al. 2015). Das Schicksal von Kupfer, Zink und Antibiotika in der Umwelt unterliegt komplexen Matrixeinflüssen sowie den Eigenschaften der spezifischen Substanzen.

Insbesondere Antibiotika umfassen ungleiche Klassen organischer Verbindungen mit einer Vielfalt funktioneller Gruppen, die ihre chemischen Eigenschaften prägen. Halbwertszeiten in Gülle werden für viele Veterinärantibiotika, unter anderem Penicilline, auf wenige Tage geschätzt und der mikrobiologische Abbau noch vor Ausbringung des Düngemittels vermutet.

Der hydrolytische Abbau der Antibiotika ist temperaturabhängig, kann jedoch bei Markoliden, Sulfonamiden und speziell β -Laktam-Antibiotika nur wenige Stunden umfassen und stellt den wichtigsten Abbauweg dar (Doi and Stoskopf 2000; C. Huang, Renew, and Smeby 2011). Chinolone und Tetrazykline zeigen nur geringe hydrolytische Zersetzung bei realen Temperaturen, sind jedoch potentiell photolytisch instabil (Doi and Stoskopf 2000; C. Huang, Renew, and Smeby 2011). Da Photolyse nur an Oberflächen von Boden und Gülle stattfinden kann, ist ihr Einfluss auf den Abbau zu vernachlässigen (P Kay, Blackwell, and Boxall 2004; Beausse 2004). Der biologische Abbau von Antibiotika findet vornehmlich durch bakterielle Einflüsse statt und variiert stark zwischen den Substanzklassen. Während Penicilline schnell degradieren, können Oxytetrazyklin und eine Vielzahl klinisch relevanter Antibiotika als biostabil beschrieben werden (Gartiser et al. 2007b; Gartiser et al. 2007a; Alexy, Kümpel, and Kümmerer 2004). Auch der Transfer in vitro gewonnener Erkenntnisse auf reale Umweltszenarien ist nicht ohne weiteres möglich. Diverse Studien zeigen neben toxischen Effekten auch eine Habituation mikrobiologischer Populationen an hohe Antibiotikakonzentration, die mit einer akzelerierten Mineralisierung der Substanzen einhergehen (Barra Caracciolo, Topp, and Grenni 2015; Topp et al. 2016; Kim et al. 2004). Neben bakterieller Interaktion ist auch die Aufnahme und Bioakkumulation von Antibiotika in pflanzlichem Gewebe dokumentiert und stellt einen direkten Eintragspfad in humane Lebensmittel dar (Dolliver, Kumar, and Gupta 2007; A. Boxall, Johnson, and Smith 2006; Kumar et al. 2005). Chinolone und Tetrazykline persistieren über mehrere Monate und auch Sulfonamide sind bis zu 30 Tage stabil (Alistair B. A. Boxall 2010). Aber auch Abbauprodukte und sorbierte Fraktionen der Ausgangssubstanzen gelangen in die Umwelt und verbleiben auf bisher unbestimmte Zeit (J. Chee-Sanford and Mackie 2009). Insbesondere Tetrazykline zeigen, aufgrund hoher Sorption an Feststoffen, geringe Mobilität in der Wasserphase von Gülle, Boden und Sedimenten (Tolls 2001).

Aufgrund der starken Sorption wird ihr Transport zwischen Umweltbereichen Erosion und der Bewegung kolloidaler Partikel in Gülle und Boden zugeschrieben (Kolz, Moorman, and Ong 2005). Der adsorbierte Zustand muss jedoch nicht mit einem Funktionsverlust einhergehen, sondern kann im Falle von Tetrazyklin, durch die Bindung von Metallionen für die Aktivität der Antibiotika

förderlich sein (Ming 2003). Tabelle 5 gibt einen Überblick der Antibiotikafunde in diversen Umweltkompartimenten, von Gülle bis hin zu Trinkwasser. Entsprechend ihres Sorptionsverhaltens werden Tetrazykline mit den höchsten Konzentrationen bis zu 9,0 mg/kg in Boden-, 41,2 mg/kg in Gülle- jedoch kaum in Wasserproben gefunden (Winckler and Grafe 2000; Gerd Hamscher et al. 2005). Hamscher et al. (2002) schließen aus Funden bis zu 30 cm Bodentiefe, dass Tetrazykline über wiederholte Düngung mit Gülle aufgrund ihrer Langlebigkeit und eingeschränkten Mobilität in signifikanten Konzentrationen in den obersten Bodenhorizonten angereichert werden. Sulfonamide hingegen zeigen geringe Sorptionseigenschaften und die höchste Mobilität der Antibiotika (Tolls 2001). Trotz einer eingeschränkten Halbwertszeit und deutlich geringerem landwirtschaftlichen Einsatz können Sulfonamide in Gewässern bis hin zu vereinzelt Trinkwasserproben, sowie Boden und Gülle nachgewiesen werden (GERMAP 2012; A.B.A. Boxall et al. 2005; Gerd Hamscher et al. 2005; G Hamscher et al. 2002; Mückter 2006; Höper et al. 2002; Ratsak et al. 2013). Sowohl Drainageausträge, als auch Oberflächenabfluss werden als Transportströme für Antibiotika in Gewässer in Betracht gezogen, während der Eintrag durch Versickerung zu vernachlässigen ist (Paul Kay, Blackwell, and Boxall 2005; P Kay, Blackwell, and Boxall 2004; Burkhardt, Stamm, and Waul 2005). Weiterhin schlussfolgern die Autoren einen versiegelnden Effekt des Bodens durch mehrfache Düngung mit einhergehender Erhöhung des Oberflächenabflusses sowie eine Mobilitätssteigerung über Deprotonierung durch den alkalischen pH landwirtschaftlicher Abwässer, insbesondere von Sulfonamiden (Burkhardt, Stamm, and Waul 2005). Doch trotz geringerer Konzentrationen in Oberflächengewässern und Grundwasserproben zeigen diverse Studien einen deutlichen Zusammenhang der Antibiotikabelastung von Gewässern mit zunehmendem urbanen und landwirtschaftlichen Einfluss (Yang and Carlson 2003; Christian et al. 2003; Kolpin et al. 2002; Krapac et al. 2005; Jc C Chee-Sanford et al. 2001).

Tabelle 5 Antibiotika in Gewässern, Boden und Landwirtschaftlichen Abwässern (Kemper 2008; Ratsak et al. 2013).

Probe	Klasse	Substanz	Konzentration [µg/L]		Quelle
Oberflächen- wasser	Makrolide	Lincomycin	7,3-211,0		(A.B.A. Boxall et al. 2005)
		Clarithomycin	3,0		(Kolpin et al. 2002)
		Erythromycin	17,0		(Hirsch et al. 1999)
		Roxithromycin	6,0		
		Tylosin			(Daughton and Ternes 1999)
	Sulfonamide	Sulfadiazin	41,0		(A.B.A. Boxall et al. 2005)
		Sulfamethoxazol	5,0		(Hirsch et al. 1999)
	Trimethoprim	Trimethoprim	0,0-2,0		(A.B.A. Boxall et al. 2005; Hirsch et al. 1999)
Tetrazykline	Chlortetrazyklin	7,0		(Kolpin et al. 2002)	
Oberflächenabfluss		Oxytetrazyklin	320,0		(Paul Kay, Blackwell, and Boxall 2005)
Grundwasser	Sulfonamide	Sulfamethazin	2,0		(G Hamscher, Pawelzick, and Höper 2005)
		Sulfamethoxazol	4,0		(Kemper 2008)
Trinkwasser	Tetrazykline	Tetrazyklin	4,0		(Krapac et al. 2005)
	Sulfonamide	Sulfamethoxazol	1,0		(Mückter 2006)
[µg/kg]					
Abwasser	Fluorochinoline	Ciprofloxacin	4,0		(Golet et al. 2001)
		Norfloxacin	1,0		
Boden	Makrolide	Clarithromycin	670,0		(Schüller 1998)
		Lincomycin	85,0		(A.B.A. Boxall et al. 2005)
	Sulfonamide	Sulfadiazin	10,0		(A.B.A. Boxall et al. 2005)
		Sulfadimidin	110,0		(Höper et al. 2002)
		Sulfametazin	20,0		(G Hamscher, Pawelzick, and Höper 2005)
			5,0		(A.B.A. Boxall et al. 2005)
	Trimethoprim				
	Fluorochino- lone	Ciprofloxacin	60,0-520,0		(Schüller 1998)
	Tetrazykline	Tetrazyklin	4.500,0-9.000,0		(Winckler and Grafe 2000)
		Oxytetrazyklin	3.500,0		(A.B.A. Boxall et al. 2005)
		Chlortetrazyklin	390,0		(Gerd Hamscher et al. 2005)
Landwirtschaftliche Abwässer			Gülle	Gärrest	
	Fluorchinolone	Enrofloxacin	550,0	1.090,0	(Ratsak et al. 2013)
		Ciprofloxacin	70,0	1.620,0	(Ratsak et al. 2013)
		Marbofloxacin	50,0	-	(Ratsak et al. 2013)
		Danofloxacin	50,0	970,0	(Ratsak et al. 2013)
		Difloxacin	-	3.400,0	(Ratsak et al. 2013)
		Sarafloxacin	60,0	20,0	(Ratsak et al. 2013)
		Orbifloxacin	20,0	-	(Ratsak et al. 2013)
	Sulfonamide	Sulfadiazin	650,0	6.250,0	(Ratsak et al. 2013)
		4-Hydroxy-Sulfadiazin	9.050,0	49.400,0	(Ratsak et al. 2013)
		N-Acetyl-Sulfadiazin	150,0	460,0	(Ratsak et al. 2013)
		Sulfadimidin	7.040,0	880,0	(Ratsak et al. 2013)
		Sulfamethoxypyridazin	20,0	50,0	(Ratsak et al. 2013)
		Sulfaquinoxalin	670,0	-	(Ratsak et al. 2013)
		Sulfamethoxazol	-	160,0	(Ratsak et al. 2013)
		Sulfametazin	-	70,0	(Ratsak et al. 2013)
			130,0-8.700,0		(G Hamscher et al. 2002)
			200,0-7.200,0		(G Hamscher et al. 2002)
		Sulfachloropyridazin	-	30,0	(Ratsak et al. 2013)
		Sulfameter	-	230,0	(Ratsak et al. 2013)
		Sulfacetamid	-	120,0	(Ratsak et al. 2013)
Trimethoprim		50,0	-	(Ratsak et al. 2013)	
Tetrazykline	Tetracyclin	2.450,0	17.030,0	(Ratsak et al. 2013)	
	Chlortetracyclin	3.600,0	-	(Ratsak et al. 2013)	
		100,0		(G Hamscher et al. 2002)	
	Oxytetracyclin	1.490,0	-	(Ratsak et al. 2013)	
		4.000,0		(G Hamscher et al. 2002)	
			14.100,0-41.200,0		(Gerd Hamscher et al. 2005)

1.1.2 Schwermetalle in der Umwelt

Die anthropogene Schwermetallbelastung der Umwelt insbesondere durch Kupfer und Zink wird, neben der industriellen Emmission, zum Großteil durch landwirtschaftliche Nutzung und den Einsatz in Aquakulturen generiert (Nicholson et al. 2003; Nemecek et al. 2011).

Tabelle 6 Schwermetallkonzentrationen in Wasser, Sediment, Boden, Klärschlamm und Gülle (Seiler and Berendonk 2012).

Probe		Kupfer	Zink	Einfluss	Quelle	
Wasser		gelöste Metallkonzentration				
	µg/L	1,31	7,93	landwirtschaftlich, ländlich, urban	(Park et al. 2007)	
	µg/L	-	-	landwirtschaftlich, urban	(Park et al. 2011)	
		gesamte Metallkonzentration				
	µg/L	-	-	landwirtschaftlich, urban	(Park et al. 2011)	
	µg/L	4,4-7,4	18-35	landwirtschaftlich, urban, industriell	Rieder 2006)	
	µg/L	1,5-30	0-70	landwirtschaftlich, urban	(Power, Attrill, and Thomas 1999)	
	µg/L	8,00	25,00	marine-aquakulturell	(Dean, Shimmield, and Black 2007)	
	Sediment					
mg/kg FM		56,00	267,00	landwirtschaftlich, urban, industriell	(Le Cloarec et al. 2011)	
mg/kg FM		15-35	50-150	landwirtschaftlich	(Tang et al. 2010)	
mg/kg TS		15-49	45,60	landwirtschaftlich	(Mendiguchía et al. 2006)	
mg/kg TS		30,2-35	-	landwirtschaftlich	(Quinton and Catt 2007)	
mg/kg TS		-	-	landwirtschaftlich, urban, industriell	(Ouddane et al. 2008)	
mg/kg TS		30-166	249-1358	landwirtschaftlich, urban, industriell	(Baborowski et al. 2012)	
mg/kg TS		-	-	landwirtschaftlich, urban, industriell	(Ouddane et al. 2008)	
mg/kg TS		-	665,00	marine-aquakulturell	(Morrissey et al. 2000)	
mg/kg TS		100,00	450,00	marine-aquakulturell	(Dean, Shimmield, and Black 2007)	
Boden						
		mg/kg TS	1-4,3	2,7-10,8	Kompost	(Zhao et al. 2006)
		mg/kg TS	0,8-2,9	3,5-11,4	Kompost	(Zhao et al. 2006)
	mg/kg TS	0,60	0,7-0,8	NPKS-Dünger	(Zhao et al. 2006)	
	mg/kg TS	0,80	2,90	NPKS-Dünger	(Zhao et al. 2006)	
	mg/kg TS	0,6-0,7	0,70	PK-Dünger	(Zhao et al. 2006)	
	mg/kg TS	0,6-0,7	3,10	PK-Dünger	(Zhao et al. 2006)	
	mg/kg TS	-	-	Klärschlamm	(Bergkvist et al. 2003)	
	mg/kg TS	130,50	179,50	Schweinekompost	(Zhao et al. 2006)	
	mg/kg TS	108,20	106,20	N-Dünger	(Zhao et al. 2006)	
	mg/kg TS	107,00	103,90	PK-Dünger	(Zhao et al. 2006)	
	mg/kg TS	26,7-27,2	66,3-70,7	Biabfallkompost	(Erhart, Hartl, and Putz 2008)	
	mg/kg TS	25,8-26,8	64,8-67,3	NPK-Dünger	(Erhart, Hartl, and Putz 2008)	
	mg/kg TS	7,2-9,3	-	landwirtschaft	(Quinton and Catt 2007)	
	mg/kg TS	149-421	-	Kupfer-Pestizide	(Blume et al. 2010)	
Klärschlamm						
	mg/kg TS	-	-		(Bergkvist et al. 2003)	
	mg/kg TS	236,00	1640,00		(Saviozzi et al. 1999)	
	mg/kg TS	184-330	1098-1550		(Matamoros et al. 2012)	
	mg/kg TS	223,00	1025,00		(H. Chen et al. 2012)	
	mg/kg TS	800,00	1700,00		(Manara and Zabaniotou 2012)	
	mg/kg TS	190,00	408,00		(J.-Q. Xu et al. 2012)	
Gülle						
	Stallmist	mg/kg TS	66,00	340,00	(Blume et al. 2010)	
	Schwein-kompost	mg/kg TS	221,00	691,90	(Zhao et al. 2006)	
	Biabfall-kompost	mg/kg TS	35-90	152-400	(Bartl, Hartl, and Horak 2002)	
		mg/kg TS	23-63	145-240	(Erhart, Hartl, and Putz 2008)	

Aufgrund dieser Praktiken werden Schwermetalle wie Blei, Cadmium, Kupfer und Zink in toxikologisch relevanten Konzentrationen in Umweltbereichen von Abwasser, über Boden bis hin zu Fließgewässern nachgewiesen. Tabelle 6 zeigt am Beispiel der rege eingesetzten Futtermittelzusätze Kupfer und Zink die Verteilung der Substanzen in Umweltkompartimenten, sowie eine deutliche Korrelation der Schwermetallbelastung und einem landwirtschaftlichen bzw. aquakulturellen Einfluss.

Die Toxizität von Metallspurenstoffen variiert stark zwischen Substanzen wie Blei, Cadmium und Quecksilber, die auch in Spuren als starkes Zellgift agieren, und Mikronährstoffen mit hoher physiologischer Relevanz (Nies 1999; Seiler and Berendonk 2012). Die dosisbezogene Toxizität aller Metalle hängt jedoch stark von den chemischen Bedingungen der Umweltmatrizes und deren Effekt auf die Bioverfügbarkeit ab. Der pH-Wert, das Redoxpotenzial und die Konzentration organischer Substanzen in Abwasser, Boden und Gewässern beeinflussen die biologische Verfügbarkeit von Schwermetallen (Seiler and Berendonk 2012). Während die Kompostierung großer Mengen organischer Materie durch die Sauerstoffreduktion bis hin zu anaeroben Mikromilieus die Löslichkeit von beispielsweise Cadmium und Zink reduzieren und hohe Konzentrationen organischer Substanz Metallverbindungen immobilisieren, fördert ein niedriger pH die Solubilität (Seiler and Berendonk 2012; Schulz-Zunkel and Krueger 2009; Nies 1999).

1.2 RESISTENZ UND RESISTENZGENE IN DER LANDWIRTSCHAFT

Die Freisetzung großer Mengen Antibiotika, antibiotischer Schwermetallverbindungen und Resistenzgene in die natürliche Umwelt ist ein vergleichsweise junges Geschehen im Evolutionsprozess (Martinez 2009). Die Auswirkungen, die sich aus landwirtschaftlicher Nutzung von Antibiotika und der Ausbringung tierischer Abwässer auf Umweltqualität und Gesundheitswesen ergeben sind bisweilen unklar und nur mit einem verstärkten Auftreten antibiotikaresistenter Bakterien in belasteten Umweltbereichen aber auch dem klinischen Alltag verknüpft (Joanne C Chee-Sanford et al. 2009; R. Aminov and Mackie 2007; H Heuer and Smalla 2007). Grund hierfür ist die Komplexität des Phänomens, das sich nicht nach einer einfachen Ursache-Wirkung-Beziehung aufstellt sondern ein Konsortium diffuser abiotischer und biologischer Mechanismen sowie ökologischer Wechselwirkungen ist (Joanne C Chee-Sanford et al. 2009).

1.2.1 Antibiotikaresistenz in der natürlichen Umwelt

Über Vorkommen natürlicher Antibiotika und selektiven Druck auf Antibiotikaresistenzgene (ARG) in der präantibiotischen Ära kann nur spekuliert werden (Allen et al. 2010). Aufgrund der Mobilisierung und Verbreitung von Antibiotika und ARG über Luft, Bodenpartikel und tierische Migration verbleiben keine unberührten Landschaftsbereiche (Allen et al. 2010). Auch Daten vor und aus den 1930er Jahren über den frühen Einsatz, vor der großtechnischen Produktion von Antibiotika, können nur bedingt Anhaltspunkte liefern denn die Nutzung metallhaltiger Substanzen zur Behandlung von Krankheiten lässt sich Jahrhunderte zurückverfolgen (Baker-Austin et al. 2006). Jedoch zeigen Studien aus dieser Zeit wie auch retrospektive Analysen, dass ARG sowohl natürlich vorkamen, als auch genetisch mobil verbreitet wurden, ohne den erhöhten Selektionsdruck der Moderne (D. H. Smith 1967; Hughes and Datta 1983; Houndt and Ochman 2000). Auch Bakterien weitgehend naturbelassener Bodenbereiche bilden Eigenschaften zur Degradation und Inaktivierung von Antibiotika aus, unabhängig von menschlichem Einfluss (Allen et al. 2010).

Jedoch ist die Rolle von Antibiotika und ARG in natürlichen Bakteriengemeinschaften kaum erforscht. Es treten nur wenige Beispiele für eine letale Funktion bioaktiver mikrobieller Moleküle im ökologischen System auf (Currie et al. 1999; Cafaro and Currie 2005; Neeno-Eckwall, Kinkel, and Schottel 2001). Subletale Konzentrationen von Antibiotika in natürlichen Populationen erzielen vielmehr einen hormetischen Effekt und weisen auf *quorum sensing* und bisher ungeklärte

Signalübertragungswege hin (Davies and Ryan 2012; Davies, Spiegelman, and Yim 2006; Calabrese and Baldwin 2002; Ryan and Dow 2008; Lin et al. 2015).

Gencluster zur Antibiotikabiosynthese sind üblicherweise mit Genen für variable Eigenschutzprozesse wie spezifische Resistenzproteine, Veränderungen der Zielstruktur oder multifunktionalen Effluxpumpen verbunden. ARG zeigen jedoch in Umweltpopulationen pleiotrope Funktionen mit einer Reihe physiologischer Phänotypen und Zellfunktionen und vermitteln beispielsweise die Fähigkeit, alternative Phosphat, Kohlen- oder Stickstoffquellen zu nutzen (Perkins and Nicholson 2008; Tamae et al. 2008; Duo, Hou, and Ren 2008). Demnach wirken in natürlichen Bakteriengemeinschaften diverse selektive Faktoren auf Beständigkeit und Verbreitung von ARG unabhängig von der Anwesenheit oder Konzentration einer antibiotischen Substanz (Allen et al. 2010). Trotz fragmentärer Informationslage wird deutlich, dass Antibiotikaresistenz auch ohne menschlichen Einfluss in der Umwelt auftritt und verbreitet wird (Allen et al. 2010).

1.2.2 Verbreitung und Persistenz von Resistenzgenen und resistenten Bakterien in Landwirtschaftlichen Abwässern und der Umwelt

Doch obwohl der überwiegende Anteil von Resistenzgenen seinen Ursprung in natürlichen bakteriellen Populationen hat und dort als schwer greifbares Reservoir bestehen bleibt, wird eine Zunahme antibiotikaresistenter Bakterien in Umweltkompartimenten mit anthropogener Beeinflussung vielfach beschrieben (Resende et al. 2014; Marti et al. 2013; Heuer, Schmitt, and Smalla 2011; Heuer et al. 2009; Kyselková, Kotrbová, et al. 2015; Bednorz et al. 2013; Knapp et al. 2010).

Eine Resistenz ist die Eigenschaft von Bakterien, die Wirkung antibiotisch aktiver Substanzen abzuschwächen oder ganz zu unterbinden. Diese Funktion kann passiver Natur sein, indem ein Organismus die Zielstruktur des Antibiotikums nicht aufweist, jedoch auch durch eine Veränderung der Zielstruktur, Effluxsysteme und die Inaktivierung der antibiotischen Substanz erfolgen (Thaker, Spanogiannopoulos, and Wright 2010; Allen et al. 2010; Lin et al. 2015).

Der Gebrauch von Antibiotika in Landwirtschaft und Humanmedizin in Konzentrationen, die ihren natürlichen, hormetischen Effekt übersteigen, übt einen Selektionsdruck auf sowohl kommensale, Umwelt- und pathogene Bakterien aus, der nicht nur das Wachstum resistenter Organismen fördert und die Populationsstruktur verändert, sondern auch die Entstehung neuer ARG und deren Verbreitung indiziert und akzeleriert (Martinez 2009; J. A. Perry and Wright 2013).

ARG können vertikal über die Zellteilung, aber auch über horizontalen Gentransfer (HGT), intra- und interspezifisch übertragen werden. Gemeinschaften mit hohem genetischen Austausch können taxonomisch sehr divers sein teilen jedoch ähnliche mobile Elemente wie Plasmid- und Vektortypen (J. A. Perry and Wright 2013). Plasmide können eine Vielzahl an Resistenzgenen in Tandem tragen, während Integrons und Transposons kürzere DNA-Abschnitte beinhalten (Vo et al. 2010; Barlow 2009). Der DNA-Austausch kann passiv ablaufen, jedoch auch aktiv kontrolliert werden. Natürlich kompetente Spezies können über Autolyse ihre DNA freisetzen und das gleiche Signal zur DNA-Aufnahme vitaler Organismen nutzen, während andere Gattungen DNA sekretieren (Guiral et al. 2006; J. A. Perry et al. 2009; C. M. Thomas and Nielsen 2005). Der DNA-Austausch erfolgt in allen Umweltbereichen, jedoch besonders ausgeprägt im Boden, der durch chemische und physikalische Bedingungen wie Temperatur, pH, Nährstoff- und Sauerstoffkonzentration und biologische Faktoren vor allem in Bereichen hoher Nährstoffkonzentration wie Rhizosphäre und nach Wirtschaftsdünger-Applikation Austauschereignisse fördert (Rustam I. Aminov 2011; J. A. Perry and Wright 2013). Durch Transformation wird freie DNA von kompetenten Bakterienzellen aufgenommen und genetisch integriert. Sowohl Umwelt- als auch klinisch-relevante Bakterien können diesen Prozess nutzen, wenn auch die Fähigkeit zur Kompetenz nicht ubiquitär auftritt

(Rustam I. Aminov 2011; I. Chen, Christie, and Dubnau 2005). Mittels Transduktion werden genetische Sequenzen über Bakteriophagen übertragen. Diese können in 30 % kultivierbarer Bakterien und bis zu 70 % metagenomisch getesteter Bakterien in der Umwelt nachgewiesen werden (Ghosh et al. 2008). Darüber hinaus ist dieser DNA-Transfer mit der Übertragung von Pathogenitätsinseln und Virulenzfaktoren assoziiert und stellt eine Verbindung zwischen Umwelt und Klinik dar (J. A. Perry and Wright 2013). Der verbreitetste Transfer erfolgt bei Zellkontakt über eine konjugative Brücke zwischen einer Donorzelle und dem Rezipienten. Plasmide, die diesen Übertragungsweg induzieren sind weit verbreitet und tragen neben diversen ARG, auch Gene, die Resistenz gegenüber Schwermetallen vermitteln (Popowska and Krawczyk-Balska 2013; C. M. Thomas and Nielsen 2005). Der Austausch genetischen Materials zwischen Bakterien in Umweltkompartimenten ist hochfrequent, was von der Abundanz transformierbarer Bakterien, transduzierender Phagen und konjugativer Elemente unterstrichen wird (J. A. Perry and Wright 2013).

Doch der Einsatz antibiotischer Substanzen fördert nicht nur die Verbreitung und Entstehung von ARG, sondern trägt auch zum Erhalt und der Stabilisation in Bakteriengemeinschaften bei. ARG treten oft in genetischer Assoziation mit anderen ARG, Metallresistenzgenen und fitnessfördernden Toxin-Systemen oder Bacteriocinen auf, so dass über Koselektion und Wachstumsstress ARG erhalten bleiben (Martínez 2012; Perry and Wright 2013). Ebenso verursachen viele Antibiotikaresistenzen keine metabolische Beeinträchtigung für den Trägerorganismus und gehen stattdessen mit neutraler oder sogar einer erhöhten Fitnessbilanz einher (Martínez 2012).

Diverse Studien beschreiben eine positive Korrelation zwischen dem Einsatz von Antibiotika und dem Auftreten resistenter Bakterien in Gülle, Mist und nachfolgenden Umweltkompartimenten wie Boden, Grund- und Oberflächenwasser (Byrne-Bailey et al. 2009; Heuer, Schmitt, and Smalla 2011). Ein Zusammenhang stellt sich sowohl zwischen den spezifischen Einsatzpraxen bei unterschiedlichem Tierbestand als auch verschiedener Haltungssysteme heraus. Demnach sind höchste Resistenz- und Resistenzgenfunde in konventioneller Masthaltung und merkbar geringere Level in Kleinbetrieben, insbesondere ökologisch-arbeitenden Ställen zu finden (Heuer et al. 2011). Die Ausbringung landwirtschaftlicher Abwässer als Wirtschaftsdünger geht mit der Freisetzung bakterieller Biomasse, sowie ARG einher (Byrne-Bailey et al. 2009). Mikrokosmosexperimente landwirtschaftlicher Böden zeigen anhaltende synergistische Effekte von Gülle und Sulfonamidantibiotika auf das Resistenzprofil der Bakteriengemeinschaften mit erhöhten Gesamt- und Sulfonamidresistenten kultivierbaren Bakterien im Boden (Heuer and Smalla 2007). Der Effekt antibiotisch unbelasteter Gülle zeigt sich transienter, ebenso wie langfristig bearbeiteter Boden einen geringer ausgeprägten Einfluss von Resistenz- und ARG-Eintrag aufweist als naturbelassener Boden. Weitere Studien zeigen, dass der regelmäßige Eintrag auch von subtherapeutischen Antibiotikakonzentrationen von 100 µg/L Sulfonamid und 20 µg/L Tetrazyklin einen selektiven Effekt auf die resistente Bakterienpopulation hat. Der anthropogene Einfluss auf ARG-Vorkommen lässt sich auch am Beispiel des *South Platte River Basin* nachvollziehen da das Fließgewässer in landwirtschaftlich und urban geprägten Abschnitten deutlich stärker belastet ist, als im Bereich unberührter Naturschutzgebiete (Storteboom et al. 2010). Trotz dem ubiquitären Auftreten von antibiotisch wirkenden Substanzen und ARG in der natürlichen Umwelt unterscheidet sich das Resistom sowohl quantitativ als auch in Qualität und Mobilität von dem landwirtschaftlich, bzw. anthropogen geprägter Bakteriengemeinschaften (Baquero, Alvarez-Ortega, and Martinez 2009; Heuer, Schmitt, and Smalla 2011).

1.2.3 Verknüpfung mit der Klinik

Die Verbreitung und Evolution von ARG und resistenten Bakterien, insbesondere pathogener Bakterien ist eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin (Arias and Murray 2009).

Ein wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist der Austausch von ARG-Determinanten (ARGD) aus natürlichen und Umweltsystemen aus Landwirtschaft, Abwasser, Boden und der kommensale Bakterienpopulation auf klinisch relevante Pathogene (Lin et al. 2015). Das Resistom anthropogen geprägter, aber auch unberührter Umweltbereiche stellt ein umfangreiches und hoch diverses Reservoir für ARGD dar, dessen Mobilität gut dokumentiert ist (Perry and Wright 2013). Und obwohl ARGD in klinischen Isolaten weniger divers auftreten, werden sie über dieselben genetischen Elemente mobilisiert und zeigen aufgrund ihrer sequenziellen und funktionellen Aufmachung den selben Ursprung wie ökologisch und landwirtschaftlich hervorgebrachte Resistenzen (Forsberg et al. 2012; Perry and Wright 2013). Die Berührungspunkte zwischen Klinik, Umwelt und kommensaler Flora sind allgegenwärtig und die Bewertung des Risikos einzelner Übertragungswege bleiben aufgrund der genetischen Diversität und rapiden Evolutionsfähigkeit bakterieller DNA schwer greifbar (Perry and Wright 2013). Bislang können nur wenige Beispiele eines direkten Gentransfers zwischen dem Umweltresistom und klinischen Isolaten nachgewiesen werden und der Einfluss landwirtschaftlicher Kontamination mit Antibiotika und resistenten Bakterien auf die nachlassende Wirksamkeit antibiotischer Substanzen in der Klinik erscheint derzeit gering. Dennoch bleibt sowohl das Umweltreservoir von Resistenzen, als auch der landwirtschaftliche Missbrauch antimikrobieller Substanzen für die Umweltmedizin und zukünftige Infektionsbekämpfung von entscheidender Bedeutung, da die Antibiotikatherapie die primäre und häufig einzige Behandlungsmethode von Infektionserkrankungen ist (Allen et al. 2010; Aminov and Mackie 2007; Perry and Wright 2013; Forsberg et al. 2012).

1.3 BIOGASANLAGEN ALS TECHNOLOGISCHE BARRIERE

Seit der Einführung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) im Jahr 2000 mit dem Ziel, bis zum Jahr 2025 40 bis 45 Prozent des Bruttostromverbrauchs durch erneuerbare Energien abzudecken spielen Biogasanlagen eine zunehmende Rolle. Seit der Novellierung des Gesetzes im Jahr 2004 konnte sich die Anzahl der Biogasanlagen in Deutschland von 2050 im Jahr 2004 auf 7850 im Jahr 2013 erhöhen (EEG 2014; FNR 2014). Biogas entsteht durch die anaerobe mikrobielle Umsetzung organischer Substanz (Kröber et al. 2009c).

Der Fermentationsprozess läuft, wie Abbildung 3 zu entnehmen ist, in vier Phasen ab die durch die physiologischen und metabolischen Funktionen disparater Mikroorganismen-Gruppen vermittelt werden (Wirth et al. 2012). Zunächst werden die langkettigen Fett-, Eiweiß- und Kohlenhydratpolymere des Substrats durch Enzyme, wie Zellulasen, Lipasen und Proteasen, in kurzkettige Fettsäuren, Aminosäuren und Zucker, hydrolysiert (Weiland 2010). Die entstandenen Mono- und Dimere werden in der Acidogenese zu kurzkettigen organischen Säuren und Alkoholen versäuert (Schink 1997). In der Essigsäurebildung, entsteht durch obligat wasserstoffproduzierende acetogene und homoacetogene Bakterien größtenteils Acetat, Kohlendioxid und Wasserstoff. In der letzten Phase, der Methanogenese, verwerten acetotrophe Archaea Acetat unter Freisetzung von Methan und Kohlenstoffdioxid sowie methanogene Archaea die Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zu Methan verstoffwechseln (Nettmann et al. 2010; Wirth et al. 2012). Kontinuierlich betriebene Reaktoren mit stetiger Substratzufuhr lassen die subsequenten Phasen der Fermentation zeitlich parallel ablaufen.

Als Substrat sowohl hofgebundener als auch industrieller Anlagen werden nachwachsende Rohstoffe (NaWaRo) sowie landwirtschaftliche Abwässer tierischen Ursprungs eingesetzt. Als Substrat werden jedoch auch Lebensmittelreste und organische Industriereststoffe eingesetzt. In Deutschland machen Maissilage mit 73 % und Grassilage mit 12 % den größten Teil der eingesetzten NaWaRo aus (FNR 2014). Bei den eingesetzten tierischen Abwässern handelt es sich um Gülle und Festmist von Nutztieren.

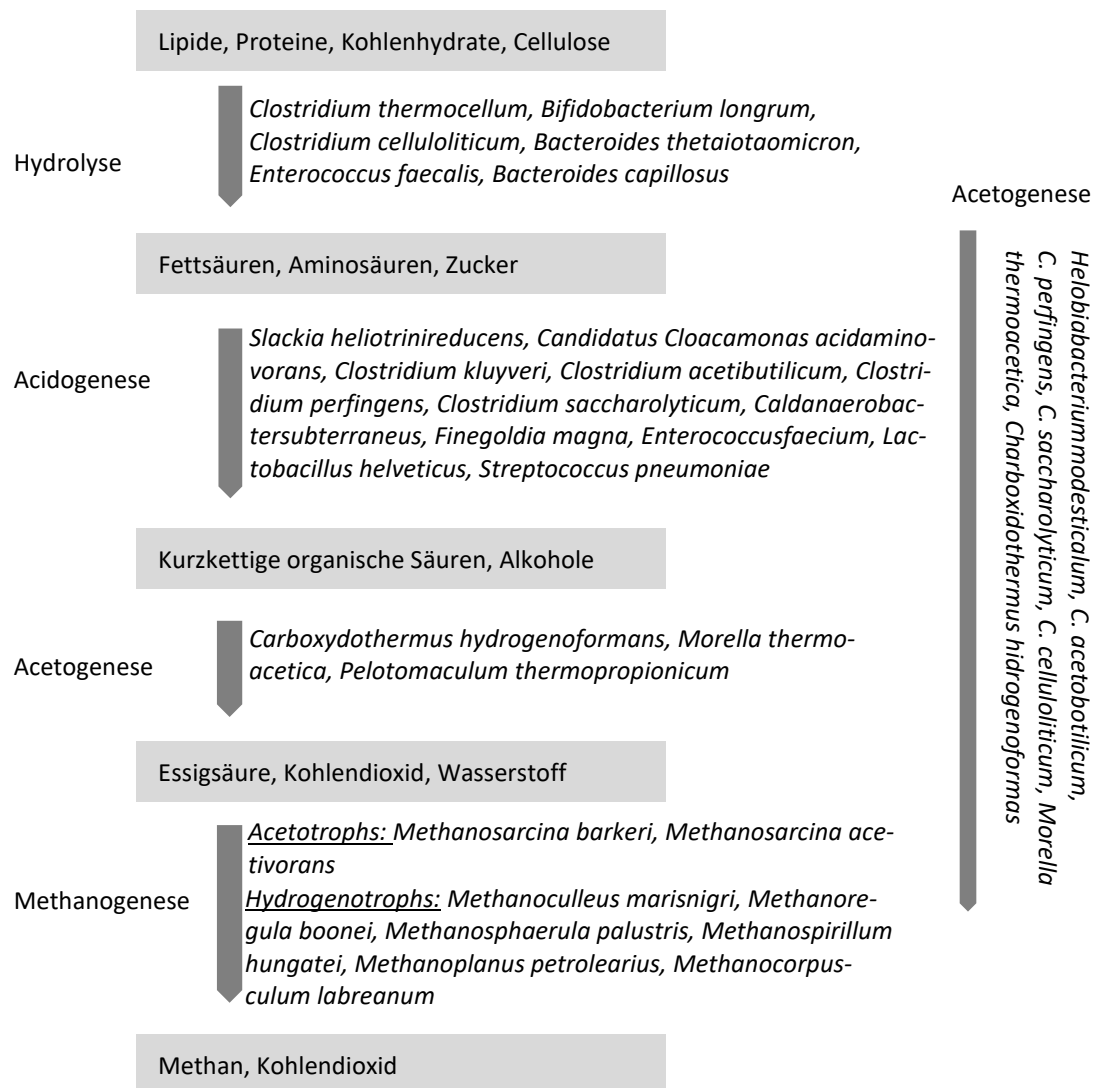


Abbildung 3 Prozess der Biogasproduktion in und die häufigsten Gattungen die an den Prozessphasen beteiligt sind (Wirth et al. 2012).

Neben der Wärme- und Stromerzeugung durch das entstandene Biogas kann auch das Fermentationsprodukt verwendet werden. Der Gärrest weist hohe Mengen leicht pflanzenverfügbaren Stickstoffs und anderer Nähr- und Spurenelemente auf, und eignet sich damit als hochwertiger organischer Dünger für die Landwirtschaft (Weiland 2010). Die physikalischen und chemischen Bedingungen sowie die biologischen Prozesse während der Fermentation formen die mikrobiologische Gemeinschaft und zeigen einen hygienisierenden Effekt auf landwirtschaftliche Abwässer insbesondere im Hinblick auf mikrobiologische Risikofaktoren wie Pathogene und ARGD (Wirth et al. 2012; Kröber et al. 2009c; Juliana Alves Resende et al. 2014).

1.3.1 Die Biogasproduzierende bakterielle Gemeinschaft

Ein detailliertes Verständnis der biogasproduzierenden mikrobiellen Gemeinschaft ist sowohl für die Prozessoptimierung als auch die Bewertung des hygienisierenden Potentials relevant. Da jedoch kultivierungsabhängige Methoden nur ca. 10 % des taxonomischen Spektrums abbilden können sind moderne metagenomische Ansätze zur Aufklärung nötig (Amann, Ludwig, and Schleifer 1995; J. A. Perry and Wright 2013). In einer Studie von Wirth et al. (2012) kann über *short-read next-generation sequencing* die Komposition eines mikrobiellen Konsortiums durch die taxonomische und funktionelle Zuordnung von 90 % der Daten aufgeklärt werden. Das taxonomi-

sche Profil der Biogasgemeinschaft bestätigt, wie in Abbildung 4 dargestellt, nicht nur die Dominanz der prokaryotischen Domäne mit sowohl Eubacteria als auch Archaea sondern auch eine Aufschlüsselung dieser systematischen Gruppen. Eubacteria werden überwiegend durch das Phylum Firmicutes vertreten während Methanomicrobiales in den Archaea dominiert.

Der anaerobe Abbau komplexer organischer Substrate durch Hydrolyse von lignozellulosereicher, pflanzlicher Biomasse erfolgt vornehmlich durch Gattungen der Clostridia und Bacilli. Eine erwartungsgemäße Dominanz von Clostridia (36%) und Bacilli (11%) tritt unter den identifizierten Arten auf. Weniger verbreitet sind Bacteroidia (3%), Mollicutes (3%), Gammaproteobakterien (3%) und Actinobakterien (3%) (Wirth et al. 2012). Der große Anteil der Clostridiales-Ordnung am bakteriellen Spektrum weist auf eine essenzielle Rolle der darin zusammengefassten funktionellen Gruppen am Ablauf des Fermentationsprozesses hin. Sie sind am Abbau von Polysaccharidmolekülen durch zellulolytische Aktivität beteiligt, nutzen diverse Fermentationswege und verstoffwechseln Zucker zu organischen Säuren (Demain, Newcomb, and Wu 2005). Pathogene Vertreter der Ordnung treten selten und nur in Form von *C. perfringens* auf.

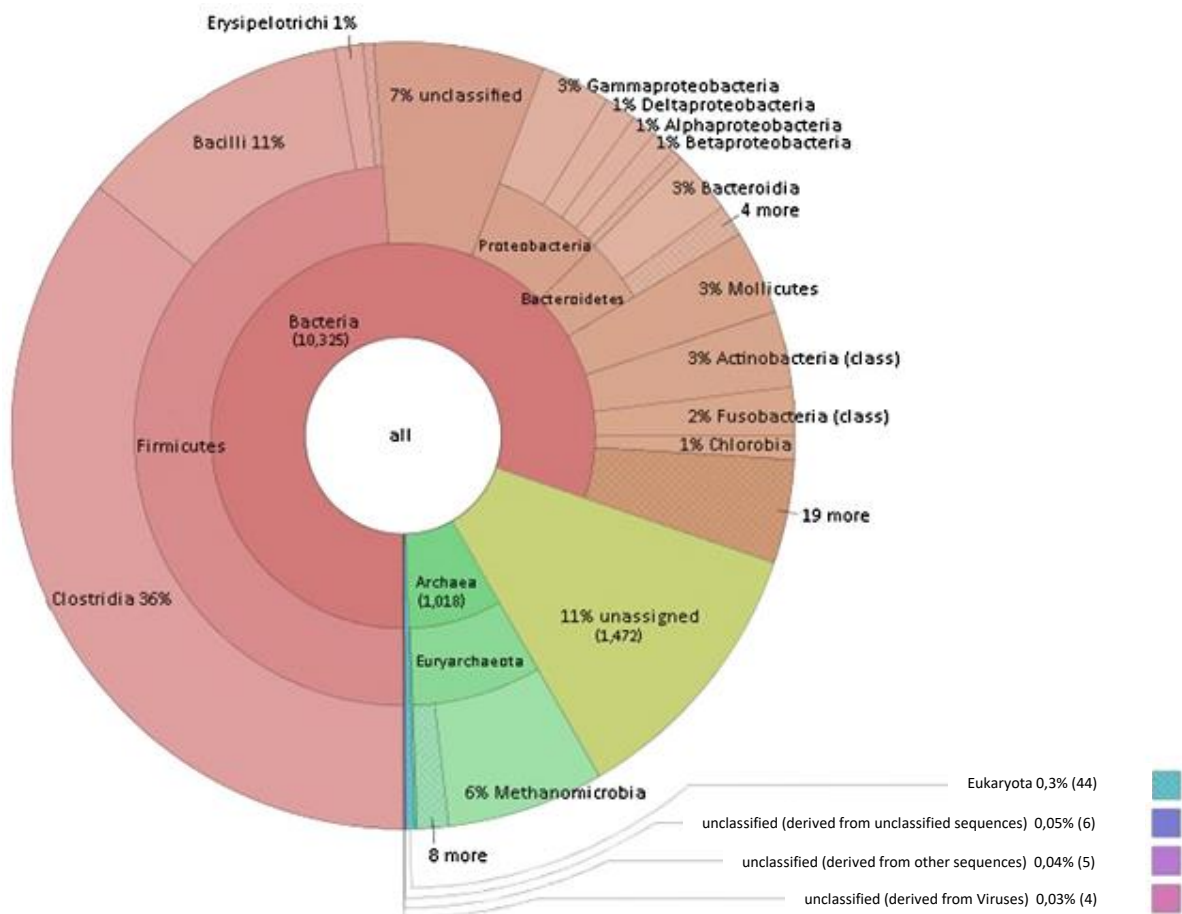


Abbildung 4 Taxonomische Verteilung der mikrobiologischen Gemeinschaft in einer Biogasanlage (Wirth et al. 2012). Bakterien dominieren die Gemeinschaft, Archaea vertreten ca. 10% des Mikrobioms. Innerhalb des dominierenden Phylums Firmicutes herrschen Clostridia und Bacilla vor.

Die zweitgrößte Gruppe der Eubacteria in der Population ist die Klasse der Bacilli mit der häufigste Spezies *Enterococcus* spp. deren hydrolytischen Fähigkeiten zum Abbau von Mehrfachzuckern bekannt ist. Zusätzlich zu den bekannten phylogenetischen Kategorien wurden 7 % der bakteriellen Sequenzen nicht detailliert klassifiziert werden (Wirth et al. 2012).

Produkte der bakteriellen Fermentationswege werden durch acetoklastische Archaea des methanogenen Konsortiums in Biogas umgewandelt. Korrelierend mit den Ergebnissen anderer Studien gehören ca. 10 % der identifizierten Mikroorganismen den Archaea an (Krause et al. 2008; Jaenicke et al. 2011).

Ein empfindliches Gleichgewicht zwischen der Aktivität von H₂-produzierenden Clostridien und den hydrogenotrophen Methanogenen innerhalb des biogasproduzierenden mikrobiellen Konsortiums ist nötig um den Partialdruck von H₂ zu regulieren und eine vollständige Fermentation zu gewährleisten (Boone, Whitman, and Rouvière 1993).

Als dominierende Ordnung tritt Methanomicrobiales auf. Archaea dieser Ordnung nutzen die von acetogenen Bakterien erzeugten flüchtigen organischen Säuren, CO₂, und H₂ als Substrate der Methanogenese. Die Vorherrschaft hydrogenotropher Methanogener deutet auf die Bevorzugung des hydrogenotrophischen Stoffwechselweges zur Methanbildung und einer minderwertigen Rolle der acetoklastischen Methanogenese hin (Wirth et al. 2012).

Die Funde von Wirth et al. (2012) bestätigen die Ergebnisse anderer metagenomischer Studien der taxonomischen Zusammensetzung der Biogaskommunität und zeigen dass *next-generation sequencing* als vertrauenswürdige Methode eingesetzt werden kann (Kröber et al. 2009c; Huang et al. 2002; Klocke et al. 2007; McHugh et al. 2003; Mladenovska, Dabrowski, and Ahring 2003).

1.3.2 Hygienisierendes Potenzial landwirtschaftlicher Abwasserbehandlung

Unbehandelte landwirtschaftliche Abwässer stellen einen Eintragspfad für Antibiotika, pathogene Bakterien, Resistenzen und Resistenzgene in Boden, Wasser und Nutzpflanzen dar (Chee-Sanford et al. 2009). Die Zwischenschaltung von Biogasanlagen kann als eine effiziente Emissionsminderungsstrategie vor der Ausbringung von Wirtschaftsdüngern genutzt werden, wie in Abbildung 5 dargestellt. Der Reduktionseffekt von Biogasanlagen auf Antibiotika ist bereits durch diverse Studien gut dokumentiert (Spielmeyer, Ahlborn, and Hamscher 2014; Spielmeyer et al. 2015; Ratsak et al. 2013; Manyi-Loh et al. 2013). Doch lassen die chemischen, physikalischen und biologischen Bedingungen in anaeroben Fermentern eine hygienisierende bzw. reduzierende Wirkung auch auf Krankheitserreger und ARG vermuten.

Das pathogene Potential landwirtschaftlicher Abwässer wird unter anderem durch Enterobacteriaceae gebildet. Bakterien dieser Familie sind typische Darmkommensalen in Mensch und Tier. Pathogene Vertreter wie *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. und *Citrobacter* spp. können Sepsis, Meningitis, Wund-, Atem- und Harnwegsinfektionen beim Menschen, sowie Mastitis bei Rindern und Enteritis bei Schweinen und Rindern hervorrufen (GERMAP 2012). Klinische Relevanz erlangen diese Bakterien insbesondere durch die verbreitete Resistenz gegenüber diversen β -Lactam Antibiotika wie Penicilline, Aztreonam und Cephalosporine der ersten, zweiten und dritten Generation, wie sie ESBL-bildende *E. coli* sowie Enterobacteriaceae der KESC-Gruppe (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. und *Citrobacter* spp.) tragen und in diversen Studien landwirtschaftlicher Abwässer nachgewiesen werden können (Pitout et al. 2005; Horton et al. 2011; C. S. Hölzel et al. 2010; Witte and Mielke 2003; Glaeser, S.P., Schauss, T., Brunner, J.S., Sowinsky, O., Breves, G., Kämpfer 2016).

Pathogene Vertreter der kommensalen Enterococcaceae können Wund-, Harnwegsinfektionen, Endokarditis und Sepsis hervorrufen und zählen zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen (Linden 2007; Hammerum 2012; GERMAP 2012). Speziell *E. faecalis* und *E. faecium* treten

häufig in fäkalem Abwasser auf und stellen neben ihrer opportunistischen Pathogenität durch eine erworbene Vancomycin-Resistenz ein Gesundheitsrisiko dar (GERMAP 2012). Und auch Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) werden in Schwein- und Geflügelbetrieben, sowie tierischen Lebensmitteln nachgewiesen (Boerlin et al. 2001; Butaye et al. 1999; Braga et al. 2013; Hermanovská et al. 2016; Robredo et al. 2000).

Auch *Staphylococcus spp.* besiedelt als kommensaler Organismus Haut und Schleimhäute von Mensch und Tier und umfasst ebenfalls pathogene Vertreter wie *S. aureus*. Dieser kann Endokarditis, Haut-, Lungenentzündungen und Wundinfektionen im Menschen und zudem Enteritis bei Schweinen, Mastitis bei Rindern und Sepsis bei Geflügel hervorrufen (GERMAP 2012). Der Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) ist aufgrund seiner multiresistenten Eigenschaften gegenüber β -Lactam Antibiotika, und häufig auch weiterer Antibiotika von besonderem klinischen Interesse (GERMAP 2012). MRSA wird in landwirtschaftlichen Betrieben der Schweine- und Rinderhaltung nachgewiesen werden und die bisherige Trennung zwischen *livestock-associated* MRSA (LA-MRSA) und *healthcare-associated* MRSA (HA-MRSA) sowie *community-associated* MRSA (CA-MRSA) verschwimmt zunehmend (Bal et al. 2016; Grøntvedt et al. 2016; Dierikx et al. 2016; Klous et al. 2016).

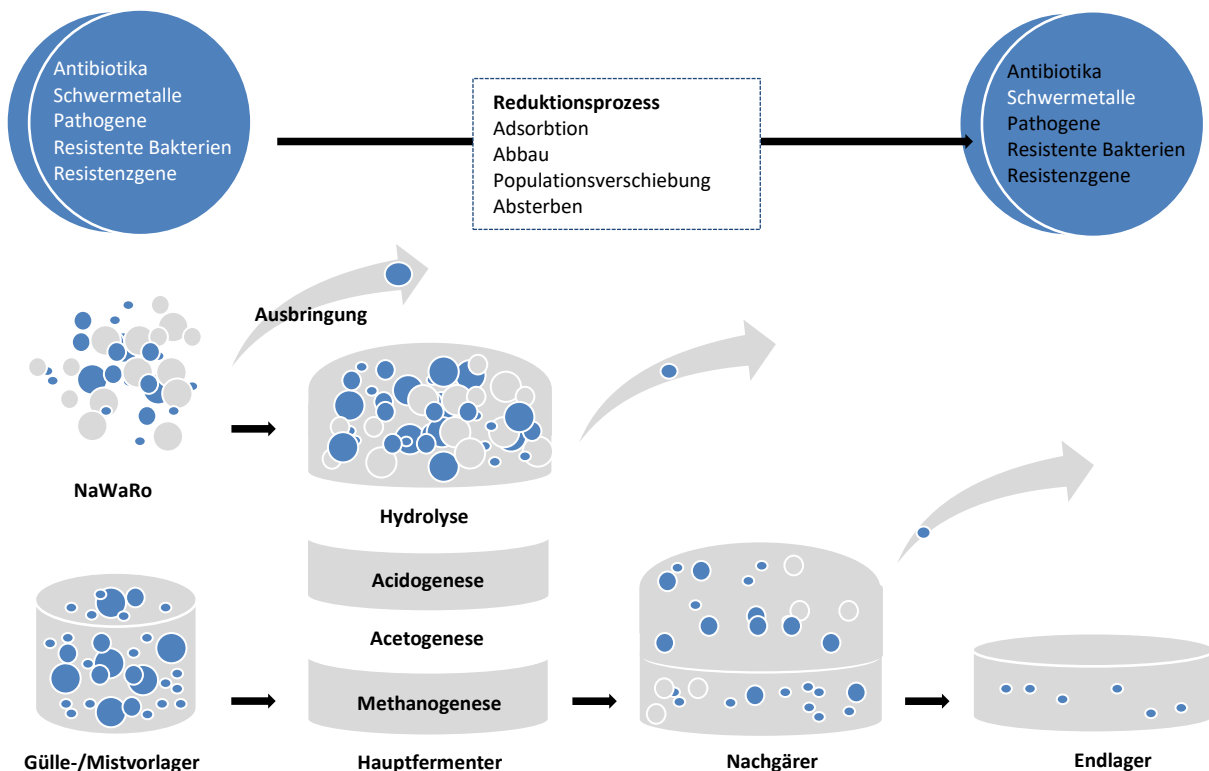


Abbildung 5 Reduktion von Schadstoffen durch die biotechnologische Behandlung langwirtschaftlicher Abwässer (Wings and Dott 2015).

Zur Reduktion dieser bekannten Pathogene wurde die Prozesstemperatur von bis zu 60 °C in thermophilen Anlagen als ein entscheidender Faktor identifiziert (Beneragama et al. 2013; Sahlström et al. 2008a; Sahlström 2003b). Jedoch trägt auch die mikrobiologische Gemeinschaft, die unter Prozessbedingungen entsteht und sich von denen unbehandelter Abwässer unterscheidet, dazu bei. Die Prozessphasen sind Teil des natürlichen Stoffwechsels bestimmter Organismengruppen, insbesondere Clostridia und den methanogenen Archaea, die wie bereits beschrieben hauptsächlich von nicht kultivierten oder schwer kultivierbaren Organismen geformt werden und einen sehr geringen Anteil bekannter (*C. perfringens*) bzw. keine (Archaea) pathogenen Vertreter haben.

(Wirth et al. 2012). Studien zur Reduktion bestimmter Bakterien wie die von Sahlström (2003), Eikmeyer et al. (2013), Schauss et al. (2015) und Schauss et al. (2016) bleiben selten und sind aufgrund der Komplexität der biologischen Systems schwer zu generalisieren. Erkenntnisse über den Effekt der Fermentation auf ARG und resistente Bakterien ist sogar elusiver und deuten neben thermischen und zeitlichen Faktoren auf eine ARG-abhängige Reduktions- bzw. Proliferationsaktivität hin (Resende et al. 2014; Resende et al. 2014; Storteboom et al. 2007).

ZIELSETZUNG

Kolonie-bildende Einheiten (KBE) auf diversen Komplex- und Selektivmedien sowie eine stichprobenhaft erstellte Isolatbibliothek sollen, neben der Erfassung der kultivierbaren bakteriellen Ladung, der Prävalenz medizinisch relevanter Schlüsselorgansimen und des Rückhaltungs- bzw. Eliminationspotential des Fermentationsprozesses auf unerwünschte Bakterien, auch die Eignung klinisch genutzter Wachstumsmedien für die Charakterisierung der komplexen Umweltprobenmatrizes klären.

Ein Antibiotogramm mit acht veterinärmedizinisch relevanten Antibiotika, unter anderem β -Lactam-Antibiotika, Tetrazyklin und Sulfonamid, soll erstellt werden um die Empfindlichkeit potentiell pathogener Bakterien wie Enterobacteriaceae und Enterococcaceae, aber auch Umweltbakterien, vergleichend in Substrat und Gärrest der Anlagen zu bestimmen.

Langwierige und materialaufwändige mikrobiologische Methoden sind nötig um die Gefährdung durch resistente Pathogene auf klinischer Ebene aufzuklären. Die molekularbiologische Erfassung und Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen zur Bewertung der umweltrelevanten Beschaffenheit einer Abwasserprobe soll eine ökonomische Alternative darstellen, der der zeitliche Aufwand kultivierungsabhängiger Verfahren fehlt.

Der qualitative und quantitative Nachweis von Tetrazyklin- und Sulfonamidresistenzgenen soll Einblick in Spektrum und Niveau von Resistenzgenen in landwirtschaftlichen Abwässern unterschiedlicher Herkunft, sowie den Einfluss von Antibiotika, Schwermetallen und der anaeroben Abwasserbehandlung gewähren. Neben der Analyse realer Anlagen sollen zwei kontinuierliche Durchflussfermenter im Labormaßstab unter definierter Zugabe von Antibiotika (AB) in der ersten Hälfte des Versuchsverlaufs gegenüber eines Kontrollfermenters über einen Gesamtzeitraum von 60 Tagen untersucht werden, um die Wirkung hoher Antibiotikakonzentration über kurze Zeiträume, ebenso wie die Übertragbarkeit zu realen Systemen zu erhellen. Das breite Spektrum an Analyseverfahren soll die genaue Charakterisierung des Probenmaterials und, darüber hinaus eine Bewertung der verwendeten Methoden im Hinblick auf die Vergleichbarkeit zukünftiger Studien mit minimalem Aufwand ermöglichen.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Probenahme und Kennung

Screening 2012 und Jahresgang 2013

Für ein landesweites *screening* wurden 15 deutsche Biogasanlagen stichprobenartig im Jahr 2012 mit Eingangsproben E (Gülle / Mist) und Ausgangsproben A (Gärrest, nachwachsende Rohstoffe, vergoren) beprobt (Abbildung 9). Im Screening wurden E- und A-Proben zeitgleich entnommen wodurch kein direkter Zusammenhang zwischen dem Probematerial besteht.

Im Jahr 2013 wurden die Biogasanlagen 1, 8 und 15 der Beprobung 2012, an fünf weiteren Terminen beprobt, um eine größere zeitliche Auflösung der Daten zu erzielen. Bis auf den ersten und letzten Termin wurden jeweils zwei Proben aus Substrat und Gärrest genommen. Bei der ersten Probennahme entfiel die Gärrestprobe und bei der letzten wurde kein Eingangssubstrat beprobt. Abbildung 10 gibt einen Überblick über die zeitliche Staffelung der Probennahmen im Jahr 2013 wieder. Die Kennzeichnung der Proben für das *screening* 2012 und den Jahresgang 2013 kann Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7 Probenkennzeichnung.

	Zeitpunkt	Biogasanlage (BGA)	Substrat/Gärrest (E/A)	Kennzeich- nung
<i>screening</i> 2012	03.07.12	BGA1	Substrat	BGA1E
	03.07.12	BGA1	Gärrest	BGA1A
	02.07.12	BGA2	Substrat	BGA2E
	02.07.12	BGA2	Gärrest	BGA2A
	06.03.12	BGA3	Substrat	BGA3E
	06.03.12	BGA3	Gärrest	BGA3A
	05.03.12	BGA4	Substrat	BGA4E
	05.03.12	BGA4	Gärrest	BGA4A
	04.07.12	BGA5	Substrat	BGA5E
	04.07.12	BGA5	Gärrest	BGA5A
	04.09.12	BGA6	Substrat	BGA6E
	04.09.12	BGA6	Gärrest	BGA6A
	07.03.12	BGA7	Substrat	BGA7E
	07.03.12	BGA7	Gärrest	BGA7A
	07.05.12	BGA8	Substrat	BGA8E
	07.05.12	BGA8	Gärrest	BGA8A
	08.05.12	BGA9	Substrat	BGA9E
	08.05.12	BGA9	Gärrest	BGA9A
	09.05.12	BGA10	Substrat	BGA10E
	09.05.12	BGA10	Gärrest	BGA10A
	03.09.12	BGA11	Substrat	BGA11E
	03.09.12	BGA11	Gärrest	BGA11A
	05.09.12	BGA12	Substrat	BGA12E
	05.09.12	BGA12	Gärrest	BGA12A
	08.10.12	BGA13	Substrat	BGA13E
	08.10.12	BGA13	Gärrest	BGA13A
	09.10.12	BGA14	Substrat	BGA14E
	09.10.12	BGA14	Gärrest	BGA14A
	10.10.12	BGA15	Substrat	BGA15E
	10.10.12	BGA15	Gärrest	BGA15A

Tabelle 7 fortgesetzt.

Jahresgang 2013	Feb. 2013	BGA1	Substrat	13.1BGA1E
	Apr. 2013	BGA1	Substrat	13.2BGA1E
	Apr. 2013	BGA1	Gärrest	13.2BGA1A
	Jul. 2013	BGA1	Substrat	13.3BGA1E
	Jul. 2013	BGA1	Gärrest	13.3BGA1A
	Okt. 2013	BGA1	Substrat	13.4BGA1E
	Okt. 2013	BGA1	Gärrest	13.4BGA1A
	Jan. 2014	BGA1	Gärrest	13.5BGA1A
	Feb. 2013	BGA8	Substrat	13.1BGA8E
	Apr. 2013	BGA8	Substrat	13.2BGA8E
	Apr. 2013	BGA8	Gärrest	13.2BGA8A
	Jul. 2013	BGA8	Substrat	13.3BGA8E
	Jul. 2013	BGA8	Gärrest	13.3BGA8A
	Okt. 2013	BGA8	Substrat	13.4BGA8E
	Okt. 2013	BGA8	Gärrest	13.4BGA8A
	Jan. 2014	BGA8	Gärrest	13.5BGA8A
	Feb. 2013	BGA15	Substrat	13.1BGA15E
	Apr. 2013	BGA15	Substrat	13.2BGA15E
	Apr. 2013	BGA15	Gärrest	13.2BGA15A
	Aug. 2013	BGA15	Substrat	13.3BGA15E
	Aug. 2013	BGA15	Gärrest	13.3BGA15A
	Okt. 2013	BGA15	Substrat	13.4BGA15E
	Okt. 2013	BGA15	Gärrest	13.4BGA15A
	Jan. 2014	BGA15	Gärrest	13.5BGA15A

Eingangspuben wurden durch die Kombination von Gülle und Mist von mindestens 10 Entnahmestellen in den spezifischen Verhältnissen die in jeder Biogasanlage Verwendung finden erstellt. Nachwachsende Rohstoffe (NaWaRo) wurden nicht beigemischt. Ausgangspuben wurden nach der Durchmischung des Fermenters von mindestens 30 min unter kontinuierlichem Rühren direkt aus dem Fermenter über eine Zeitspanne von 1 h entnommen. Aus jeder dieser Meta-Proben wurden Triplikate für die Bearbeitung im Labor entnommen. Proben für die molekularbiologische Verwendung wurden auf Trockeneis transportiert und langfristig bei -20°C gelagert. Mikrobiologisches, sowie chemisch-, analytisches Probenmaterial wurde bei 4°C transportiert und gelagert und innerhalb von 12 h verarbeitet. Die Probenkennzeichnung ist Tabelle 7 zu entnehmen.

Fermenterstudie 2013

In zwei Fermenterstudien wurden drei kontinuierliche Labormaßstabsfermenter mit einem Volumen von 30 L täglich mit einem Substrat aus Gülle und Maissilage in einem Verhältnis von 1 zu 3 beladen und bei einer Prozesstemperatur von ca. 42 °C für 61 Tage gefahren. Das Substrat wurde aus dem Vorlager von BGA15 bzw. 14 bezogen.

Das Probenmaterial wurde von der Fritzmeier Umwelttechnik GmbH & Co. KG, Abteilung Inocre (Großhelfendorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Bei dem Probenmaterial handelt es sich um Gärreste einer zweimonatigen Fermenterstudie. Für die Studie wurden Fermenter mit Inokulum aus den Biogasanlagen 14 und 15 beladen. Tägliche Fütterungen mit Rindergülle und Maissilage im Verhältnis eins zu drei wurden vorgenommen, während die Temperatur bei 42 °C gehalten wurde. Abbildung 19 zeigt schematisch die Beschickung und tägliche Fütterung aller Versuchsfermenter. Im Verlauf der Fermenterstudie wurden insgesamt sechs Fermenter wie in Abbildung 19 dargestellt bezogen und über einen Zeitraum von 61 Tagen in Versuch 1 und 63 Tagen in Versuch 2, gefüttert und beprobt. Über die Hälfte der Zeit wurde jeweils zwei Fermentern täglich Antibiotika zugesetzt, wie der Abbildung 19 entnommen werden kann. Bei beiden Versuchen wurden alle drei Fermenter zweimal wöchentlich beprobt.

Das Probenmaterial einer der beiden wöchentlichen Beprobungen aus Versuch 1 wurde für jede Woche qualitativ auf das Vorhandensein einer in Tabelle 8 gezeigten Auswahl von 14 ARG und quantitativ auf das Vorhandensein der ARG *sul2*, *tetA*, *tetM* und *tetO* untersucht. Die Probennahmen von Tag 12, Tag 33, Tag 40 und Tag 60 wurden ausgewählt, um ein Probenset vom Beginn des Versuchs, eines kurz vor Absetzen der Antibiotika, eines kurz danach und eines kurz vor Ende des Versuchs zu untersuchen. Nach den gleichen Kriterien wurden die Probensets für Versuch 2 ausgewählt. Verwendet wurden die Proben der Tage 8 und 29 (während der Antibiotikagaben), sowie 36 und 57 (nach Ende der Antibiotikagaben). Die Proben aus Versuch 2 wurden ebenfalls qualitativ auf die, in Tabelle 8 dargestellten ARGs untersucht.

2.1.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) oder für Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg synthetisiert. In Tabelle 8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer mit Angabe ihrer Sequenz dargestellt.

Tabelle 8 Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)	Referenz
tetA-for	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	20	Ng <i>et al.</i> , 2001
tetA-rev	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	20	
tetB-for	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	20	
tetB-rev	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG	20	
tetC-for	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	20	
tetC-rev	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC	20	
tetG-for	GCT CGG TGG TAT CTC TGC TC	20	
tetG-rev	AGC AAC AGA ATC GGG AAC AC	20	
tetS-for	CAT AGA CAA GCC GTT GAC C	19	
tetS-rev	ATG TTT TTG GAA CGC CAG AG	20	
tetX-for	CAA TAA TTG GTG GTG GAC CC	20	Aminov, <i>et al.</i> , 2001
tetX-rev	TTC TTA CCT TGG ACA TCC CG	20	
tetM-for	ACA GAA AGC TTA TTA TAT AAC	21	
tetM-rev	TGG CGT GTC TAT GAT GTT CAC	21	
tetO-for	ACG GAR AGT TTA TTG TAT ACC	21	
tetO-rev	TGG CGT ATC TAT AAT GTT GAC	21	
tetQ-for	AGA ATC TGC TGT TTG CCA GTG	21	
tetQ-rev	CGG AGT GTC AAT GAT ATT GCA	21	
tetT-for	AAG GTT TAT TAT ATA AAA GTG	21	
tetT-rev	AGG TGT ATC TAT GAT ATT TAC	21	
tetW-for	GAG AGC CTG CTA TAT GCC AGC	21	Graves <i>et al.</i> , 2011
tetW-rev	GGG CGT ATC CAC AAT GTT AAC	21	
tetB/P-for	AAA ACT TAT TAT ATT ATA GTG	21	
tetB/P-rev	TGG AGT ATC AAT AAT ATT CAC	21	
otrA-for	GGC ATY CTG GCC CAC GT	21	
otrA-rev	CCC GGG GTG TCG TAS AGG	21	
sul1-L	GTG ACG GTG TTC GGC ATT CT	20	
sul1-R	TCC GAG AAG GTG ATT GCG CT	20	
sul2-L	CGG CAT CGT CAA CAT AAC CT	20	
sul2-R	TGT GCG GAT GAA GTC AGC TC	20	
<i>sul2</i> -FW	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	22	Pei <i>et al.</i> 2006
<i>sul2</i> -RV	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	22	
sul3-L	GAG CAA GAT TTT TGG AAT CG	20	Perreten & Boerlin, 2003
sul3-R	CAT CTG CAG CTA ACC TAG GGC TTT GGA	27	
MR for A	GAG TTT GAT CAT GGC TCA G	19	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
MR rev C	ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT	21	

2.1.3 Versuchsstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchsstämme sind in Tabelle 9 abgebildet.

Tabelle 9 Versuchsstämme.

Versuchsstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> JM109 pGEM-T	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rK-,mK+), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI^qΔM15</i>]	(Kobs 1995)
<i>Escherichia coli</i> JM109 pGEM-T/ <i>tetA</i>	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rK-,mK+), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI^qΔM15</i>]; <i>tetA</i> -PCR Produkt wurde in die MCS des Amp ^r pGEM-T cloning Vektor (Promega, Madison, USA) einkloniert	Wings, T.; IHU, Aachen
<i>Escherichia coli</i> JM109 pGEM-T/ <i>tetB</i>	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rK-,mK+), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI^qΔM15</i>]; <i>tetB</i> -PCR Produkt wurde in die MCS des Amp ^r pGEM-T cloning Vektor (Promega, Madison, USA) einkloniert	Wings, T.; IHU, Aachen
<i>Escherichia coli</i> JM109 pGEM-T/ <i>tetO</i>	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rK-,mK+), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI^qΔM15</i>]; <i>tetO</i> -PCR Produkt wurde in die MCS des Amp ^r pGEM-T cloning Vektor (Promega, Madison, USA) einkloniert	Busse, M.; IHU Aachen
<i>Escherichia coli</i> JM109 pGEM-T/ <i>sul2</i>	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rK-,mK+), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI^qΔM15</i>]; <i>sul2</i> -PCR Produkt wurde in die MCS des Amp ^r pGEM-T cloning Vektor (Promega, Madison, USA) einkloniert	Busse, M.; IHU Aachen

2.1.4 Kulturmedien

Zur mikrobiologischen Untersuchung von Substrat und Gärrest der Biogasanlagen wurden die folgenden Medien verwendet. Die Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Neogen Acumedia (Michigan, USA) bezogen.

Caseinpepton-Sojamehl-Agar (CASO)

CASO-Agar ist ein Universalmedium, welches zur Kultivierung von vielen aeroben und anaeroben Mikroorganismen verwendet werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde es verwendet um die Gesamtzahl der mesophilen und psychrotoleranten Mikroorganismen durch Inkubation bei 37°C in den verschiedenen Proben zu ermitteln.

Chromogenes Medium zur Detektion ESBL-produzierender Organismen

Zur Detektion von *Extended Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL) produzierenden gramnegativen Bakterien wurden CHROMagar ESBL (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld) und chromID ESBL (Biomérieux, Nürtingen) Agarplatten verwendet. Beide Medien enthalten das Antibiotikum Cefpodoxime, welches als Marker zur Identifizierung von ESBL produzierenden Organismen dient (Glupczynski et al. 2007). Die Enterobacteriaceae *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* und *Proteus* können aufgrund von chromogenen Reaktionen auf dem Medium anhand der Koloniefarbe differenziert werden. Auf CHROMagar ESBL und chromID ESBL sollen ESBL *E. coli* rötlich-pinke, ESBL KECS (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp.) grünblaue und Vertreter der Proteae braune Kolonien ausbilden. Andere gramnegative, sowie grampositive Bakterien und Hefen sollen auf den ESBL-Chrommedien im Wachstum inhibiert werden.

Chromogenes Medium zur Detektion von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Die Selektion von MRSA erfolgte auf CHROMagar MRSA (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld) und chromID MRSA (Biomérieux, Nürtingen) Agarplatten. Beide Medien enthalten eine hohe Salzkonzentration um Staphylokokken und das Antibiotikum Cefoxitin um MRSA zu isolieren (J. D. Perry et al. 2004). Das Wachstum Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus* wird gehemmt. Andere Bakterien erscheinen farblos, mit blauer Färbung oder werden ebenfalls im Wachstum gehemmt.

MRSA werden auf CHROMagar MRSA als rosafarbene und auf chromID MRSA als grüne Kolonien beschrieben.

Chromogenes Medium zur Detektion von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* (VRE)

Die Detektion von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*, welche hauptsächlich ihre Resistenz erworben haben, erfolgte auf CHROMagar VRE (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld) und chromID VRE (Biomérieux, Nürtingen) Agarplatten. Die Selektion beruht auf der Zugabe der chromogenen Substanzen alpha-Glucosidase und beta-Galactosidase sowie 8 mg/L des Antibiotikums Vancomycin (Ledeboer et al. 2007). VRE. *faecalis* und VRE. *faecium* erscheinen, nach Angaben des jeweiligen Herstellers, auf CHROMagar VRE pink und auf chromID VRE blaugrün bzw. violett. Intrinsisch resistente Enterokokken, sowie andere Mikroorganismen, werden auf beiden Selektionsmedien gehemmt oder bilden eine andere Färbung der Kolonie aus.

Columbia-Agar mit Schafblut (ColSB)

Columbia-Agar mit 5% Schafblut (Oxoid, Wesel) ist ein Universalmedium und dient zur Anzucht von anspruchsvollen aeroben und anaeroben Organismen. Aufgrund des zugesetzten Schafbluts sind Hämolysereaktionen der Organismen sichtbar. In der vorliegenden Arbeit wurde es ebenfalls zur Ermittlung der Gesamtzahl von aeroben Mikroorganismen und anaeroben Sporenbildnern in den verschiedenen Proben verwendet. Zudem fand es Anwendung zur Anzucht von Mikroorganismen vor der Identifizierung über MALDI-TOF und vor der Bestimmung der MHK über Mikrobouillondilutionsverfahren.

Eosin-Methylenblau-Agar (EMB)

EMB-Agar dient zur Isolation und Differenzierung von gramnegativen coliformen Bakterien aus klinischem und nicht klinischem Material. Die ursprüngliche Rezeptur von HOLT-HARRIS und TEAGUE (1916) beinhaltet Saccharose und Lactose, sowie die zwei Indikatorfarbstoffe Eosin Y und Methylenblau. (Levine 1943) modifizierte diese Rezeptur, indem er Saccharose entfernte und die Lactose-Konzentration verdoppelte. Der Selektionsmechanismus beruht auf der Hemmung von grampositiven Organismen durch Methylenblau. Zudem führen beide Indikatorfarbstoffe über die Ansäuerung des Mediums durch Lactose-Fermenter zu blauschwarzen Kolonien und einem grün-metallischen Glanz bei *E. coli*. Organismen, welche keine Lactose fermentieren können, erscheinen farblos und transparent.

Galle-Aesculin-Azid-Agar (GEA)

GEA-Agar wird zur selektiven Isolation und Differenzierung von Enterokokken verwendet. gramnegative Organismen sollen im Wachstum durch Natriumazid gehemmt werden. Die hohe Gallensalz-Konzentration im Medium erschwert zudem das Wachstum anderer grampositiver Bakterien, wohingegen halophile Enterokokken nicht beeinträchtigt werden. Ein weiterer Selektionsmechanismus beruht auf dem Glycosid Aesculin, welches von Enterokokken zu Aesculetin und Glucose hydrolysiert wird. Das Aesculetin reagiert mit dem im Medium befindlichen Eisen-Ammonium-Citrat und es bildet sich ein dunkelbrauner bis schwarzer Hof um die Kolonie (Swan 1954).

MacCONKEY-Agar

Das MacCONKEY Selektivmedium dient, wie auch EMB, zur Isolation und Differenzierung von coliformen Bakterien aus klinischem und pharmazeutischem Material sowie zur Untersuchung von Lebensmitteln und Trinkwasser. Der Agar basiert auf Gallensalzen, Neutralrot und Lactose (MacConkey 1905) und diente zur Differenzierung von *Salmonella typhosa* von anderen Enterobakterien. Durch Modifikationen der Konzentrationen von Gallensalzen und Neutralrot, sowie der Zugabe von Natriumchlorid konnte eine Differenzierung innerhalb der Enterobacteriaceae er-

möglichst werden. Die im Medium enthaltene Gallensalz-Mixtur und das Kristallviolett sind selektive Agenzien, welche das Wachstum von grampositiven Kokken inhibieren, jedoch das Wachstum von gramnegativen Organismen nicht beeinträchtigen sollen. Die Ansäuerung des Mediums bei der Lactose-Fermentation führt zu einem Umschlag des pH-Indikators Neutralrot und zur Ausfällung der Gallensalze. *E. coli* bildet, nach Angaben des Herstellers, auf diesem Agar pinke Kolonien mit und ohne Gallensalz-Präzipitation aus, wohingegen Nicht-Lactose-Fermenter farblose Kolonien ausbilden.

Mannitol-Salz-Agar (MS)

MS-Agar wird zur Isolation von Staphylokokken verwendet und basiert auf der Rezeptur von (Chapman 1945). Aufgrund der Toleranz von Staphylokokken gegenüber hohen Salzkonzentrationen, können diese auf dem Medium mit 7,5% Natriumchlorid wachsen, während andere Mikroorganismen im Wachstum gehemmt werden sollen. Durch die Fermentation des Mannitols wird das Medium angesäuert und es findet ein pH-Umschlag des Indikators Phenolrot von rot zu gelb statt. Pathogene, Koagulase-positive Staphylokokken können Mannitol fermentieren und bilden gelbe Kolonien mit gelben Höfen. Nicht pathogene Staphylokokken verwerten kein Mannitol und bilden rote Kolonien ohne Färbung des Mediums.

Neomycin-Blutagar

Anaerobier-Blutagar mit Neomycin (Merck Millipore, Darmstadt) dient zur Isolierung anaerober Bakterien aus klinischem Untersuchungsmaterial. Das nährstoffreiche Medium begünstigt das Wachstum von anspruchsvollen anaeroben Organismen und das supplementierte Antibiotikum Neomycin inhibiert das Wachstum von vielen fakultativen Anaerobiern, insbesondere Enterobacteriaceae, welche als Begleitflora auftreten können (Waksman 1950). Um eine Selektion zu begünstigen, wurden die Agarplatten 48 h vor der Beimpfung in einer anaeroben Atmosphäre vorreduziert.

Lysogeny Broth (LB)

Lysogeny Broth (LB) ist ein Vollmedium aus Hefeextrakt, Pepton und Natriumchlorid (Bertani 1951). LB-Medium und -Agar wurde für die Klonierung und bei der Plasmidpräparation eingesetzt.

R2A-Agar

R2A-Agar ist ein Minimalmedium, welches von Reasoner et al. (1979) zur Ermittlung der Gesamtzahl an Organismen in Trinkwasser entwickelt wurde. Das nährstoffarme Medium soll in Kombination mit einer niedrigen Inkubationstemperatur und einer Inkubationszeit von einer Woche das Wachstum von gestressten, langsam wachsenden und oligotrophen Mikroorganismen ermöglichen ohne dass diese von schnell wachsenden Organismen verdrängt werden.

Salmonella-Shigella-Agar (SS)

SS-Agar wird zur Isolation von Salmonellen und einigen Shigellen-Arten aus klinischem Material und Lebensmittelproben verwendet und wurde von Desoxycholat-Citrat-Agar (Einar Leifson 1935) weiter entwickelt. Die Gallensalze, Natriumcitrat und Brilliantgrün sollen das Wachstum von grampositiven Bakterien sowie einigen coliformen Mikroorganismen inhibieren und verhindern das Schwärmen von *Proteus spp.*. Lactose dient als Kohlenstoffquelle und Neutralrot als pH-Indikator. Da Salmonellen und Shigellen keine Lactose verwerten können, bilden sie auf dem SS-Agar farblose Kolonien. Lactose fermentierende Organismen, wiez. B. *E. coli* bilden pinke Kolonien aus. Durch das supplementierte Eisencitrat und Natriumthiosulfat sollen Schwefelwasserstoff-bildende Salmonellen über ein schwarzes Zentrum identifiziert werden können. Da nur einige Shigellen-Arten auf diesem Medium kultiviert werden können, ist dieses Medium nur bedingt zur Isolation von Shigellen geeignet.

Slanetz & Bartley-Agar (S&B)

S&B-Agar, oder auch m-Enterococcus Agar genannt, wurde von (Slanetz and Bartley 1957) zur Isolation von Enterokokken aus Trinkwasser mittels Membranfilter-Methode entwickelt. gram-negative Organismen werden in ihrem Wachstum durch Natriumazid gehemmt. Der Selektionsmechanismus des Mediums beruht auf dem Redox-Indikator 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid, welches in den Bakterienzellen zu dem roten Farbstoff Formazan reduziert wird und die Kolonien von hellrot bis dunkelrot färbt.

2.1.5 Lösungen und Puffer

1X PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O; pH 7,4
Lysepuffer	200 mM NaCl, 100 mM Tris (pH 8), 20 mM EDTA, 20 mg/ml Lysozym
Matrixlösung	250 µl Organic Solvent, 2,5 mg α-Cyano-4-hydroxymethylsäure
Organic Solvent	500 µl Acetonitril, 475 µl Millipore-Wasser, 25 µl Trifluoressigsäure

2.1.6 Enzyme

KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen, Madison, USA
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
Proteinase K (20 mg/ml)	Quiagen, Hilden

2.1.7 Kits und Marker

6X Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
GeneRuler 1kB DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler 1kB DNA Ladder plus	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), ROX solution provided	Thermo Scientific, Waltham, USA
QIAamp DNA Stool Minikit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ammonium Küvetten-Test 2,0-47,0 mg/L NH ₄ -N	Hach Lange, Düsseldorf, Deutschland
CSB Küvetten-Test 150-1000 mg/L O ₂	Hach Lange, Düsseldorf, Deutschland
Laton Gesamt-Stickstoff Küvetten-Test 20-100 mg/L TNb	Hach Lange, Düsseldorf, Deutschland
Phosphat (ortho/gesamt) Küvetten-Test 2,0-20,0 mg/L PO ₄ -P	Hach Lange, Düsseldorf, Deutschland

2.1.8 Chemikalien

0,5 McFarland-Standard	Biomérieux, Nürtingen
10X PCR Puffer für die KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen, Madison, USA
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Agarose	Serva, Heidelberg
Aztreonam	Sigma-Aldrich, Seelze
BSA	Fermentas, St. Leon-Rot
CASO-Bouillon	Merck, Darmstadt
Cefoxitin	Mast GmbH, Reinfeld

Chloroform	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Seelze
dNTPs (je 2 mM)	Novagen, Madison, USA
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol p. a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
H-Medium	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalziumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Novagen, Madison, USA
Mueller-Hinton-Bouillon (Fertigmedium)	Merck, Darmstadt
Mueller-Hinton-Bouillon (Trockenmedium)	Merck, Darmstadt
Multielementstandards (ICP-MS)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Phenol	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
Selenit-Bouillon	Merck, Darmstadt
TAE-Puffer (50 X), pH 8,0	VWR, Haasrode, Belgien
Tetranatriumpyrophosphat	Merck, Darmstadt
TOC-Standard 1000 mg/L Kohlenstoff	DIMATEC Analysetechnik, Essen
Tris	BioRad, München
α -Cyano-4-hydroxymethylpantothensäure	Bruker Daltonik, Bremen

2.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

10 μ l Pipettenspitzen	Ratiolab GmbH, Dreieich
100 μ l Safe Seal Tips Premium	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
1000 μ l Pipettenspitzen	Heinz Herenz Medizinbedarf, Hamburg
200 μ l Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
48-PCR Plate	Brand, Wertheim
5 μ l Safe Seal Tips Premium	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
5000 μ l epT.I.P.S	Eppendorf, Hamburg
12-Kanal Reagenzreservoir	Brand, Wertheim
AnaeroPack; Anaerogen	Oxoid, Wesel
Acrodisc-Spritzenvorsatzfilter, Proteinweite 0,45 μ m	DIMATEC Analysetechnik, Essen
Autoklaven	
Systec DX-150	Systec GmbH, Wetztenberg
Varioklav Dampfsterilisator TYP 25T	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Brutschränke	
BK 5060 E	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
K 6160	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Cryogenic Vials	VWR, Darmstadt
Elektrophoresekammern	
Compact M	Biometra, Jena
Compact L/XL	Biometra, Jena
Gießkammer: Casting System Compact	Biometra, Jena
Glasperlen 0,25-0,50 mm	Roth, Karlsruhe
Heiz-Magnetrührer	
MR 3001 K	Heidolph, Schwabach

RCT Basic	IKA® Works, INC. Wilmington, USA
RET Basic	IKA® Works, INC. Wilmington, USA
HTS 100	Hach Lange, Düsseldorf
ICP-MS ELAN DRC II	PerkinElmer SCIEX, Waltham, USA
iEMS-Reader MP Type 1401	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Inkubationsschüttler	
CH-4103	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
GFL 3033	GFL, Burgwedel
Kamera: Power Shot G10/ G2	Canon, Krefeld
Kugelmühle MM200	Retsch, Haan
Low Profile Flat 96 PCR Plate, 0,2 ml	VWR, Darmstadt
Cellulose-Nitrate-Filter 0,45 µm	Sartorius, Göttingen
MilliQ® Synthesis A10	Millipore, Darmstadt
Mikroflex MALDI-TOF MS	Bruker Daltonik, Bremen
Mikrowellensystem Ethos 1600	MLS, Leutkirch im Allgäu
MS2 Minishaker	IKA® Works, INC. Wilmington, USA
MSP 96 Target ground steel	Bruker Daltonik, Bremen
Nitrilhandschuhe	verschiedene Hersteller
PCR 8er SoftStrips, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
PCR SoftTubes, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipetten	
0,1-2,5 µl; 2-20 µl; 50-200 µl; 500-1000 µl;	Eppendorf, Hamburg
500-5000 µl Research	Eppendorf, Hamburg
20-200 µl; 500-1000 µl Research plus	Eppendorf, Hamburg
0,5-10 µl; 10-100 µl; 50-200 µl Reference	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter QpH70	Merck Eurolab, Darmstadt
Photometer DR 2800	Hach Lange, Düsseldorf
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Spannungsgerät: Standard Power Pack P25	Biometra, Jena
Sterilbank BDB 4A	Gelaire Flow Laboratories
Sterilfilter PharmAssure®, 0,2 µl	PALL GmbH, Dreieich
Thermocycler	
T Gradient Whatman Professional TRIO	Biometra, Jena
TGradient Thermocycler	Biometra, Jena
realplex ² Mastercycler epgradient S	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
TOC-Analysator DIMATOC 100	DIMATEC Analysentechnik, Essen
Trockenschrank 6060	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Waagen	
2004 MP	Sartorius, Göttingen
4503 MICRO	Sartorius, Göttingen
BL 3100	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	
Fresco 17 Tischzentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Galaxy MiniStar Centrifuge	VWR, Darmstadt
Multifuge 1S-R	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Multifuge 3SR+	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.10 Software und Webseiten

Folgende Software und Webseiten wurden in dieser Arbeit verwendet:

BioDoc Analyzer 2.1, Biometra, Göttingen
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (blast.ncbi.nlm.nih.gov)
Clone Manager Professional 9 for Windows
EUCAST: Antimicrobial wild type distributions of microorganisms (www.mic.eucast.org)
GIMP 2.8 (GNU Image Manipulation Programm)
Microsoft® Office Excel 2007
Microsoft® Office Picture Manager
Microsoft® Office Word 2007
National Center for Biotechnology Information NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)

2.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

Tetranatriumpyrophosphat-Extraktion

Um Mikroorganismen aus Substrat und Gärrest der Biogasanlagen aus der festen Matrix zu lösen, wurde Tetranatriumpyrophosphat als Dispersionsmittel verwendet. Dabei wurden 20 g der jeweiligen Probe mit 200 ml 0,2 % Tetranatriumpyrophosphat (pH 10, sterilfiltriert) in einer sterilen 500 ml Duran-Flasche gelöst. Die Suspension wurde fünf Minuten bei 10 U/min in einem Überkopfschüttler geschüttelt und 30 Minuten zum Absedimentieren stehen gelassen. Der Überstand fand zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten, Differenzierung von verschiedenen Mikroorganismen und Detektion von ESBL-bildenden Mikroorganismen mittels Membranfiltration Verwendung.

Bestimmung von koloniebildenden Einheiten (KBE)

Zur Bestimmung der KBE und zur Differenzierung verschiedener Organismen wurde der Überstand nach der Tetranatriumpyrophosphat-Extraktion zur Erstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe verwendet. Hierzu wurden 3 ml des Überstandes in 27 ml 0,9 % steriler Natriumchlorid-Lösung gelöst und durch anschließendes Vortexen homogenisiert. Dieser Prozess wurde bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-7} wiederholt. Aus dieser Verdünnungsreihe wurden je 10 ml jeder Verdünnungsstufe abgenommen und zur Isolation von anaeroben Sporenbildnern zehn Minuten bei 75 °C in einem Wasserbad pasteurisiert. Je 100 µl wurden nach dem Schema in Tabelle 10 ausplattiert, indem sie auf die jeweilige Agarplatte pipettiert und mittels eines sterilen Spatels gleichmäßig verteilt wurden. Dabei wurden die Verdünnungsstufen von Substrat und Gärrest von BGA 8, 9 und 10 in Triplikaten ausplattiert. Bei den Proben von BGA 11 wurden die Verdünnungen, bis auf CASO 37 °C/ 22 °C und R2A 10^{-4} - 10^{-6} , im Einfachansatz ausplattiert.

Je 100 µl folgender Verdünnungsstufen von Substrat und Gärest diverser Biogasanlagen wurden auf die Nährmedien ausplattiert. Auf ColSB anaerob pasteurisiert und Neomycin anaerob pasteurisiert wurden die Verdünnungsstufen der pasteurisierten Verdünnungsreihe ausplattiert.

Nach der Kultivierung wurden zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl die KBE auf allen Agarplatten gezählt. Zusätzlich wurden auf den Selektivmedien die Kolonien gezählt, welche eine spezifische Wachstumsform zeigten. Die Kolonie-bildenden Einheiten pro Milliliter Eluat wurden wie folgt bestimmt:

Formel 1 Kolonie-bildenden Einheiten pro Milliliter Eluat

$$KBE/ml = \frac{\sum \text{aller gezählten Kolonien}}{\sum \text{Anzahl der Platten pro Verdünnungsstufe} * \text{Verdünnungsstufe}} * 10$$

Tabelle 10 Ausplattierte Verdünnungsstufen zur Ermittlung von Gesamt-KBE und Differenzierung von Organismen.

Nährmedium	ausplattierte Verdünnungsstufen		
	BGA 8 und BGA 9	BGA 10	BGA 11
CASO 37°C	$10^0 - 10^{-7}$	$10^{-3} - 10^{-6}$	$10^0 - 10^{-7}$
CASO 22°C	$10^0 - 10^{-7}$	$10^{-3} - 10^{-6}$	$10^0 - 10^{-7}$
R2A	$10^0 - 10^{-7}$	$10^{-3} - 10^{-6}$	$10^0 - 10^{-7}$
EMB	$10^0 - 10^{-7}$	$10^{-2} - 10^{-6}$	-
ColSB	$10^0 - 10^{-7}$	$10^0 - 10^{-6}$	-
MacCONKEY	$10^0 - 10^{-7}$	$10^{-2} - 10^{-5}$	$10^0 - 10^{-7}$
MS	$10^0 - 10^{-7}$	$10^{-1} - 10^{-5}$	$10^0 - 10^{-7}$
S&B	$10^0 - 10^{-7}$	$10^0 - 10^{-5}$	$10^0 - 10^{-7}$
GEA	$10^0 - 10^{-7}$	$10^0 - 10^{-5}$	-
SS	$10^0 - 10^{-7}$	$10^0 - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-7}$
VRE	$10^0 - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-4}$
MRSA	$10^0 - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-4}$	-
ESBL	$10^0 - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-4}$
ColSB anaerob pasteurisiert	$10^0 - 10^{-7}$	$10^0 - 10^{-6}$	-
Neomycin anaerob	$10^0 - 10^{-6}$	$10^0 - 10^{-6}$	-
Neomycin anaerob pasteurisiert	$10^0 - 10^{-6}$	$10^0 - 10^{-6}$	$10^0 - 10^{-7}$

Membranfiltration zur Detektion von ESBL

Zusätzlich zum Ausplattieren von je 100 µl jeder Verdünnungsstufe auf die ESBL-Chromagarplatten wurde eine Membranfilter-Methode zur Detektion von potentiellen ESBL-produzierenden Mikroorganismen angewendet. Zu diesem Zweck wurde ein steriler Membranfilter mit sterilem Millipore-Wasser angefeuchtet und in einen Büchnertrichter gegeben. 4 ml des Überstandes, nach der Tetranatriumpyrophosphat-Extraktion, wurden auf den Filter pipettiert und mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Aufgrund der 0,45 µm Porengröße des Membranfilters, blieben die Mikroorganismen auf dem Filter zurück. Der Filter wurde mit einer sterilen Pinzette auf eine ESBL-Chromagarplatte überführt und kultiviert. Alle Ansätze erfolgten pro Probe im Triplikat.

Selektive Anreicherung von MRSA

Um Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* selektiv anzureichern und qualitativ nachzuweisen wurde eine Methode entwickelt, die auf dem qualitativen MRSA-Nachweis in Lebensmitteln des Bundesinstitutes für Risikobewertung (Johne et al. 2011) basiert. Hierzu wurden 10 g der Probe zur Anreicherung von Staphylokokken in 100 ml Mueller-Hinton-Bouillon mit 6 % Natriumchlorid überführt und 24 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Davon wurden 1 ml in 9 ml CASO-Bouillon mit 3,5 mg/l Cefoxitin und 50 mg/l Aztreonam überführt. Diese Suspension wurde 24 h bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Nach der Inkubation wurde eine dezimale Verdünnungsreihe bis 10^{-3} in 0,9 % steriler Natriumchlorid-Lösung von der Anreicherung hergestellt. Je 100 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf MRSA-Chromagar ausplattiert.

Selektive Anreicherung von *Salmonella* spp. und *Shigella* spp.

Zur selektiven Anreicherung von Salmonellen und einigen Shigellen wurde Selenit-Bouillon nach (E Leifson 1936) verwendet. Das Natriumselenit soll eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von coliformen Bakterien und anderen Spezies wie z. B. *Enterococcus* spp. haben. Zur Anreicherung wurden 5 g der Probe in 50 ml Selenit-Bouillon überführt und 48 h bei 41 °C schüttelnd kultiviert. Nach der Absedimentation wurden 2 ml des Überstandes verwendet um eine dezimale Verdünnungsreihe in steriler 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung bis 10^{-6} zu erstellen. Je 100 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf SS-Agar ausplattiert.

Anlage von Reinkulturen

Zur weiteren Charakterisierung der Proben wurden von jedem Selektivmedium 5-10 und von den Komplexmedien 10-30 Kolonien ausgewählt und auf dem Ursprungsmedium bis zur Reinkultur vereinzelt.

Kultivierungsbedingungen

Zur Kultivierung von Mikroorganismen wurden die Agarplatten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Psychrotolerante Organismen wurden auf R2A und CASO-Agar bei 22 °C kultiviert. Die Auswertung der Agarplatten erfolgte nach 24 h bzw. 48 h und im Fall von R2A nach einer Woche.

Zur Bestimmung der KBE und weiteren Anzucht von anaeroben Organismen wurden die Agarplatten 48 h vor der Beimpfung in Anaerobier-Töpfen unter Verwendung von AnaeroPacks vorreduziert. Nach dem Ausplattieren wurden diese wieder in einer anaeroben Atmosphäre bei 37 °C für 48 h inkubiert.

Alle Flüssigkulturen wurden bei der entsprechenden Temperatur bei 150 – 170 U/min kultiviert.

Anlage von Dauerkulturen

Zur Konservierung der Umweltisolate werden Kryokulturen in Parallelansätzen angelegt. Dabei werden die Zellen über Nacht in 5 ml CASO-Bouillon angezogen und am Folgetag fünf Minuten bei 8000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml CASO-Bouillon mit 50% sterilem Glycerin (v/v) suspendiert. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C in 2 ml *safe lock* - Reaktionsgefäßen oder in Kryoröhrchen (VRW, Darmstadt). Anaerobe und anspruchsvolle Organismen, welche nicht in CASO-Bouillon kultiviert werden konnten, werden auf dem entsprechenden Agar angezogen. Mittels Impföse wird das Zellmaterial von der Agarplatte entnommen und in 1 ml CASO-Bouillon mit 50 % sterilem Glycerin (v/v) suspendiert.

Zur Konservierung erzeugter *E. coli*-Klone werden 5 ml CASO Bouillon mit 100 µg / ml des Antibiotikums Ampicillin versetzt und mit einer Reinkultur des jeweiligen Bakterienstamms angeimpft. Diese Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 150 rpm in einem Schüttelbrutschrank inkubiert und am Folgetag fünf Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Nach Verwurf des Überstandes wird das Pellet in einem 2 ml *safe lock* Reaktionsgefäß in 1 ml CASO Bouillon mit 50 % sterilem Glycerin (v / v) mit 100 µg / ml Ampicillin resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

Bestimmung der Minimalen-Hemmstoff-Konzentration (MHK) ausgewählter Isolate mittels Mikrobouillondilutionsverfahren (MID)

Die Bestimmung der MHK mittels MID-Verfahren von ausgewählten Organismen beruht auf den Vorgaben des Herstellers MERLIN Diagnostica, Bornheim-Hersel und wurde gemäß den aktuellen Vorgaben des *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS 2012) mit MICRONAUT-S Veterinäre Platten durchgeführt. Die vom IHU gestaltete Plattenkonfiguration befindet sich im Anhang (Abbildung A2). Für die Anzucht der Isolate wurde Columbia-Agar mit 5 % Schaftblut verwendet. 5 ml sterile 0,9 % Natriumchlorid-Lösung wurden mit dem Zellmaterial beimpft, bis die Trübung einem McFarland-Standard von 0,5 entsprach und somit eine definierte Zelldichte eingestellt war. Zur Herstellung des Inokulums wurden bei gramnegativen Bakterien je 50 µl und bei grampositiven Bakterien je 100 µl der Bakteriensuspension in 11 ml Mueller-Hinton Bouillon pipettiert und gut homogenisiert. Bei anspruchsvollen Mikroorganismen wie z. B. Enterokokken oder einige Anaerobier wurden 200 µl der Bakteriensuspension und 11 ml H-Medium verwendet (NCCLS 2012). Zur Beschickung der Mikrotiterplatten wurde das beimpfte Medium in ein steriles Reagenzreservoir gegeben und mittels 12-Kanal Pipette je 100 µl in jeden *well* pipettiert. Die Platten, welche mit Mueller-Hinton Bouillon beimpft wurden, wurden mit Abklebefolien verschlossen und 18-24 h bei 37 °C inkubiert. Die mit H-Medium beimpften Platten wurden zu maximal fünf Platten gestapelt und mit einem Deckel abgedeckt. Die Bebrütung der Platten fand für 22-24 h bei 37 °C statt. Platten, welche mit anaerob wachsenden Organismen beimpft wurden,

wurden in Anaerobier-Töpfen mittels AnaeroPacks in anaerober Atmosphäre inkubiert (NCCLS 2012). Nach der Inkubation wurden die Klebefolien bzw. die Deckel von den Platten entfernt. Auf einem Schüttler wurden die Mikrotiterplatten bis zur vollständigen Homogenisierung der Bakteriensuspension in den *wells* geschüttelt und vor der Messung wurde mit einem Tuch vorhandenes Kondenswasser entfernt. Die photometrische Messung der Testplatten wurde mit dem iEMS-Reader MP Type 1401 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gegen das jeweilige Medium durchgeführt. Als MHK wurde diejenige Antibiotika-Konzentration gewählt, bei der kein Wachstum mehr sichtbar bzw. die $OD \geq 0,4$ war. Konnte nach 24 h kein Wachstum beobachtet werden, wurden die Platten weitere 24 h bebrütet und erneut gemessen.

Identifizierung von Mikroorganismen über MALDI-TOF MS

Die Identifizierung der Bakterienisolate erfolgte über MALDI-TOF MS (Matrix-unterstützte Laser-desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie) in Kooperation mit dem mikrobiologischen Institut des Labordiagnostischen Zentrums (LDZ) der Uniklinik Aachen. Die MALDI-TOF Massenspektrometrie basiert auf der Ionisation von überwiegend ribosomalen Proteinen des kokristallisierten Probenmaterials durch kurze Laserpulse im Hochvakuum. Durch die Beschleunigung der Ionen in einem starken elektrischen Feld, kann die Flugzeit (TOF = *time of flight*) der Analyten gemessen werden. Beeinflusst wird die Flugzeit von der Masse und dem Ionisierungsgrad der ribosomalen Proteine und zeigt somit ein Spezies-spezifisches Spektrum (Marvin, Roberts, and Fay 2003). Das erhaltene Spektrum wird automatisch vom angeschlossenen Computer mit vorhandenen Datenbanken verglichen und man erhält einen *score*, welcher auf den Ähnlichkeiten zwischen dem gemessenen und dem Spektrum aus der Datenbank basiert (Jarman et al. 2000). Ein *score* von 1,7 – 2,0 bedeutet, dass die Gattung identifiziert werden konnte. Eine eindeutige Identifizierung der Spezies liegt bei einem *score* $\geq 2,0$ vor.

Zur Vorbereitung der Mikroorganismen wurden diese auf Columbia Agar mit 5 % Schafblut angezogen, da sie auf diesem Komplexmedium gut anwachsen und ihren Proteinbiosyntheseapparat optimal ausbilden. Mittels eines Zahnstochers wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte entnommen und auf einem *spot* des Targets von innen nach außen kreisend aufgetragen. Mit demselben Zahnstocher wurde ein zweiter *spot* beimpft und somit die Probe leicht verdünnt nochmal aufgetragen. Zur Ko-Kristallisation des bakteriellen Zellmaterials wurde jeder *spot* mit 1 μ l Matrixlösung überschichtet. Als Target wurde das MSP 96 Target ground steel (Bruker Daltonik, Bremen) mit 96 Probenfeldern verwendet. Zur Analyse wird das Target mit den fixierten Proben in den Mikroflex MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen) gegeben. Da diese Methode der Identifizierung auf der Analyse des Proteinprofils von überwiegend ribosomalen Proteinen beruht, ist sie der 16S-rDNA Sequenzierung ähnlich. Sehr eng verwandte Organismen können mit dieser Methode nicht zuverlässig identifiziert werden, welches sich in einem geringen *score* widerspiegelt. Da die Datenbanken, mit denen die gemessenen speziesspezifischen Spektren verglichen wurden, überwiegend klinisch relevante Isolate enthielten, konnten über diese Methode nicht alle Mikroorganismen aus den Umweltproben identifiziert werden. Diese und Organismen mit einem geringen Auswertungs-*score* wurden über die klassische 16S-rDNA Sequenzanalyse mittels PCR und den Primern MRforA und MRrevC identifiziert.

2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Klonierung

Die Klonierung dient der identischen Vervielfältigung von DNA (Green and Sambrook 2012). Dazu wird das gewünschte DNA-Fragment in einen Vektor integriert und in *E. coli in vivo* vervielfältigt. Alle Klonierungen wurden mit dem pGEM-T Easy Vector Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben im Doppelansatz durchgeführt, wobei jeweils ein Ansatz eine Stunde bei

Raumtemperatur, der andere für 24 Stunden bei 7 °C zur Ligation inkubiert wurde. Von den so erzeugten Klonen wurden Dauerkulturen angelegt, mit denen die mit dem Vektor eingefügten ARGs vervielfältigt wurden.

Plasmidisolation

Für die Plasmidisolation wurden das QIAprep Spin Miniprep Kit und das Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben genutzt. Die Isolation der Plasmide erfolgt dabei nach einer alkalischen Lyse durch Binden der DNA an eine Silikatgelmembran in den im Kit enthaltenen *spin columns*. Die Salze werden durch Waschschrte entfernt und die isolierten Plasmide in Wasser eluiert. Es wurden abweichend von den Herstellerangaben 30 µl Wasser für die Elution genutzt. Diese Methode wurde eingesetzt, um die vervielfältigten, klonierten ARGs aus bakteriellen Flüssigkulturen zu präparieren.

Plasmidaufreinigung

Die isolierten Plasmide wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Diese Art der Aufreinigung basiert auf der Bindung der Plasmide an einer Silikatmembran. Verunreinigungen werden während der Waschschrte entfernt, während die Plasmide bis zur Elution mit 30 µl Wasser an die Membran gebunden bleiben.

Gesamt-DNA Extraktion

Die Gesamt-DNA wurde nach einem Protokoll für schwer zu isolierende DNA von Carroll et al. (2010) isoliert. Abweichend vom Protokoll wurden 200 mg Gülle zu Beginn der Isolation eingewogen, der Ansatz im Rahmen der Extraktion bei -80 °C über Nacht eingefroren und abschließend das QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) anstelle des DNeasy Blood and Tissue Extraction Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Es wurden Triplikate aller Proben extrahiert.

In vitro Amplifikation von DNA durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis et al. 1992). Bei dieser Methode dupliziert eine thermostabile Polymerase mithilfe von Oligonukleotiden, die zu den Enden des zu amplifizierenden Fragments komplementär sein müssen, das DNA-Fragment. Bei Wiederholung dieses Vorgangs nimmt die Menge des gewünschten Fragments exponentiell zu. Für diese Arbeit wurde die KOD Hot Start Polymerase von Novagen (Madison, USA) nach Angaben des Herstellers genutzt. Diese Polymerase ist durch zwei monoklonale Antikörper bei Raumtemperatur inhibiert und nimmt erst nach einem initialen Denaturierungsschritt, der die Antikörper abspaltet, ihre Tätigkeit auf. Diese Eigenschaft verhindert, dass sich Primer falsch anlagern und erhöht so die Spezifität. Die 3' - 5' Exonukleaseaktivität dieser Polymerase verringert außerdem die Anzahl falsch eingebauter Nukleotide (Benson, Null, and Muddiman 2003). Tabelle 11 zeigt die finale Konzentration der für die PCR eingesetzten Chemikalien.

Tabelle 11 Konzentrationen der in der PCR-Reaktionen eingesetzten Reagenzien.

10X Puffer	1X
Primer 1	0,3 µM
Primer 2	0,3 µM
dNTPs	0,2 mM
MgSO ₄	1,5 mM
DMSO	5 %
Polymerase	0,1 U/µl
Template	ca. 30 ng
H ₂ O	

Die PCR läuft in drei zyklisch wiederholten Schritten ab: Denaturierung, *Annealing* und Elongation (Mullis et al. 1992). Die initiale Denaturierung findet nur einmal statt und ist dem folgenden zyklischen Ablauf vorangestellt. Sie dient der Aktivierung der Polymerase. Die Denaturierung findet bei 95 °C statt. Bei dieser Temperatur brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Doppelsträngen der DNA auf. Bei der Primerhybridisierung (*Annealing*) wird die Temperatur auf einen Wert gesenkt, der in der Regel 5 – 10 °C unter dem Schmelzpunkt der entsprechenden Primer liegt. So können die Primer effizient binden und unspezifische Produkte werden vermieden (Saiki et al. 1988). Es folgt die Elongation, während der die Polymerase vom 3'-Ende der angelagerten Primer aus, die komplementäre, fehlende Sequenz aus den freien Nukleotiden synthetisiert. Dieser Schritt findet, abhängig von der gewählten thermostabilen Polymerase, bei ungefähr 70 °C statt (Saiki et al. 1988). Die Dauer der Elongation richtet sich nach der Größe der Zielsequenz. Es wurde eine Leistung von einer Kilobase pro Minute angenommen. Nachfolgend sind in Tabelle 12 die einzelnen Schritte der PCR unter Angabe der Temperatur, der Dauer und der entsprechenden Wiederholungen dargestellt.

Tabelle 12 PCR-Phasen.

Initiale Denaturierung	94 °C	2 Min.	} 33X
Denaturierung	94 °C	15 Sek.	
Annealing	$T_m - (5-10\text{ °C})$	30 Sek.	
Elongation	72 °C	1 Min./ kb	
Finale Elongation	72 °C	2 Min.	
Kühlung	10 °C	∞	

Die PCR diente, neben Qualitätskontrollen nach der Plasmidaufreinigung und der DNA Extraktion, dem qualitativen Nachweis von ARG in Probenmaterial.

Größenauffrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Nukleinsäureauftrennung nach Fragmentgröße (Aaij and Borst 1972). Da die DNA negativ geladen ist bewegt sie sich, bei angelegter Spannungsquelle von der Anode zur Kathode durch das Agarosegel. Je schwerer ein DNA-Fragment ist, desto langsamer bewegt es sich durch das Gel, wodurch eine Auftrennung stattfindet. Die mit 1 µl Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) vermischten Proben und der GeneRuler 1 kb DNA Ladder oder der GeneRuler 1 kb DNA Ladder plus (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) wurden in die Kammern eines 1 % Agarosegels (Agarose in 1X TAE) pipettiert und Strom an die Gelelektrophoresekammer angelegt. Das Gel wurde vollständig mit 1X TAE-Puffer bedeckt. Bei 400 mA und 120 V benötigen Marker und Proben 30 - 40 Minuten um sich repräsentativ aufzutrennen. Um die DNA im Agarosegel sichtbar zu machen wurden Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) und Midori Green Advance (0,05 µg/ml) verwendet. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der durch Interkalation mit DNA seine Fluoreszenzemission dahingehend verändert, dass er durch Anregung mit ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden kann (Waring 1965; Le Pecq and Paoletti 1966).

Nukleinsäurekonzentrationsmessung mittels Spektrophotometer

Um eine Nukleinsäurekonzentration als Ausgangswert für die Standardreihe der qPCR zu erhalten, wurde die Absorption bei 260 nm zuvor isolierter und aufgereinigter Plasmid DNA mit einem NanoDrop ND-1000 der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) spektrophotometrisch gemessen. Das Gerät misst die Absorption nicht nur bei den für Nukleinsäuren typischen 260 nm, sondern auch bei 230 nm und 280 nm. Eine Absorption bei 280 nm kann ein Hinweis auf die Anwesenheit von Proteinen, Phenol oder anderen Stoffen sein, während Absorption im Bereich um 230 nm für eine Verunreinigung mit EDTA, Kohlenhydraten und Phenol spricht. Aus diesem Grund wird die Absorption bei 230 nm und 280 nm mit der Absorption bei 260 nm ins Verhältnis gesetzt. Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden nur Proben verwendet, die sowohl ein

260/280 Absorptionsverhältnis von über 1,8, als auch ein 260/230 Absorptionsverhältnis größer als 2,0 hatten, um Verunreinigungen weitestgehend auszuschließen.

Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR wurde mit dem Maxima SYBR Green qPCR Master Mix von Thermo Scientific (Waltham, USA) nach Herstellerangaben, ohne die Verwerdung des ROX Farbstoffs durchgeführt. Die Methode der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) beruht auf dem gleichen Vervielfältigungsprinzip wie die PCR, ermöglicht aber darüberhinausgehend eine Quantifizierung der entstandenen PCR-Produkte in Echtzeit (Holzapfel and Wickert 2007). Die Quantifizierung wird mithilfe von Fluoreszenzmessungen in jedem Zyklus vorgenommen, wobei die Fluoreszenz proportional mit dem PCR-Produkt zunimmt. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet, der in der kleinen Furche der DNA interkaliert (Zipper and Brunner 2004) und dessen Fluoreszenz am Ende der Elongationsphase der PCR gemessen wird. Nach Beendigung des letzten Zyklus wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Da jede dsDNA eine spezifische Schmelztemperatur (T_m) hat, kann durch Erhitzen der DNA bei gleichzeitiger Messung der Änderung der Fluoreszenz festgestellt werden, ob einzig das gewünschte Amplifikat vorliegt. Den folgenden Tabellen 13 und 14 kann die finale Konzentration der Chemikalien eines 25 μ l qPCR Reaktionsansatzes, sowie die Schritte des verwendeten Programms zur Durchführung der qPCR unter Angabe von Temperatur, Dauer und der Zyklenzahl entnommen werden.

Tabelle 13 Konzentrationen (μ M) und Mengen (μ l) der in der qRT-PCR eingesetzten Reagenzien.

Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), no ROX	12,5 μ l
Primer 1	0,3 μ M
Primer 2	0,3 μ M
Wasser, nukleasefrei	4,5 μ l
Template, $\leq$ 500 ng	5 μ l

Tabelle 14 qRT-PCR-Phasen unter Angabe von Temperatur ($^{\circ}$ C), Dauer (Min./Sek.) und der Wiederholungszahl der Zyklen.

Initiale Denaturierung	95 $^{\circ}$ C	10 Min.	1
Denaturierung	95 $^{\circ}$ C	30 Sek.	} 40
Annealing	Primerabhängig, siehe Tabelle 8	30 Sek.	
Elongation	70 $^{\circ}$ C	30 Sek.	1
Schmelzkurve	60 – 95 $^{\circ}$ C	20 Min.	

Alle unter 2.1.1 beschriebenen Proben wurden mit dieser Technik quantitativ auf das Vorhandensein der ARGs *sul2*, *tetA*, *tetM* und *tetO* im Triplikat untersucht. Bei jedem Assay wurde ein Standard mit fünf Messpunkten im Triplikat parallel zu den Proben gemessen. Die Standardkurve hatte stets einen Korrelationskoeffizienten, der um nicht mehr als 0,005 von 1 abwich. Alle Werte außerhalb der resultierenden Standardkurve wurden bei der Zusammenstellung der Ergebnisse nicht beachtet. Außerdem wurden Ergebnisse aus Assays nur dann verwendet, wenn die Effizienz um weniger als 0,15 von 1 (entspricht 100 % Effizienz) abwich. Zur weiteren Qualitätssicherung wurde darauf geachtet, dass die drei *no template controls* (NTC) negativ waren und die Ableitung der Schmelzkurve lediglich einen spezifischen *peak* aufwies. Die einzige Ausnahme zu der zuletzt genannten Regel ist *tetA*. Die Ableitung der Schmelzkurve der NTCs von *tetA* weist zwei *peaks* vor dem *peak* auf, der für das Amplifikat spezifisch ist. Da diese unspezifischen *peaks* nur in den NTCs und in Proben auftraten, deren Konzentration außerhalb des gewählten Standards lagen, wurden die Daten zu *tetA* verwendet.

Größenauftrennung von DNA mittels DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 1 %igen Agarosegelen mit 1X TAE als Laufpuffer elektrophoretisch bei 80-130 V in Horizontalelektrophoresekammern nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1X TAE-Puffer gelöst und vor dem Gießen mit Ethidiumbromid versetzt. Zur Beschwerung der DNA-Fragmente wurden diese mit 1/6 Probenvolumen 6X Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot) vor dem Beladen gemischt. Als Längenmarker wurde entweder der GeneRuler 1 kB DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) oder der GeneRuler 1 kB DNA Ladder plus (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid konnten die Fragmente im UV-Licht über Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Standard DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. 5 ng/ml des aufgereinigten PCR-Produktes wurden mit 15 pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 15 µl mit bi-distilliertem Wasser in 1,5 ml *safe lock* Eppendorf-Reaktionsgefäßen angesetzt und verschickt. Mittels des Computerprogrammes *Clone Manager Professional 9 for Windows* konnten die DNA-Sequenzen analysiert und bearbeitet werden. Mithilfe der Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Washington, USA) konnten die Sequenzen über das Programm *BLASTn* mit bekannten Sequenzen verglichen werden (Altschul et al. 1997).

2.4 CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE METHODEN

Bestimmung der Trockensubstanz

Die Bestimmung der Trockensubstanz der Gülle erfolgte gravimetrisch nach der Deutschen Norm für die Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts auf Grundlage der Masse nach DIN ISO 11465:1993. Dazu wurden leere Porzellanschalen, die vor der Einwaage getrocknet wurden, ausgewogen, mit dem Probematerial befüllt und die gefüllten Schalen wieder ausgewogen. Die Menge des Probenmaterials sollte 10 g Feuchtgewicht betragen. Die gefüllten Porzellanschalen werden über Nacht bei 105°C im Trockenschrank getrocknet. Die Abkühlung der Proben erfolgte im Exsikkator. Nach dem Abkühlen wurden die Schalen erneut, bis zum Erreichen der Gewichtskonstanz, ausgewogen. Das Trockengewicht wird nach Formel 2-2 und die Trockensubstanz nach Formel 2-3 bestimmt.

Formel 2

$$TG \text{ [\%]} = 100 \cdot \frac{c - a}{b - a}$$

Formel 3

$$TS \text{ [g]} = (b - a) \cdot \frac{TG}{100}$$

TG: Trockengewicht der Gülle [%]

TS: Trockensubstanz der Gülle [g]

a: Gewicht der leeren Schale

b: Gewicht der feuchten Schale mit Gülle

c: Gewicht der Schale mit Gülle nach Trocknung im Trockenschrank

Bestimmung der organischen Trockensubstanz

Die Bestimmung des Glühverlustes bzw. der organischen Trockensubstanz erfolgte gravimetrisch nach Verglühen des organischen Kohlenstoffs bei 500°C nach DIN EN 12879:2001-02 mit Probematerial getrocknet nach ISO 11465:1993.

Bestimmung von Schwermetallen mit ICP-Massenspektrometrie

Neben der Untersuchung auf Antibiotika wurden Umweltproben auf Schwermetalle, insbesondere Kupfer und Zink untersucht. Hierzu wurden die Proben sowohl im wässrigen Eluat als auch getrocknet und anschließend nach DIN-EN-13346:2001-04 zur Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung von Spurenelementen und Phosphor-Extraktionsverfahren mit Königswasser aufgearbeitet.

Zur Bestimmung der Schwermetalle werden Proben zunächst mit Königswasser Mikrowellen-unterstützt aufgeschlossen. Danach erfolgt die Konzentrationsbestimmung der Schwermetalle mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS).

Die ICP-MS beruht auf einer Ionisierung der Probe im Plasma bei ca. 5000 °C. Das Plasma wird durch ein in Argon-Gas induzierten, hochfrequenten Strom erzeugt. Die im Plasma erzeugten Ionen werden durch ein elektrisches Feld in das Vakuum des Massenspektrometers geleitet und dort in Ionen unterschiedlicher Masse getrennt. Die charakteristische Masse wird zum qualitativen und quantitativen Nachweis genutzt.

Tabelle 15 ICP-MS Parameter und Grenzwerte

ICP-MS	Elan-DRCII (Perkin-Elmer)
Nebulizer	Meinhard Type A quartz Part No.: WE02-4372
Spray Chamber	Quartz Cyclonic Part No.: WE02-5222
RF Power	1100 Watt
Plasma Ar Flow	15 L/min
Nebulizer Ar Flow	0,93 L/min
Aux. Ar Flow	1,1 L/min
Injector	2,0 mm i.d. Quartz Part No.: WE02-3916
CeO ⁺ /Ce ⁺	< 3%
DRC-Gas B (NH ₄) Flow	0,6 ml/min
DRC-Gas B (NH ₄) RPQ	0,6
DRC-Gas B (O ₂) Flow	0,7 ml/min
DRC-Gas B (O ₂) RPQ	0,7

Element	Nachweisgrenze	
	Wässriges Eluat [µg/L]	Feststoff [µg/kg]
Arsen	<5	<600
Barium	<2	
Cadmium	<2	
Cobalt	<2	
Chrom	<2	<200
Kupfer		
Nickel	<2	
Blei	<2	
Selen	<8	<900
Zinn	<2	<200
Vanadium	<2	<30
Zink	<50	

Für den Aufschluss wird die Gülle-Probe auf ca. 0,1 g mit einer Genauigkeit von 0,001 g direkt in die PTFE Mikrowelleneinsätze eingewogen und es werden 5 mL 65 %ige Salpetersäure und 7 mL Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Als interner Standard wird Rhodium mit 1 µg/mL hinzugefügt. Danach wird die Probe noch einmal ausgewogen und mittels Mikrowellenunterstützung aufgeschlossen. Dazu wird die Probe in den Rotor der Mikrowelle gestellt und das Programm für den Aufschluss gestartet.

Das Aufschlussprogramm besteht aus einer 30-minütigen Aufschlussphase in der von Raumtemperatur auf 210 °C aufgeheizt wird. Danach wird die Temperatur für 15 Minuten gehalten und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

Nach Beendigung des Aufschlusses wird das Reaktionsgefäß wieder gewogen, um evt. Massenverluste auszuschließen. Die Elementaranalyse erfolgt mittels Plasmaemissions-Massenspektrometrie (ICP-MS). Das verwendete ICP-MS Gerät der Firma PerkinElmer wird mit den in Tabelle 15 aufgeführten Geräte-Parametern betrieben.

Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs

Die Bestimmung der Menge des gelösten organischen Kohlenstoffs erfolgt nach DIN EN 1484 (1997) als DOC-Wert im filtrierten wässrigen Eluat. Zur Filtration des zuvor sedimentierten Eluats wurden Acrodisc-Spritzenvorsatzfilter mit der Porenweite 0,45 µm (DIMATEC Analysetechnik, Essen) auf 10 ml Einmalspritzen verwendet. Als Messgerät diente der TOC-Analysator DIMATOC 100 (DIMATECK Analysetechnik, Essen) mit einem TOC-Standards 1000 mg/l (DIMATEC Analysetechnik, Essen). Zur Bestimmung des DOC werden je nach Methode die in Tabelle 16 dargestellten Parameter unterschieden.

Tabelle 16 Parameter der Methoden zur Ermittlung der DOC im wässrigen Eluat.

Methode	Messbereich [mg/L]	Injektionsvolumen [µl]	Ansäuerung	Ausgasen	Reaktor
21	5-1000	100	30 µl 20% HCl	10 min mit O ₂	Kugelskatalysator
22	0-14,5	400	30 µl 20% HCl	10 min mit O ₂	Platinwolle

Die Probe wird vor der Messung angesäuert und der organische Kohlenstoffanteil durch das entstehende CO₂ bestimmt. Aus 5-10-facher Messwertbestimmung werden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Bestimmung von Abwasserparametern

Abwasserparameter wurden photometrisch in einem wässrigen Eluat des Probenmaterials bestimmt. Das Eluat wird aus 10 g Probenmaterial in 1000 ml Milliporewasser erstellt und für 12 h geschüttelt (Überkopfschüttler). Danach erfolgt eine einstündige Zentrifugation sowie die Erstellung eines Filtrats mittels Acrodisc-Spritzenvorsatzfilter mit der Porenweite 0,45 µm (DIMATEC Analysetechnik, Essen) auf 10 ml Einmalspritzen.

Gelöstes ortho-Phosphat wird im Filtrat ohne Aufschluss, der Chemische Sauerstoffbedarf (CSB) und der Gesamtstickstoff nach Hitzeaufschluss im HTS 100 (Hach Lange, Düsseldorf) im Zentrifugat nach Herstellerangaben bestimmt. Die verwendeten Küvettentests sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17 Testkits zur Bestimmung der Abwasserparameter.

Parameter	Testkit
CSB	LCK 114 150-1000 ml/L O ₂
Gesamtstickstoff	LCK 338 20-100mg/L TN ₂
Phosphat	LCK 350(ortho/gesamt) 2,0-20,0 mg/L PO ₄ -P

III. ERGEBNISSE

Um die Risiken für Umwelt und Gesundheit erfassen zu können und darüber hinaus den Nutzen biotechnologischer Aufbereitungsverfahren zu evaluieren werden in den folgenden vier Kapiteln Ergebnisse der chemischen sowie Mikro- und molekularbiologischen Analyse Landwirtschaftlicher Abwässer und dem Gärrest aus Biogasanlagen dargestellt. Eine Zusammenfassung jeden Abschnitts ist durch Fettgedruck gekennzeichnet.

3.1 CHEMISCH-ANALYTISCHE CHARAKTERISIERUNG LANDWIRTSCHAFTLICHER ABWÄSSER IN DEUTSCHLAND

15 Biogasanlagen wurden deutschlandweit in einem *screening* 2012 stichprobenhaft untersucht und drei dieser Anlagen über den Jahresgang 2013 zu fünf Probenahmezeitpunkten weiter betrachtet um saisonale und Anlagen-spezifische Schwankungen zu ermitteln. Die betrachteten Biogasanlagen laufen mesophil, bei einer Temperatur von ca. 40 ° C, mit Ausnahme der thermophilen Anlagen BGA11 und BGA12. Ein Großteil der Anlagen wird mit Gülle und Mist konventioneller Rindermast und Milchviehhaltung sowie dem häufigsten NaWaRo Maissilage beladen. Ausnahmen stellen BGA9 mit Gülle eines ökologisch arbeitenden Milchviehbetriebs und BGA7 einer Lebensmittelabfall-verwertenden Anlage dar. Betriebsmethoden, die Substratzusammensetzung, NaWaRo und Prozessbedingungen der Biogasanlagen sind in Tabelle A1 im Anhang aufgeführt.

3.1.1 Chemische Charakterisierung von Substrat und Gärrest 15 deutscher Biogasanlagen

Zur Unterstützung der extensiven mikrobiologischen Untersuchung des Probenmaterial wurden einige chemische und physikalische Parameter erhoben. Der pH-Wert, Leitfähigkeit und die Summenparameter DOC (gelöster organischer Kohlenstoff), CSB (chemischer Sauerstoffbedarf), Gesamtstickstoff und Phosphat wurden im wässrigen Eluat mit einem Teil Probe in zehn Teilen Wasser bestimmt, während Trockensubstanz (TS) und die organische Trockensubstanz (oTS) direkt am Probenmaterial ermittelt wurden.

Der pH-Wert der Proben liegt zwischen 4,4 (BGA7) und 7,8 (BGA1) in Eingangs- und 7,7 (BGA3) bis 8,7 (BGA1) in Ausgangsproben des *screenings* 2012. Dabei tritt in allen Anlagen eine Verschiebung um durchschnittlich 1,3 in den alkalischen Bereich in Gärrestproben auf, die in BGA7 mit einer Differenz von 3,7 am ausgeprägtesten ist. Die Mehrfachbeprobung der Anlagen BGA1, BGA8 und BGA15 in 2013 zeigt einen weniger gleichförmigen Bezug zwischen Eingangs- und Ausgangsproben. Der pH-Wert wiederfährt im Durchschnitt nur in Proben der BGA15 eine Alkalisierung von 7,5 zu 8,2. Proben der BGA1 und BGA8 zeigen durchschnittlich einen sauren pH von 6,8 in Ausgangsproben jedoch pH 8,3 bzw. 8,2 in zugehörigen Eingangsproben (Tabelle 18).

Die elektrische Leitfähigkeit der wässrigen Eluate liegt im Durchschnitt bei 0,31 mS/ cm in Eingangs- und 0,36 mS/ cm in Ausgangsproben des *screenings*. Nur die Substratprobe der BGA12 zeigt einen ungewöhnlich hohen Wert von 11,73 mS/ cm. Auch Werte des Jahresgangs zeigen ein homogenes Bild sowohl der Anlagen als auch der Substrat- du Gärrestproben zwischen 0,21 mS/ cm in BGA8 bis 1,67 mS/ cm in BGA1 (Tabelle 18).

Die Trockensubstanz der Proben liegt durchschnittlich bei 10,5 % TS in Eingangsproben. Nur BGA12E mit 54,3 % TS und BGA15E mit 4,5 % TS weichen deutlich von den anderen Proben im *screening* ab. In Ausgangsproben liegt die Trockensubstanz bei durchschnittlich 8 % TS mit einer Reduktion von Eingangsproben um 2,5 %. BGA12 und BGA15 zeigen wiederum ein anderes Bild. Während die Substratprobe eine deutlich erhöhte Trockensubstanz erbringt ist die Gärrestprobe mit 47,3 % TS Differenz nicht von denen anderer Anlagen zu unterscheiden. Einzig BGA15 zeigt einen höheren TS-Gehalt in der Ausgangsprobe des *screenings* 2012. Dies wiederholt sich in den

korrelierten Eingangs- und Ausgangsproben des Jahresgangs mit einer durchschnittlichen Erhöhung der Trockensubstanz in Gärrestproben der BGA15 um durchschnittlich 0,2 % TS. Die anderen Anlagen zeigen eine Reduktion von 3,9 % in BGA1 und 2,03 % in Ausgangsproben der BGA8. Jedoch zeigen beide Anlagen einen leichten Anstieg von 0,1 % bzw. 0,6 % in Gärresten der Probenahme 13.5 (Tabelle 18).

Tabelle 18 Chemisch-physikalische Daten der Substrat- bzw. Gärrestproben im *screening* 2012 und Jahresgang 2013.

		pH wässriges Eluat		Leitfähigkeit wässriges Eluat [mS/cm]		TS [%]		oTS [% FM]	
		E	A	E	A	E	A	E	A
2012	BGA								
	1	7,8	8,9	0,42	0,48	11,6	9,8	22,0	35,9
	2	7,0	8,6	0,51	0,47	15,2	9,6	19,9	29,8
	3	7,2	7,7	0,15	0,12	11,0	8,3	n.b.	n.b.
	4	7,6	7,8	0,15	0,14	10,7	9,2	n.b.	n.b.
	5	6,8	8,4	0,35	0,47	12,9	6,5	18,2	28,1
	6	7,5	8,5	0,31	0,39	8,5	7,7	23,7	29,1
	7	4,4	8,1	0,10	0,10	10,7	9,2	n.b.	n.b.
	8	7,0	8,5	0,29	0,34	10,2	6,8	17,9	25,3
	9	7,0	8,7	0,26	0,30	9,6	6,5	27,0	33,6
	10	7,3	8,7	0,33	0,49	9,6	8,3	20,4	25,7
	11	7,3	8,3	0,32	0,35	8,0	6,9	26,1	28,9
	12	7,2	8,5	11,73	0,44	54,3	7,0	26,4	24,4
	13	7,3	8,5	0,25	0,41	9,9	7,4	21,1	22,0
	14	7,8	8,5	0,41	0,43	8,8	8,0	15,7	27,1
	15	7,5	8,6	0,47	0,54	4,5	8,8	22,4	28,9
2013	BGA								
13.1	1	7,0		0,27		9,3		74,3	
	8	7,3		0,35		11,5		81,4	
	15	7,2		0,36		8,4		80,5	
13.2	1	6,9	7,7	0,37	0,45	14,7	8,9	78,3	71,0
	8	7,0	8,3	0,21	0,35	6,6	6,8	79,1	71,8
	15	7,1	7,8	0,47	0,58	9,3	8,7	80,6	734,0
13.3	1	7,4	7,7	1,11	0,30	13,2	7,7	78,1	69,8
	8	9,0	5,6	0,29	0,26	8,0	5,6	77,8	72,8
	15	7,5	9,0	0,44	0,44	7,5	9,0	76,3	72,6
13.4	1	12,1	4,7	0,29	0,48	12,1	4,7	67,9	64,2
	8	9,5	6,1	0,48	0,28	9,5	6,1	75,3	73,2
	15	8,1	8,1	0,34	0,42	8,1	8,1	74,3	71,7
13.5	1		7,1		0,44		12,2		34,0
	8		7,5		0,33		10,1		61,0
	15		7,9		0,56		8,3		73,4

n.b. nicht bestimmbar

Die organische Trockensubstanz liegt in einem Bereich zwischen 15,7 % oTS in Eingangs- und 35,9 % oTS in Ausgangsproben des *screenings*. Mit Ausnahme von BGA12, in deren Gärrest der oTS um 2 % niedriger liegt zeigen alle anderen Anlagen eine um durchschnittlich 7,3 % erhöhte organische Trockensubstanz in Ausgangsproben. Ein völlig anderes Ergebnis zeigt der Jahresgang. Hier ist in jedem Proben-Korrelat die organische Trockensubstanz in Ausgangsproben um durchschnittlich 14,9 % (BGA1), 8,7 % (BGA8) und 5,0 % (BGA15) reduziert (Tabelle 18).

Der gelöste organische Kohlenstoff wurde im wässrigen Eluat der Proben des *screenings* und Jahresgangs bestimmt und ist in Abbildung 6 und Tabelle A2 im Anhang dargestellt. Die Werte liegen zwischen 16,3 mg/ kg TS und 113,2 mg/ kg TS in Eingangs- und 18,8 mg/ kg TS und 100,8 mg/ kg TS in Ausgangsproben. Das *screening* zeigt eine durchschnittlich niedrigere Konzentration in Ausgangsproben mit Ausnahme der BGA9 und BGA13 deren Werte im Gärrest erhöht sind. Besonders große Divergenzen zeigen Proben der BGA2, BGA5, BGA12 und BGA15 mit

Abweichungen zwischen 44 mg/ kg TS und 83 mg/ kg TS. In den Proben-Korrelaten des Jahresgangs schwanken die Werte jeder Anlage stark und sowohl erhöhte als auch deutlich reduzierte Werte treten in Ausgangsproben auf. Die niedrigsten Werte mit 20,9 mg/ kg TS in Eingangs- und 30,7 mg/ kg TS in Ausgangsproben sowie die deutlichste Zunahme von durchschnittlich 10 mg/ kg TS ist in Proben der BGA8 zu sehen. Auch BGA1 zeigt erhöhte Ausgangswerte von durchschnittlich 8 mg/ kg TS während BGA15 eine Reduktion von 13 mg/ kg TS in Gärresten aufweist.

Der chemische Sauerstoffbedarf liegt durchschnittlich bei 797,40 mg/ kg TS in Eingangs- und 810,54 mg/ kg TS in Ausgangsproben. Besonders hohe Werte zeigen BGA1 und BGA15 in Substrat- sowie BGA5, BGA11 und BGA12 in Gärrestproben. Mit Ausnahme der BGA1, BGA9 und BGA15 zeigen Anlagen erhöhen CSB in Ausgangsproben um durchschnittlich 140 mg/ kg TS. Im Jahresgang zeigen alle Anlagen durchschnittliche Werte in einem enggefassten Bereich zwischen 615 mg/ kg TS und 802 mg/ kg TS. Vereinzelte Höhenereignisse mit CSB über 1.200 mg/ kg TS treten jedoch sowohl für BGA1 als auch BGA8 auf. Die durchschnittliche Reduktion der Werte in Ausgangsproben ist wiederum nur in BGA15 zu erkennen, während BGA1 und BGA8 eine Zunahme von 177 mg/ kg TS und 103 mg/ kg TS aufweisen (Abbildung 6, Tabelle A2).

Werte des Gesamtstickstoffs (N_{ges}) liegen zwischen 19,7 mg/ kg TS (BGA7) und 102,1 mg/ kg TS (BGA15) in Eingangs- und 38-39 mg/ kg TS (BGA9 bzw. BGA12) und 175,9 mg/ kg TS (BGA7) in Ausgangsproben des *screenings*. Erhöhte Werte im Ausgang von durchschnittlich 30,4 mg/ kg TS können in allen Anlagen mit Ausnahme von BGA1 und BGA15 ermittelt werden. Auch der Jahresgang zeigt deutlich erhöhte N_{ges} -Konzentrationen in Gärrestproben von durchschnittlich 37,6 mg/ kg TS für BGA1, 16,2 mg/ kg TS für BGA8 und 20,9 mg/ kg TS für BGA15 (Abbildung 6, Tabelle A2).

Die Bestimmung von Phosphat zeigt Werte im Bereich von durchschnittlich 20 mg/ kg TS in Eingangs- und 21 mg/ kg TS in Ausgangsproben des *screenings*. Maximale Konzentrationen finden sich in Substratproben nur für BGA15 mit 67 mg/ kg TS während in Ausgangsproben die Maxima deutlich näher bei einander liegen für BGA2, BGA6, BGA10 und BGA15 zwischen 29 mg/ kg TS und 35 mg/ kg TS. Mit Ausnahme der Anlagen BGA1, BGA2, BGA4, BGA13 und BGA15 die reduzierte Werte in Ausgangsproben zeigen sind erhöhte Konzentrationen in 10 Gärrestproben zu finden. Phosphat-Werte im Jahresgang liegen bei durchschnittlich 21 mg/ kg TS (BGA1), 13 mg/ kg TS (BGA8) und 32 mg/ kg TS (BGA15) in Eingangsproben und 20 mg/ kg TS (BGA1), 21 mg/ kg TS (BGA8) und 35 mg/ kg TS (BGA15) in Ausgangsproben. Eine Zunahme der Werte lässt sich sowohl für BGA8, als auch BGA15, jedoch nicht für BGA1 erkennen (Abbildung 6, Tabelle A2).

Die chemisch-physikalische Charakterisierung verdeutlicht Veränderungen in der Probenmatrix durch den Prozessdurchlauf der Biogasanlagen. Gesenkte Werte des chemischen Sauerstoffbedarfs, löslichen organischen Kohlenstoffs sowie den Trockensubstanzen die Umsetzung organischer Verbindungen in Biogas signalisieren werden Nährstoffe wie Phosphat und Stickstoff im Gärresten angereichert.

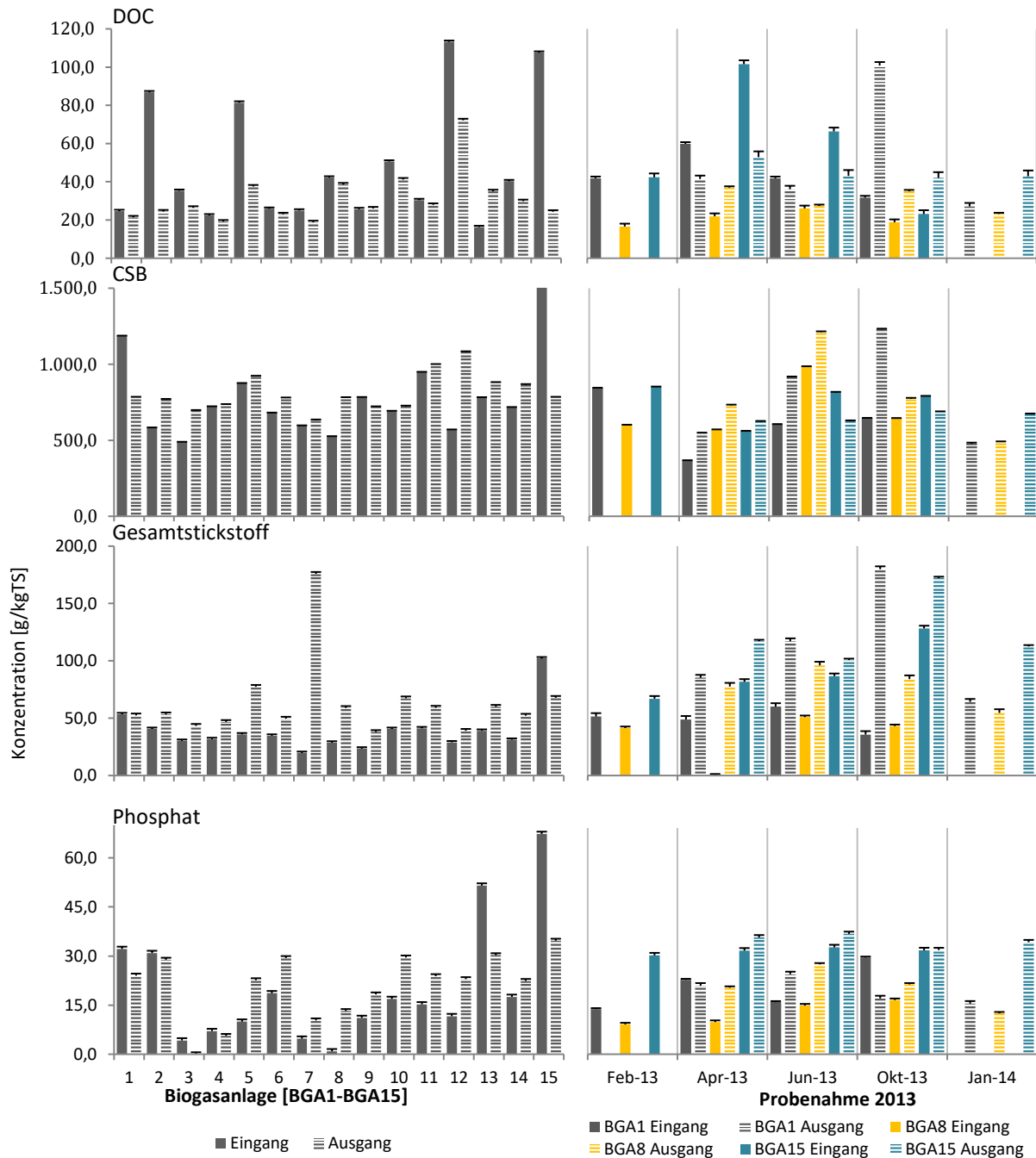


Abbildung 6 Chemische Charakterisierung der Substrat- bzw. Gärrestproben im screening 2012 und Jahresgang 2013. Eingangs- und Ausgangsproben wurden stichprobenhaft zum selben Zeitpunkt genommen und stehen somit in keinem direkten Zusammenhang; abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikater Bestimmung der Parameter aus jeweils drei parallelen Proben. CSB und Gesamt-Stickstoff wurden im wässrigen Eluat, Phosphat im Filtrat bestimmt. Ergänzende Daten können dem Anhang entnommen werden.

3.1.2 Wässrige Verfügbarkeit und Persistenz von Metallen in landwirtschaftlichen Abwässern

Metallverbindungen werden in der Viehwirtschaft intensiv in Futtermittelzusätzen und Klauenbädern verwendet. Insbesondere Kupfer und Zink werden weit über ihrer physiologischen Notwendigkeit gefüttert und wirken antibiotisch und als Leistungsförderer (Hartung et al. 2001).

Kupfer und Zink wurden sowohl direkt im Probenmaterial als auch im wässrigen Eluat der Proben bestimmt (Tabelle A3, Abbildung 7). Sowohl Kupfer- als auch Zinkwerte liegen in Eingangsproben

des *screenings* in den Anlagen BGA9 und BGA7 am niedrigsten mit 16,3 mg/ kg TS bzw. 40,2 mg/ kg TS Kupfer und 109 mg/ kg TS bzw. 48,6 mg/ kg TS Zink. Maximale Werte im Bereich 166,6 g/ kg TS Kupfer und 1.168,6 g/ kg TS Zink treten ausschließlich in der Eingangsprobe von BGA6 auf. In Ausgangsproben zeigt sich ein anderes Bild. Die Werte liegen zwischen 19,9 mg/ kg TS Kupfer bzw. 117,93 mg/ kg TS Zink in BGA9 und 102,7 mg/ kg TS Kupfer bzw. 592,62 mg/ kg TS Zink in BGA2. In acht (Kupfer) bzw. sieben (Zink) Anlagen liegen Ausgangswerte über denen von Eingangsproben mit einer Zunahme von durchschnittlich 17 mg/ kg TS Kupfer und 131 mg/ kg TS Zink. Besonders ausgeprägt ist diese Differenz in den BGA7, BGA5 und BGA2 sowohl für Kupfer als auch Zink. Geringere Werte in Ausgangsproben um durchschnittlich 24 mg/ kg TS Kupfer und 173 mg/ kg TS Zink können in sieben (Kupfer) bzw. acht (Zink) der Anlagen betrachtet werden. Maximale Ausprägung findet diese Differenz in Proben der BGA6, die im Eingang auffallend hohe Konzentrationen, im Ausgang jedoch Werte im mittleren Bereich zeigt. Eine Einzelprobe frischer Maissilage der BGA15, die als Kosubstrat im Hauptteil der untersuchten Anlagen zum Einsatz kommt, zeigte sehr niedrige Werte mit 5 mg/ kg TS Kupfer und 29 mg/ kg TS Zink.

Die wässrige Verfügbarkeit von Kupfer und Zink variiert stark. Im wässrigen Eluat wird Kupfer mit durchschnittlich 10 % des Kupfergehalts in Eingangs- und 15 % in Ausgangsproben detektiert während die Anlagen BGA2, BGA5, BGA7 und BGA9 kein wässrig verfügbares Kupfer in beiden Probenotypen aufweisen. Die höchsten Werte in sowohl Substrat als auch Gärrest zeigt BGA12 mit 33 % bzw. 30 % und BGA13 in der Ausgangsprobe mit 37 %. Zink hingegen kann nur in zwei der 30 Proben des *screenings* im wässrigen Eluat nachgewiesen werden, in den Proben BGA12E und BGA7A mit jeweils 13 % (Tabelle A3).

Im Jahresgang wurden BGA1, BGA8 und BGA15 zu fünf Zeitpunkten in einem ca. 60 tägigen Intervall beprobt. Kupferwerte liegen in Eingangsproben der Anlagen zwischen 40 mg/ kg TS in BGA8 80 mg/ kg TS in BGA1 und 82 mg/ kg TS in BGA15. Alle Anlagen zeigen niedrigere Werte in Ausgangsproben um durchschnittlich 3 g/ kg TS- 5 mg/ kg TS. Die wässrige Verfügbarkeit hingegen ist in Proben der BGA1 und BGA8 im Gärrest erhöht während BGA15 eine leichte Erniedrigung der Werte zeigt. Wie bereits für Kupfer beschrieben treten durchschnittlich höhere Zinkwerte in Eingangs- und Ausgangsproben der BGA15 auf mit 576,6 mg/ kg TS bzw. 387,3 mg/ kg TS während BGA8 die niedrigsten Werte mit durchschnittlich 223,7 mg/ kg TS bzw. 184,2 mg/ kg TS Zink zeigt. Eine Reduktion der Zinkgehalte in Ausgangsproben werden für alle Anlagen mit durchschnittlich 25 mg/ kg TS in BGA8, 71 mg/ kg TS in BGA1 und 163 mg/ kg TS in BGA15 erfasst. Keine Probe zeigt eine wässrige Verfügbarkeit von Zink Tabelle A3 (Abbildung 7). Der Gehalt weiterer Metalle im Feststoff sowie dem wässrigen Eluat der Proben des *screenings* 2012 ist in Tabelle 19 dargestellt. Arsen, Selen und Zinn werden nur im Feststoff von zwei bis drei Eingangsproben und bis zu sechs Ausgangsproben detektiert. Die Konzentrationen bewegen sich zwischen 0,02 mg/ kg TS - 1,42 mg/ kg TS Arsen, 0,8 mg/ kg TS – 1,48 mg/ kg TS Selen und 0,41 mg/ kg TS – 10,3 mg/ kg TS Zinn.

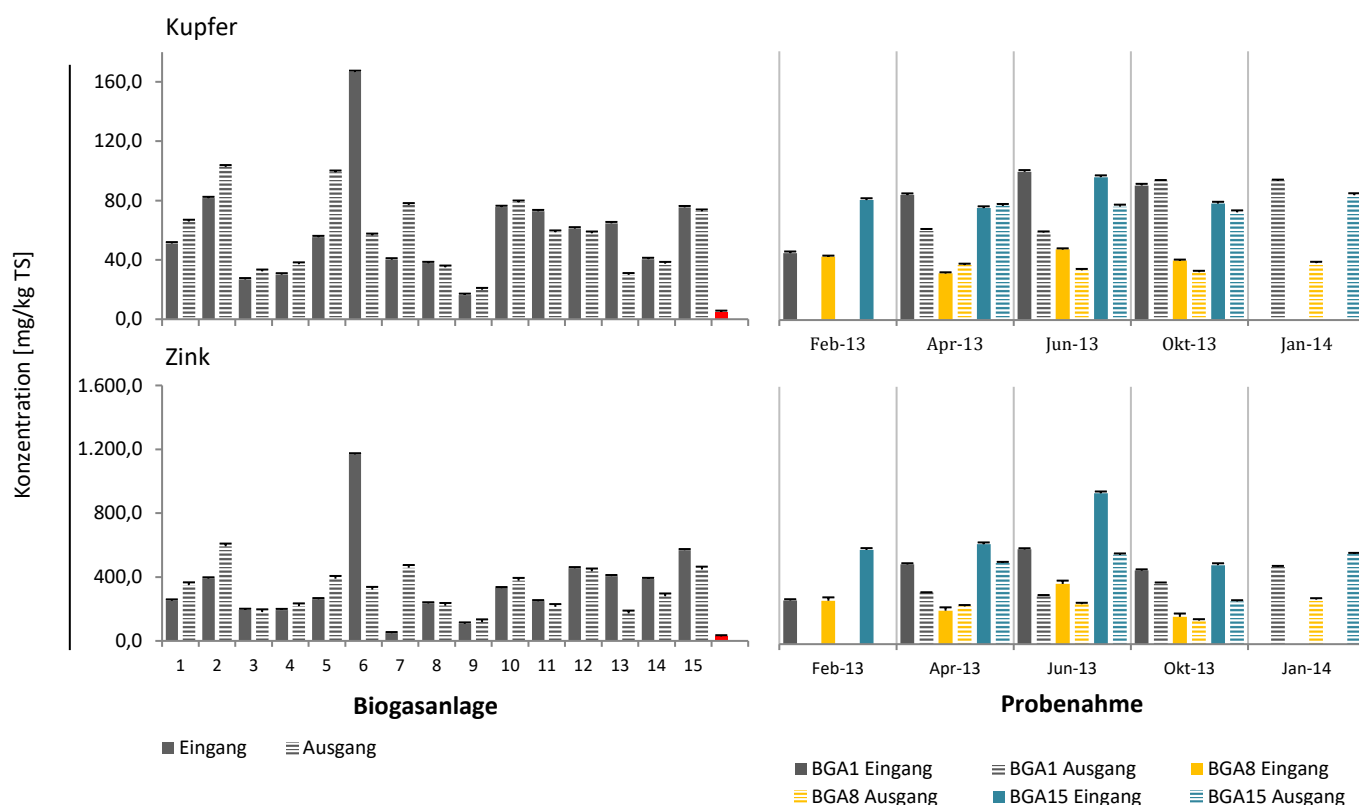


Abbildung 7 Kupfer, Zink im Feststoff der Substrat- bzw. Gärrestproben sowie einer Stichprobe Maissilage (BGA15) im *screening* 2012 und Jahresgang 2013. Zu fünf Zeitpunkten wurden Eingangs- und Ausgangsproben genommen, mit Berücksichtigung einer mittleren Verweilzeit von zwei Monaten in der Anlage; abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen triplikativer Extraktionen.

Auch Chrom und Vanadium werden nicht in allen Anlagen im Feststoff detektiert und zeigen keine wässrige Verfügbarkeit. Beide Elemente können jedoch in der exemplarischen NaWaRo-Probe nachgewiesen werden. Chrom liegt in einem Konzentrationsbereich von 0,52 mg/ kg TS in BGA6A und 29,23 mg/ kg TS und 23,19 mg/ kg TS BGA9E bzw. A. Vanadium kann im zwischen 0,38 mg/ kg TS in BGA6A und 10,33 mg/ kg TS in BGA4A. Barium, Cadmium, Cobalt, Nickel und Blei können in jeder Feststoffprobe des *screenings* nachgewiesen werden. Jedoch nur Barium und Nickel zeigen wässrige Verfügbarkeit in zwölf bzw. zwei Anlagen. Sowohl die höchsten Konzentrationen im Feststoff der Proben wie auch dem Eluat zeigt Barium in einem Bereich von 3,09 mg/ kg TS (BGA6A) bis 128,30 mg/ kg TS (BGA3A) bzw. 1,01 mg/ kg TS (BGA9A) und 35,46 mg/ kg TS (BGA10A). Nickel wird mit Werten von 0,60 mg/ kg TS (BGA6A) und 20,50 mg/ kg TS (BGA7A) in allen Feststoffproben nachgewiesen, kann jedoch nur im wässrigen Eluat der Proben BGA4A und BGA15A detektiert werden. Cadmium, Cobalt und Blei werden im Feststoff aller Anlagen in Konzentrationsbereichen zwischen 0,01 mg/ kg TS und 3,19 mg/ kg TS, 0,08 mg/ kg TS und 29,23 mg/ kg TS sowie 0,15 mg/ kg TS und 5,89 mg/ kg TS, jedoch nicht im wässrigen Eluat detektiert. Auch im Feststoff der exemplarischen Maissilage kann Barium, Cadmium, Chrom, Blei und Vanadium in Konzentrationen die dem unteren Bereich der Substrat- und Gärrestproben gleichen (Tabelle 19).

Metalle werden in Feststoffproben jeder Anlage mit einer deutlichen Häufigkeit von Kupfer und Zink bestimmt. Während Kupfer zu 30 % und Barium zu 25% im überwiegenden Teil der Proben im wässrigen Eluat nachweisbar sind zeigen außerdem nur noch Zink und Nickel vereinzelt wässrige Verfügbarkeit.

Tabelle 19 Metallgehalte im Feststoff und wässrigen Eluat der Substrat- bzw. Gärrestproben im Screening 2012 und einer NaWaRo-Probe (Maissilage, BGA15). [mg/Kg TS].

Farbkodierung: gelb < 1 mg/kgTS, senfgelb < 10mg/kg TS, orange < 50 mg/kgTS, rot >50 mg/kgTS, n.b. (nicht bestimmbar, Nachweisgrenzen siehe 2.4 ICPMS).

Farbkodierung: gelb < 1 mg/kg; rot, hellgelb < 10 mg/kg; orange < 50 mg/kg; rot > 50 mg/kg; n.b.: (nicht bestimmbar; Nachweisgrenzen siehe Z. 1 für Pb).																					
Feststoff	As <i>Arsen</i>		Ba <i>Barium</i>		Cd <i>Cadmium</i>		Co <i>Cobalt</i>		Cr <i>Chrom</i>		Ni <i>Nickel</i>		Pb <i>Blei</i>		Se <i>Selen</i>		Sn <i>Zinn</i>		V <i>Vanadium</i>		
	BGA	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
1		0,91	0,87	91,01	77,09	0,46	0,49	2,09	2,41	10,39	8,94	10,38	10,42	3,36	3,30	n.b.	n.b.	0,50	0,56	8,72	7,80
2		0,52	0,38	57,21	8,49	0,38	0,24	2,12	1,40	5,74	2,96	8,67	3,69	1,74	1,02	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	5,43	3,24
3		n.b.	1,36	65,63	128,3	0,45	0,34	1,31	1,71	n.b.	10,20	5,84	8,85	2,02	3,83	n.b.	1,48	n.b.	n.b.	3,73	8,76
4		n.b.	n.b.	60,20	85,40	0,71	0,83	1,44	0,10	n.b.	n.b.	4,97	8,50	2,55	4,44	n.b.	1,79	n.b.	n.b.	6,14	10,33
5		0,42	0,60	57,72	76,63	0,43	0,73	1,44	1,95	4,85	5,68	6,99	8,85	1,43	2,47	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	4,09	6,16
6		n.b.	0,02	95,64	3,09	0,91	0,01	2,33	0,08	7,51	0,52	10,14	0,60	2,91	0,15	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	8,05	0,38
7		n.b.	1,42	27,17	36,17	0,36	0,68	0,33	3,13	n.b.	16,83	2,31	20,50	1,38	5,89	n.b.	2,38	0,99	10,03	n.b.	8,29
8		n.b.	n.b.	34,32	42,30	1,33	3,19	1,11	1,19	4,51	7,08	5,64	5,55	1,81	3,15	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,92
9		n.b.	n.b.	45,77	53,93	1,45	0,87	0,90	1,14	29,23	23,19	7,70	13,33	3,30	3,70	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	6,45	n.b.
10		n.b.	n.b.	21,09	18,79	1,18	0,52	1,59	1,28	5,72	6,14	6,49	4,79	1,82	1,43	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
11		n.b.	n.b.	47,14	31,14	0,88	1,20	1,53	2,45	6,72	7,26	8,14	7,74	2,98	2,05	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	6,14	3,71
12		n.b.	n.b.	17,77	17,18	0,51	1,19	1,27	1,36	3,82	4,82	8,70	10,33	1,53	2,13	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,34	3,27
13		n.b.	n.b.	45,72	45,73	0,44	0,56	2,15	1,03	2,94	2,40	9,15	4,80	0,69	0,91	1,59	n.b.	n.b.	n.b.	2,68	1,91
14		n.b.	n.b.	23,69	46,09	0,57	0,69	1,62	2,13	2,15	5,25	3,80	5,99	0,79	1,56	0,83	1,00	n.b.	0,41	n.b.	2,61
15		n.b.	n.b.	32,88	47,99	0,59	0,54	1,69	2,87	7,27	8,61	7,27	10,01	1,35	2,55	1,09	1,03	n.b.	n.b.	5,87	6,72
NaWaRo		n.b.		2,70		0,16		n.b.		0,34		n.b.		1,59		n.b.		n.b.		0,34	
Wässriges Eluat																					
1		n.b.	n.b.	5,04	16,91	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
2		n.b.	n.b.	4,85	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
3		n.b.	n.b.	19,06	15,94	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
4		n.b.	n.b.	1,59	8,42	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,59	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
5		n.b.	n.b.	8,03	18,07	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
6		n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
7		n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
8		n.b.	n.b.	14,07	10,06	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
9		n.b.	n.b.	14,55	1,01	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
10		n.b.	n.b.	4,55	35,46	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
11		n.b.	n.b.	33,44	27,91	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
12		n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,96	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
13		n.b.	n.b.	8,58	9,16	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
14		n.b.	n.b.	3,72	9,52	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
15		n.b.	n.b.	11,06	4,59	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	4,52	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

3.2 ERFASSUNG DES MIKROBIELLEN SPEKTRUMS IN SUBSTRAT UND GÄRREST DEUTSCHER BIO-GASANLAGEN ÜBER KULTIVIERUNGSABHÄNGIGE POPULATIONSUNTERSUCHUNGEN

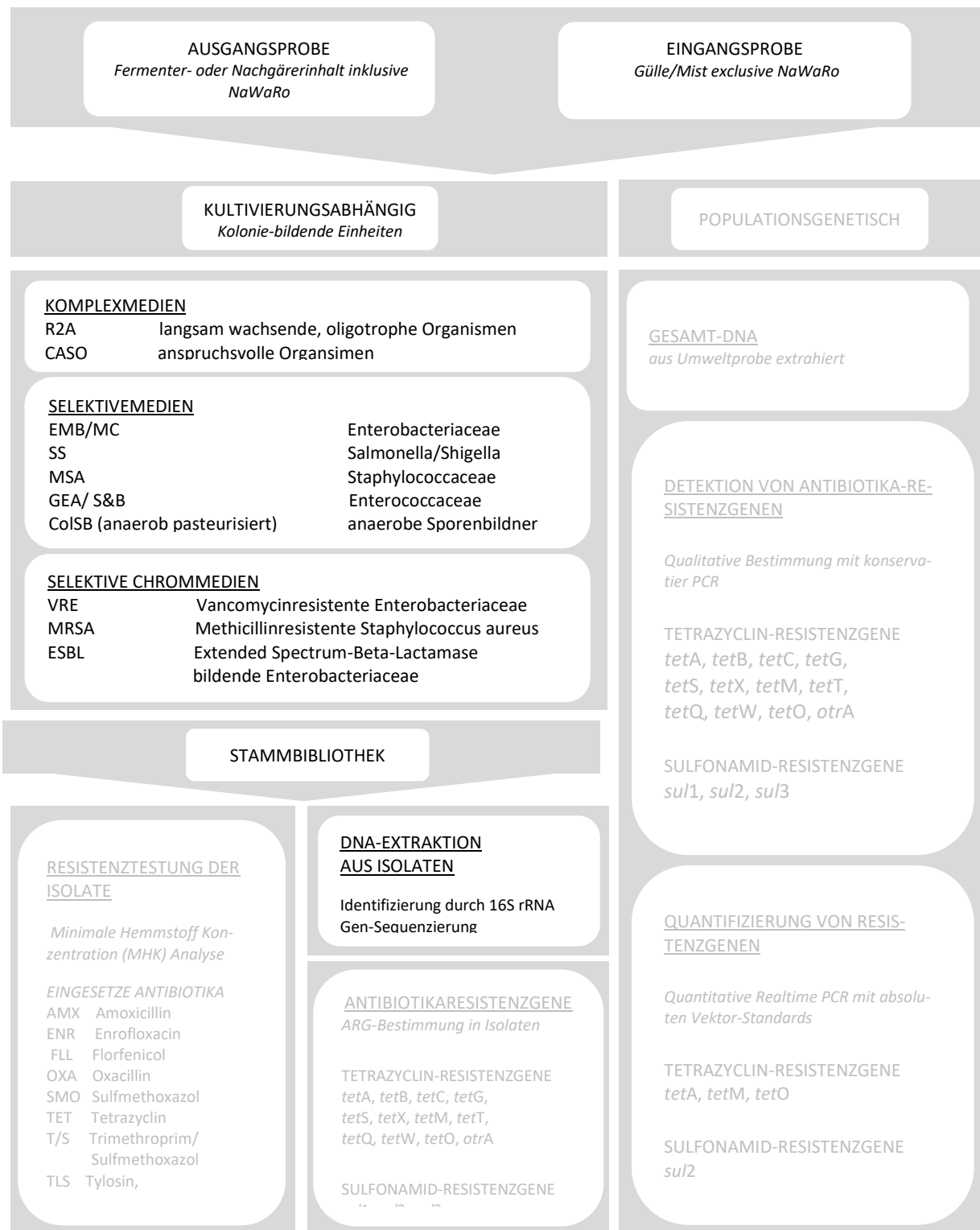


Abbildung 8 Übersicht des methodischen Ablaufs und der verwendeten Testverfahren zur mikrobiologischen Charakterisierung landwirtschaftlicher Abwasserproben.

Um die Zusammensetzung der kultivierbaren mikrobiologischen Gemeinschaft in landwirtschaftlichen Abwässern darzustellen wurden 15 Biogasanlagen deutschlandweit stichprobenhaft unter-

sucht und eine dieser Anlagen über einen Jahresgang weiter betrachtet um saisonale und Anlagen-spezifische Schwankungen zu ermitteln. Die betrachteten Biogasanlagen werden mesophil, bei einer Temperatur von ca. 40 ° C betrieben, mit Ausnahme der thermophilen Anlagen BGA11 und BGA12. Ein Großteil der Anlagen wird mit Gülle und Mist konventioneller Rindermast und Milchviehhaltung sowie dem häufigsten NaWaRo Maissilage beladen. Ausnahmen stellen BGA9 mit Gülle eines ökologisch arbeitenden Milchviehbetriebs und BGA7 einer Lebensmittelabfall-verwertenden Anlage dar. Betriebsmethoden, die Substratzusammensetzung, NaWaRo und Prozessbedingungen der Biogasanlagen sind in Tabelle A1 im Anhang aufgeführt.

Wie Abbildung 8 zu entnehmen, wurden zur Bestimmung des allgemeinen bakteriellen Wachstums und der Prävalenz medizinisch relevanter Schlüsselorganismen zunächst Kolonie-bildende Einheiten (KBE) auf diversen Komplex- und Selektivmedien bestimmt (Abbildung 8). Eine stichprobenhaft erstellte Isolatbibliothek ermöglichte darüber hinaus eine genauere Charakterisierung des Populationsspektrums sowie eine Bewertung der genutzten Wachstumsmedien für das vorliegende Probengepräge. Die Gegenüberstellung von Substrat und Gärrest soll als Grundlage dienen das Rückhaltungs- bzw. Eliminationspotential des Fermentationsprozesses auf unerwünschte Bakterien zu ermitteln.

3.2.1 Zusammensetzung der bakteriellen Population in Substrat und Gärrest von Biogasanlagen.

Eine kulturabhängige Analyse von Veränderungen in der Bakterienpopulation der Eingangs- und Ausgangsproben von 15 Biogasanlagen für verschiedene funktionelle und phylogenetische Gruppen aufgrund von Unterschieden in der landwirtschaftlichen Betriebsführung und Tierhaltungssystemen konnte in 2012 durch ein stichprobenhaftes *screening* erfolgen (Abbildung 9). Drei dieser Anlagen wurden über den Jahresgang 2013 mit fünf separaten Probenahmen weiter untersucht (Abbildung 10).

Quantitative Erfassung physiologischer und funktioneller bakterieller Gruppen

Kolonie-bildenden Einheiten wurden auf verschiedenen Nährmedien bestimmt um die Gesamtheit kultivierbarer Bakterien in landwirtschaftlichen Abwässern abzubilden und darüber hinaus den Verbleib gesundheitsrelevanter Schlüsselorganismen zu beobachten. Die Konzentration mesophiler anspruchsvoller Bakterien (kultiviert auf CASO-Agar, 25 ° C) lag im Screening in einem Bereich von 10^6 (BGA14) bis 10^{10} KBE/g TS (BGA6) in Eingangs- und in dem Bereich von 10^6 (BGA7) bis 10^9 (BGA14) KBE/g TS in Ausgangsproben (Abbildung 11, Abbildung 12). Eine generelle Abnahme kultivierbarer mesophiler Bakterien um ein bis zwei Größenordnungen nach Passage der BGA wird deutlich mit Ausnahme von BGA14 in der ein Anstieg von drei Größenordnungen zur Gärrestprobe auftritt. Im Jahresgangs 2013 liegt die KBE für BGA8 bei 10^8 bis 10^9 KBE/g TS in Eingangs- und 10^8 bis 10^{10} im Ausgangsproben mit sowohl Anstieg als auch Abnahme der KBE zur Ausgangsprobe im Bereich unter einer Größenordnung (Abbildung 12). Mesophile oligotrophe Bakterien (kultiviert auf R2A-Agar, 25 ° C) bewegen sich im Bereich von 10^7 bis 10^{10} KBE/g TS in Ein- und 10^6 bis 10^9 KBE/g TS in Ausgangsproben in 2012 und 10^7 bis 10^9 KBE/g TS in 2013, was einer durchschnittlichen Erniedrigung von 1,5 Größenordnungen gleichkommt (Abbildung 11, Abbildung 12). Die Kolonie-bildenden Einheiten anaerober Sporenbildner (kultiviert anaerob, nach Pasteurisierung auf ColSb, 37°C) liegen im Bereich 10^5 bis 10^7 in Eingangsproben und 10^4 bis 10^{10} in Ausgangsproben im Screening 2012.

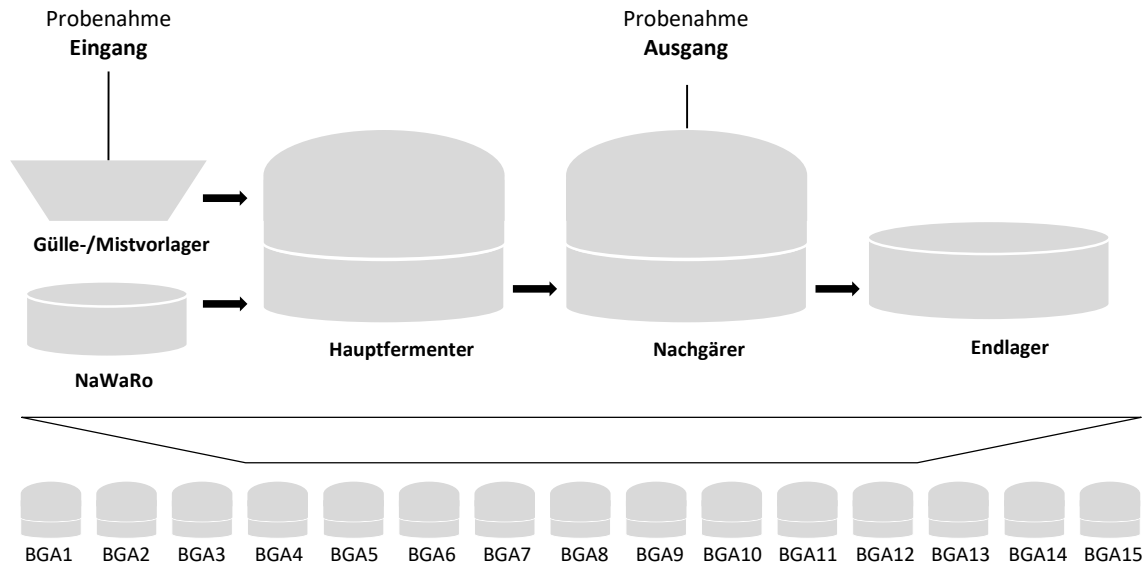


Abbildung 9 Schematischer Ablauf der Probenahme im screening 2012. 15 deutsche Biogasanlagen wurden stichprobenartig im Jahr 2012 mit Eingangsproben E (Gülle / Mist) und Ausgangsproben A (Gärrest, nachwachsende Rohstoffe vergoren einschließlich) beprobt (siehe Abbildung A1, Anhang).

In elf Anlagen war eine erhöhte KBE in Ausgangsproben zu erkennen mit einem durchschnittlichen Anstieg von einer Größenordnung (Abbildung 12). Vier Anlagen zeigten eine geringere Konzentration in Ausgangsproben die ebenfalls einer durchschnittlichen Reduktion von einer Größenordnung gleichkommt (Abbildung 11). Die Ergebnisse der mehrfach-Beprobung von BGA8 in 2013 zeigen eine Organismendichte von 10^4 bis 10^5 KBE/g TS in Eingangs- und Ausgangsproben mit einer Einzelspitze bei 10^7 KBE/g TS im Eingang 13.2 (Abbildung 12). Die unabhängige Probe frischer Maissilage aus BGA15 (NaWaRo) zeigt eine Dichte anaerober Sporenbildner von 10^7 KBE/kgTS (Abbildung 12).

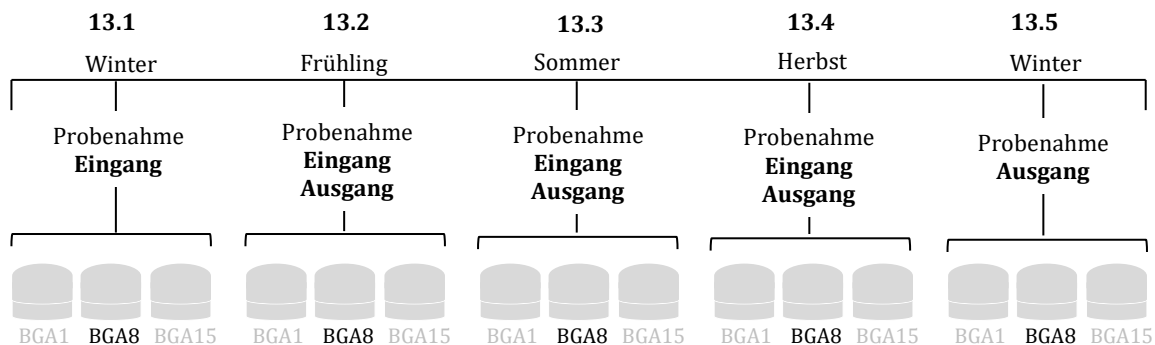


Abbildung 10 Schematischer Ablauf der Probenahme im Jahresgang 2013. Im Jahr 2013 wurden die Biogasanlagen 1, 8 und 15 zu fünf Zeitpunkten unter Berücksichtigung einer mittlern Verweilzeit von ca. 60 Tagen beprobt,

Selektivmedien für *Salmonella* und *Shigella* (Salmonella-Shigella) zeigen Konzentrationen kultivierbarer Bakterien in einem Bereich von 10^2 bis 10^7 KBE/g TS in Eingangs- und 10^3 bis 10^5 KBE/g TS in Ausgangsproben (Abbildung 11). In 14 Anlagen besteht eine reduzierte Organismendichte in Ausgangsproben um durchschnittlich 2,3 Größenordnungen. Nur BGA7 zeigt eine erhöhte Dichte um drei Größenordnungen im Ausgang.

Zur selektiven Anreicherung von Enterobacteriaceae wurden zwei selektive Medien verwendet (EMB und MC, 37°C). Die Dichte aller kultivierbaren Organismen auf diesen Medien liegt zwischen 10^5 und 10^8 KBE/g TS in Eingangs- und 10^2 und 10^8 KBE/g TS in Ausgangsproben für 2012 (Abbildung 11). In 13 den Anlagen kann im Ausgang eine um durchschnittlich 2 Größenordnungen

reduzierte KBE dargestellt werden. Zwei Anlagen (BGA3 und 4) zeigen eine erhöhte Organismendichte im Ausgang. Im Jahresgang 2013 kann eine durchschnittliche KBE von 10^5 in Eingangs- und 10^4 KBE/g TS in Ausgangsproben detektiert werden (Abbildung 12).

Enterococcaceae wurden auf zwei selektiven Medien (Slanetz & Bartley (SB) und Galle Esculin Azi (GEA), 37° C) kultiviert. Die Dichte aller kultivierbaren Organismen auf diesen Medien liegt in Eingangsproben bei 10^4 – 10^8 und bei 10^3 – 10^6 in Ausgangsproben im Screening 2012 (Abbildung 11). In allen Anlagen mit Ausnahme von BGA11 ist eine um durchschnittlich 2,1 Größenordnungen reduzierte KBE in Ausgangsproben zu finden. Die stärkste Divergenz von vier Größenordnungen zwischen Eingang und Ausgang tritt in BGA14 auf (Abbildung 11). Im Jahresgang 2013 bewegt sich die Organismendichte in Eingangs- und Ausgangsproben im Bereich von 10^6 KBE/g TS ohne nennenswerte Schwankungen (Abbildung 12).

Auf Selektivmedien für Staphylokokken (Mannit-Salz-Agar), wurde die Konzentration der gesamten kultivierbaren Bakterien in einem Bereich von 10^3 bis 10^9 KBE/g TS in Eingangs- und 10^5 bis 10^8 KBE/g TS Ausgangsproben ermittelt. In vier Biogasanlagen ist eine größere Dichte kultivierbarer Bakterien in Ausgangsproben von bis zu zwei Größenordnungen (BGA7) nach zu weisen. Sieben Biogasanlagen zeigen eine reduzierte Organismendichte in Ausgangsproben. Die KBE/g TS ist um ein bis zwei Potenzen reduziert (Abbildung 11).

Anlagen tritt eine deutlich reduzierte Bakteriendichte in den Ausgangsproben von bis zu 4 Größenordnungen (BGA1 und 2) auf. In den Anlagen BGA3, 4 und 7 kann kein bakterielles Wachstum festgestellt werden, ebenso in den Ausgangsproben von BGA8 und 10. Drei Anlagen zeigen eine leicht erhöhte Bakterienzahl im Ausgang mit einer Differenz von maximal einer Größenordnung (Abbildung 11). Im Jahresgang 2013 ist das Wachstum in Eingang und Ausgang gleichmäßig zwischen 10^3 und 10^5 KBE/g TS mit einer Reduktion von ein bis zwei Größenordnungen (Abbildung 12).

CHROMagar MRSA zeigen ein bakterielles Wachstum zwischen 10^3 bis 10^8 KBE/g TS in Eingangs- und 10^5 bis 10^8 KBE/g TS Ausgangsproben. Sechs Anlagen zeigten eine geringe Zunahme der Bakterienlast unterhalb einer Größenordnung, während eine Reduktion von bis zu zwei Größenordnungen in Ausgangsproben aufweisen. Kein Wachstum konnte in den Anlagen BGA6, 8, 11, 12 und 15A nachgewiesen werden (Abbildung 11).

Das gesamte kultivierbare Spektrum an Bakterien auf CHROMagar ESBL liegt zwischen 10^3 bis 10^7 KBE/g TS in Eingangs- und 10^1 bis 10^8 KBE/g TS Ausgangsproben im *screening* 2012. In sechs Anlagen tritt eine deutlich reduzierte Bakteriendichte in den Ausgangsproben von bis zu 4 Größenordnungen (BGA1 und 2) auf. In den Anlagen BGA3, 4 und 7 kann kein bakterielles Wachstum festgestellt werden, ebenso in den Ausgangsproben von BGA8 und 10. Drei Anlagen zeigen eine leicht erhöhte Bakterienzahl im Ausgang mit einer Differenz von maximal einer Größenordnung (Abbildung 11). Im Jahresgang 2013 ist das Wachstum in Eingang und Ausgang gleichmäßig zwischen 10^3 und 10^5 KBE/g TS mit einer Reduktion von ein bis zwei Größenordnungen (Abbildung 12).

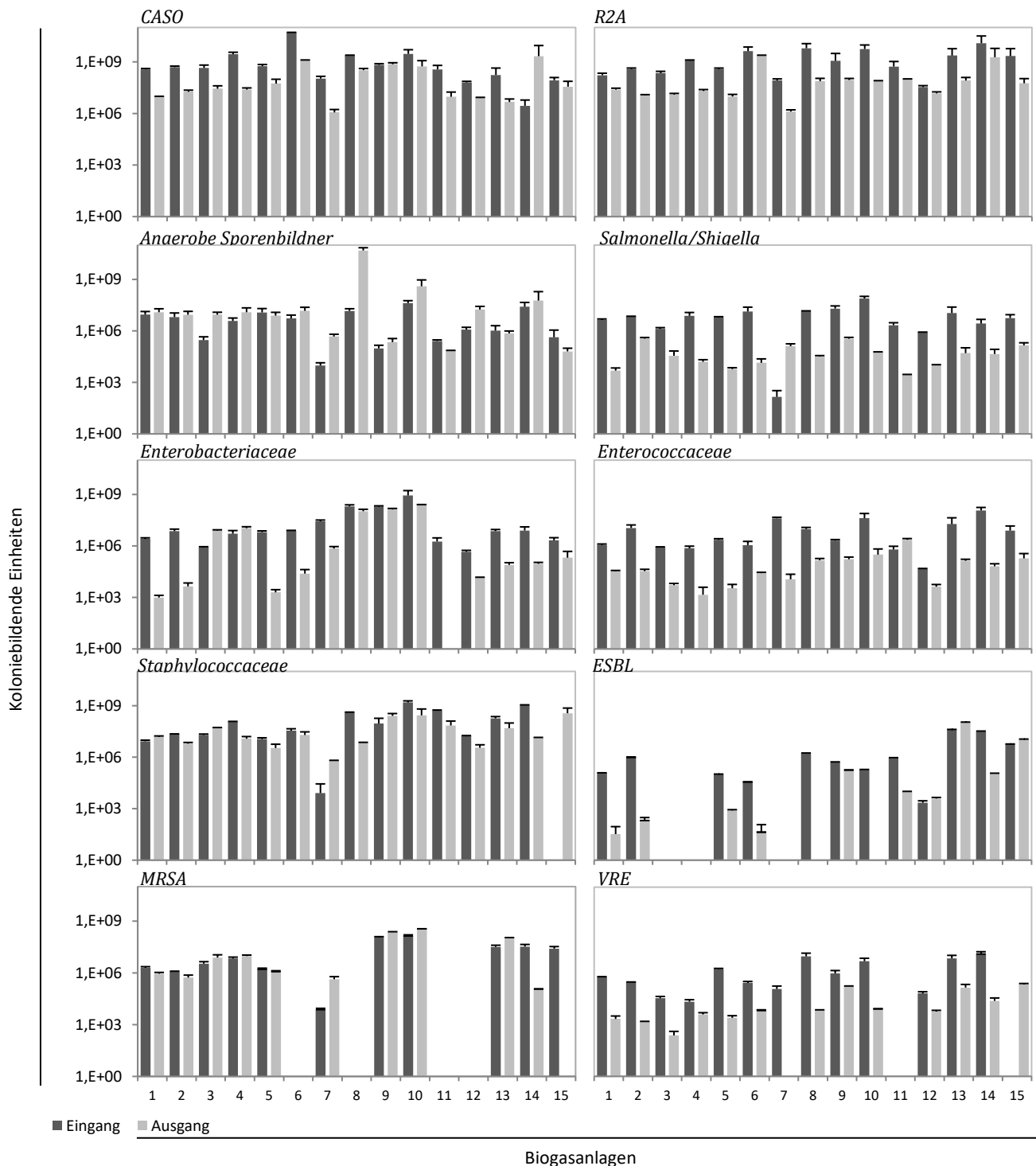


Abbildung 11 Auszählung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) von Eingangs- und Ausgangsproben 15 deutscher Biogasanlagen in einem landesweiten Screening 2012. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung von triplikatier Ausplattierung über multiple Verdünnungsstufen. Daten der Anlagen BGA1-BGA7 und BGA12 wurden vom IAM (Justus-Liebig-Universität, Gießen) erhoben.

Die Dichte kultivierbarer Bakterien auf CHROMagar VRE liegt zwischen 10^4 bis 10^7 KBE/g TS in Eingangs- und 10^2 bis 10^5 KBE/g TS Ausgangsproben. In 12 Anlagen findet eine Reduktion der Kolonie-bildenden Einheiten um durchschnittlich 1,9 Größenordnungen in Ausgangsproben statt. BGA7, 11 und 15 zeigen kein Wachstum in einer oder beiden Proben (Abbildung 11).

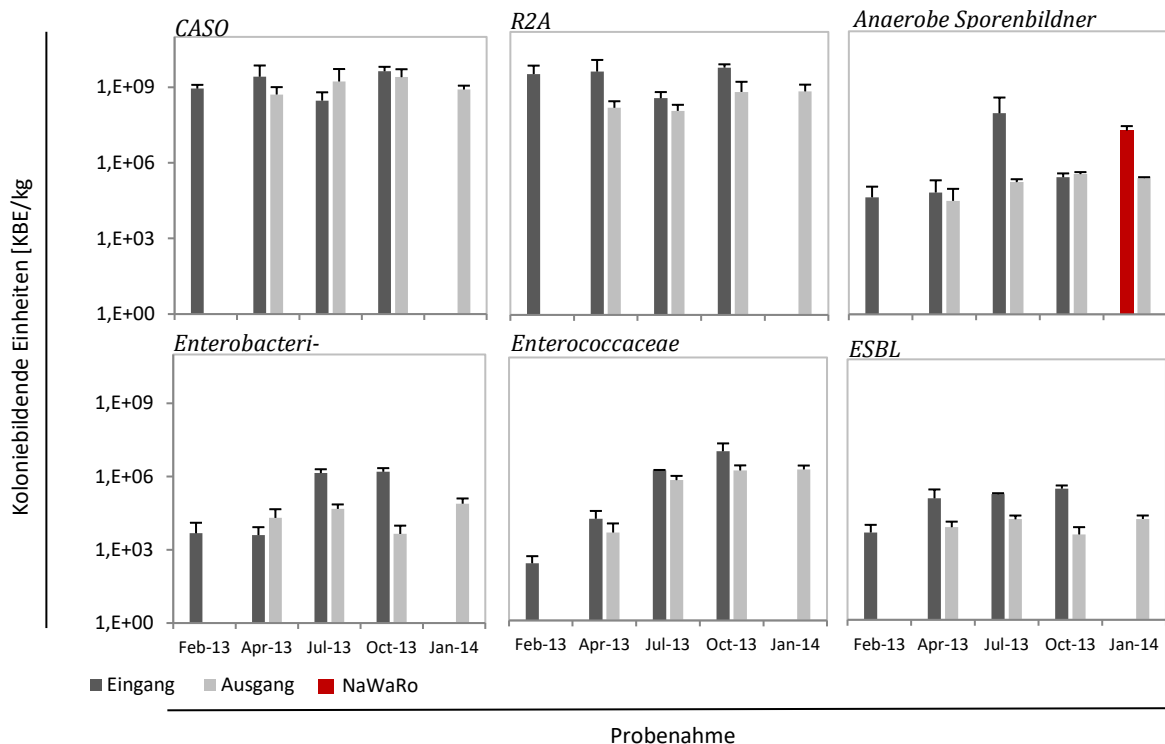


Abbildung 12 Auszählung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) von Eingangs- und Ausgangsproben von BGA8 über den Jahresgang 2013 sowie einer Einzelprobe NaWaRo (Maissilage) aus BGA 15. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung triplikatier Ausplattierung über multiple Verdünnungsstufen.

Bakterielle Diversität der häufigsten Isolate

Insgesamt konnten 1815 Isolate durch eine stichprobenhafte Selektion der häufigsten Morphologien auf allen verwendeten Medien aus Eingangs- und Ausgangsproben gewonnen werden. Die Isolate können den vier bakteriellen Phyla Actinobacteria, Bacterioidetes, Firmicutes und Proteobacteria mit insgesamt 34 Familien und 71 Gattungen zugeordnet werden (Tabelle 20). In Allen Anlagen herrschen die Phyla Firmicutes und Proteobacteria vor. Die Diversität der Isolate aus Eingangsproben mit 62 Gattungen und 34 Familien aus vier Phyla ist deutlich höher als die der Ausgangsproben mit nur 50 Gattungen und 14 Familien und zwei Phyla. 60 % aller Isolate aus Eingangs- und 74 % aller Isolate aus Ausgangsproben waren dem Phylum Firmicutes, 31 % aller Eingangs- und 25 % aller Ausgangsproben dem Phylum Proteobacteria angehörig, während Actinobacteria und Bacterioidetes 6 % und 3 % in Eingangsproben und jeweils 1 % in Ausgangsproben ausmachen. Eine Verschiebung der Phyla von Eingangs- zu Ausgangsproben lässt sich auch auf Ebene der einzelnen Anlagen beobachten. Gattungen des Phylums Firmicutes konnten in Ausgangsproben durchschnittlich 30 % häufiger isoliert werden als in Eingangsproben. Proteobacteria konnten in elf Anlagen durchschnittlich 20 % häufiger aus Eingangsproben isoliert werden während vier Anlagen einen leichten Anstieg der Proteobacteria zeigten. Isolate der Actinobacteria und Bacterioidetes sind in Ausgangsproben weitgehend eliminiert.

Isolate des Phylums Firmicutes wurden vornehmlich von den Medien CASO, R2A, MSA, S&B und GEA gewonnen (Tabelle 20). Innerhalb des Phylums herrschen die Gattungen *Bacillus*, *Enterococcus* und *Staphylococcus* in Eingangs- und *Bacillus*, *Enterococcus* und *Paenibacillus* in Ausgangsproben vor (Abbildung 13). Mit Ausnahme der Proben BGA3E konnte *Bacillus* aus jeder Probe isoliert werden mit einer Prävalenz der Bacillaceae von 17 % aller Isolate in Eingangs- und 50 % aller Isolate in Ausgangsproben. In Ausgangsproben wurden 44% der Isolate der Gattung *Bacillus* von CASO-Agar isoliert. Enterococcaceae wurden in allen Proben außer BGA2E und BGA11A detektiert und liegen sich zwischen 14 % und 13 % aller Isolate in Eingangs- und Ausgangsproben. Isolate der Gattung *Clostridia* werden in den Anlagen BGA8, BGA9, BGA10 und BGA13 und ausschließlich auf ColSB-Medium detektiert. Funde der Clostridiaceae bleiben konstant und machen 3 % der Isolate in Eingangs- und 4 % in Ausgangsproben aus (Abbildung 13).

Die häufigsten Vertreter der Phylums Proteobacteria sind *Ochrobactrum spp.*, *Escherichia spp.*, *Morganella spp.*, *Serratia spp.* und *Pseudomonas spp.* in Eingangs- sowie *Ochrobactrum spp.*, *Proteus spp.* und *Pseudomonas spp.* in Ausgangsproben (Abbildung 13). Enterobacteriaceae ist die Familie mit dem größten Spektrum an Gattungen und kann in allen Eingangsproben außer BGA7E detektiert werden (Abbildung 13).

Isoliert wurden diese Gattungen vermehrt von den selektiven Medien EMB, MC, SS und ESBL sowie den Komplexmedien CASO und R2A. In Ausgangsproben können Vertreter der Familie in 10 der Anlagen nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte nur auf den Medien EMB, MC, SS und ESBL (Tabelle 20). Während Enterobacteriaceae, die am stärksten vertretene Familie der Proteobacteria in Eingangs- und Ausgangsproben darstellt, machen die zugehörigen Isolate 14 % bzw. 7 % aller Isolate aus (Abbildung 13, Tabelle 20).

Gramnegative Organismen konnten häufiger aus Eingangsproben isoliert werden, hier machen sie durchschnittlich 40 % aller Isolate aus. In 13 der Anlagen ist die Anzahl gramnegativer Bakterien in Ausgangsproben um durchschnittlich 18 % geringer und liegt bei 25 % aller Isolate, bis hin zu einer absoluten Reduktion in BGA10 (Tabelle 20).

Generell wird eine höhere Diversität mit einem größeren Spektrum an Familien und Gattungen in den Eingangsproben aller Anlagen gefunden. Durchschnittlich treten 30 % weniger Gattungen in Ausgangsproben auf mit Ausnahme der BGA7 in der eine höhere Diversität der Ausgangsproben vorliegt (Tabelle 20). Die größte Diversität ist in BGA4E (19 Isolate), BGA13E-BGA15E mit 21-24 verschiedenen Gattungen zu finden. Ähnlich Werte treten bei der Isolat-reichsten Probe BGA8A (160 Isolate) auf. Die generelle Häufigkeit der Gattung *Bacillus* lässt sich auch in den einzelnen Anlagen erkennen. *Bacillus* ist die häufigste Gattung in 14 von 15 Ausgangsproben und macht zwischen 10 % (BGA4A) und 40 % (BGA/ und BGA9) der gesamten Isolate der Proben aus (Abbildung 13). Einzig BGA2A zeigt eine Prävalenz der Gattung *Enterococcus* mit 10 % der Isolate (10 Isolate) dieser Probe. Eingangsproben gestalten ein diverseres Bild der vorherrschenden Gattung. Sieben der Proben (BGA4, BGA6-BGA11) haben *Bacillus* als häufigste Gattung mit 10 % (BGA4E) bis 40 % (BGA9E) der Isolate der jeweiligen Probe. BGA1E, BGA3E und BGA14E zeigen eine Prävalenz der Gattung *Enterococcus* zwischen 15 % und 25 % während anderen Proben verstärkt *Acinetobacter* (BGA5E, 16 %), *Pseudomonas* (BGA12E, 25 %), *Staphylococcus* (BGA13E, 15 %) oder *Myroides* (BGA15E, 20 %) ausprägen (Abbildung 13).

ERGEBNISSE

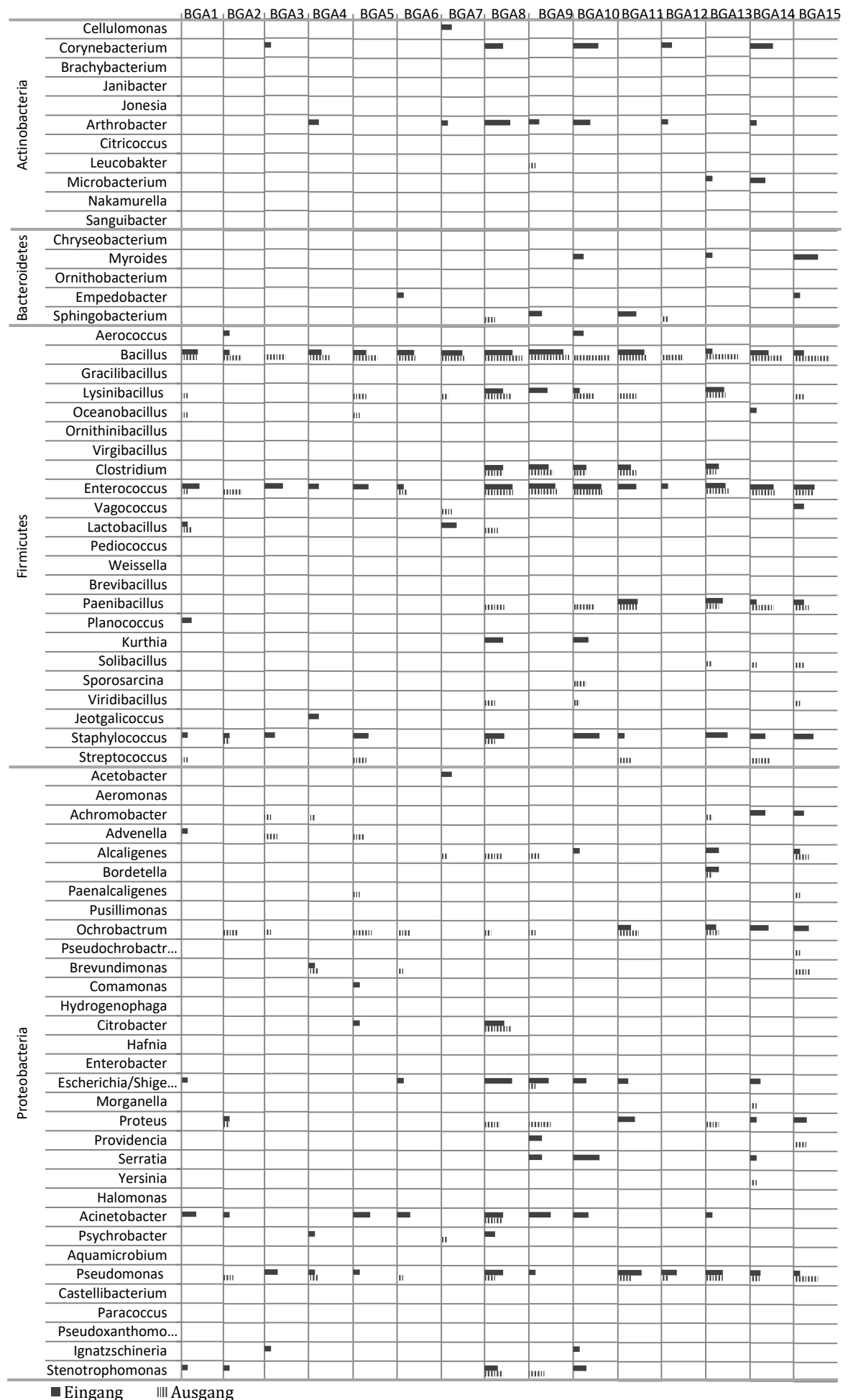


Abbildung 13 Spektrum kultivierbarer, identifizierter Bakterien in Eingangs- und Ausgangsproben von Biogasanlagen BGA1-BGA15 aus dem Screening 2012. Die Anzahl der Organismen ist logarithmisch gegen Phylum und Gattung aufgetragen. Die Bakterien wurden aus einer Reihe selektiver und komplexer Medien isoliert und identifiziert mittels MALDI TOF-MS oder 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung.

Insgesamt konnte eine Reduktion sowohl der gesamten KBE als auch der verschiedenen Schlüsselfamilien festgestellt werden. Eine Ausnahme bilden obligate anaerobe Sporenbildner, die im Gegensatz zu anderen Schlüsselorgansimen wie Enterococcaceae und Enterobacteriaceae eine ansteigende Tendenz in Ausgangsproben zeigen. Eine signifikante Änderung der KBE im jahreszeitlichen Kontext kann nicht ermittelt werden. Die Betrachtung der Isolatsammlung zeigt eine höhere Diversität auf Gattungs- und Familienebene in Eingangsprouben, eine Reduzierung gramnegativer Bakterien in Ausgangsprouben und eine generelle Prävalenz der Gattung *Bacillus* mit größter Ausprägung in Ausgangsprouben.

Tabelle 20 Spektrum kultivierbarer, identifizierter Bakterien in Eingangs- und Ausgangsprouben von Biogasanlagen BGA1-BGA15 aus dem Screening 2012. Weiterführende Information zu Abbildung13.

Eingang BGA	ges.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Isolate [n]	879	41	21	29	35	37	25	24	142	110	110	75	20	69	75	66
Familie [n]	34	14	12	15	17	15	10	6	14	10	14	11	9	14	14	15
Gattung [n]	62	20	16	17	24	19	15	8	21	19	21	17	13	23	22	22
Anteil der Isolate/Phylum [%]																
Actinobacteria	6	12	2	10	10	23	8	0	21	17	3	19	1	35	5	24
Bakterioidetes	3	5	2	5	7	3	0	12	0	1	4	4	11	0	3	1
Firmicutes	60	46	54	29	41	37	41	44	67	45	61	43	48	25	51	37
Proteobacteria	31	37	41	57	41	37	51	44	13	37	32	34	39	40	42	37
Anteil gramnegativer Isolate [%]	39	44	57	45	37	51	56	13	35	30	35	39	40	42	37	56
Ausgang BGA	ges.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Isolate [n]	936	24	31	21	20	38	27	24	170	130	106	64	19	80	78	101
Familie [n]	14	9	7	6	7	8	10	7	13	10	6	6	8	9	9	10
Gattung [n]	50	14	11	9	8	11	14	10	25	16	14	11	10	14	14	17
Anteil der Isolate/Phylum [%]																
Actinobacteria	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	0	0	0	0
Bakterioidetes	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	11	0	0	0
Firmicutes	74	83	58	57	55	63	59	75	66	77	99	74	68	76	87	65
Proteobacteria	25	17	42	43	45	37	41	25	31	21	0	26	21	24	13	35
Anteil gramnegativer Isolate [%]	24	17	42	43	45	37	41	25	29	18	0	23	21	23	13	35

3.2.2 Eignung verwendeter Selektivmedien zur Isolation von Schlüsselorganismen aus Substrat und Gärrest

Zwei Komplexmedien (CASO, R2A), sechs selektive Medien für die Erfassung klinisch relevanter Schlüsselorganismen (MC/EMB, GEA/SB, SS, MSA) und drei Antibiotika-angereicherte CHROMagar-Medien zur selektiven Erfassung resistenter Pathogene (CHROMagar ESBL, CHROMagar VRE, CHROMagar MRSA) wurden eingesetzt um das kultivierbare Spektrum der Bakterien in Gülle-, Mist- und Gärrestproben zu erfassen. Der intendierte Einsatz der selektiven Medien zu diagnostischen Zwecken mit medizinischem Probenmaterial veranlasst eine Prüfung der selektiven Funktionalität dieser Medien zum Einsatz an komplexen Umweltprobenmatrizes.

Auf allen Medien außer SS ist eine größere Diversität der Phyla im Eingang zu sehen. Auf den Medien CASO, R2A, GEA/SB und MSA ist das dominanteste Phylum Firmicutes mit 40% (R2A, Eingang) bis 100 % (GEA/SB, Ausgang) der Isolationen (Abbildung 14). Auf EMB/MC (84 % im Eingang, 53 % im Ausgang) und SS (94 % im Eingang, 90 % im Ausgang) herrschen Isolationen des Phylums Actinobacteria vor. Firmicutes ist auf allen Medien im Ausgang stärker vertreten mit einer Divergenz von 1 % auf GEA/SB, über 4 % auf SS bis hin zu 58 % und 52 % auf den Komplexmedien R2A und CASO. Vertreter des Phylums Actinobacteria werden mit 1 % aus der Ausgangsprobe von R2A isoliert und sonst nur in Eingangsproben mit 3 % (EMB/MC) bis 27 % und 24 % (CASO, R2A) isoliert. Bacterioidetes konnten ausschließlich in Eingangsproben der Komplexmedien (CASO 6 %, R2A 7%) detektiert werden (Abbildung 14).

Vertreter des Phylums Actinobacteria konnten von fünf der verwendeten Medien isoliert werden. Insgesamt können acht Familien dieses Phylums identifiziert werden. Nur auf den Komplexmedien CASO und R2A konnte das Phylum in Eingangs- und Ausgangsproben detektiert werden. Die Medien SS, GEA/SB, ESBL und VRE generierten keine zugehörigen Isolate. Isolate dieses Phylums gehörten mit abnehmender Häufigkeit den Familien Micrococcaceae, Corynebacteriaceae, Cellulomonadaceae und Dermabacteraceae an (Abbildung 14).

Zwei Familien des Phylums Bacterioidetes (Sphingobacteriaceae und Flavobacteriaceae) konnten von insgesamt fünf Medien isoliert werden. CASO, R2A und CHROMagar ESBL generierten Isolate nur in Eingangs- während Sphingobacteriaceae von CHROMagar VRE auch in Ausgangsproben isoliert werden konnte (Abbildung 14). Firmicutes konnten von allen Medien mit insgesamt neun Familien isoliert werden. Nur CHROMagar ESBL generierte keine Isolate des Phylums in Eingangsproben. Isolate dieses Phylums gehörten vermehrt der Familie der Bacillaceae an. Auf sieben Medien (CASO, R2A, EMB/MC, MSA, ESBL und MRSA) stellen die Bacillaceae den Hauptteil der Isolate. Nur von SS und CHROMagar VRE konnten wenige bis keine Isolate der Familie gewonnen werden. Auf sechs Medien (CASO, R2A, EMB/MC, MSA, ESBL, MRSA) ist die Isolationsfrequenz für Bacillaceae in Ausgangsproben höher als in Eingangsproben während es sich auf den Medien GEA/SB und CHROMagar VRE umgekehrt verhält. Enterococcaceae ist die zweithäufigst isolierte Familie der Firmicutes und wird auf sieben der Medien detektiert. Besonders häufig wurden Enterococcaceae von den Medien SS (E: 99 %, A: 90% der Isolate), GEA/SB (A:50 % der Isolate) und CHROMagar VRE (A: 40 %, E: 20 %) isoliert. SS -Medium zeigt die stärkste Prävalenz der Enterococcaceae mit über 80 % der Firmicutes. Auf allen Medien ist eine reduzierte Isolationsrate der Familie in Ausgangsproben zu erkennen. Staphylococcaceae konnten von allen Medien außer CHROMagar ESBL isoliert werden. Besonders häufig wurden Isolate der Familie in Eingangsproben von den Medien EMB/MC, MSA und GEA/SB isoliert während die Isolationsrate in Ausgangsproben deutlich geringer war (Abbildung 14).

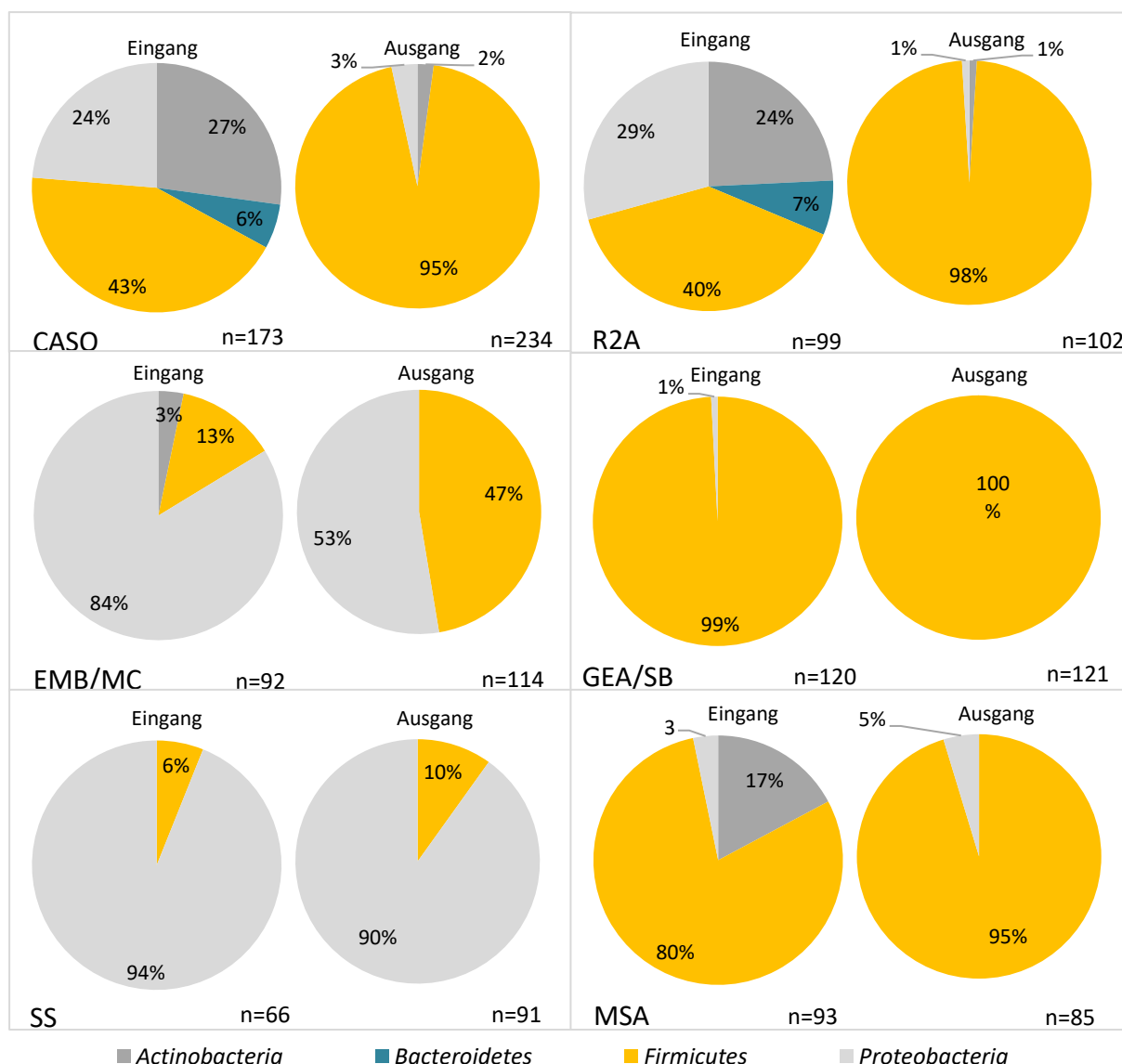


Abbildung 14 Bakterielle Diversität der Isolat-Funde, aus Proben des screenings 2012, auf verwendeten Komplex- und Selektivmedien. Kolonien wurden stichprobenartig isoliert und über 16s rRNA-Gene-Fragment-Sequenzierung oder MALDI TOF identifiziert. Isolate (n) jeder Probe wurden in die abgebildeten Phyla unterteilt. Daten der Anlagen BGA1-BGA7 und BGA12 wurden vom IAM (Justus-Liebig-Universität, Gießen) erhoben.

Drei Selektivmedien zur Kultivierung von Enterokokken wurden eingesetzt. Isolate von zwei der Medien SB und GEA zeigen eine deutliche Prävalenz des Phylums Firmicutes mit einer Isolationsrate der Familie Enterococcaceae von 91 % bzw. 72 % in Eingangs- und 66% bzw. 86 % in Ausgangsproben. Auf CHROMagar VRE hingegen prävalierten die Phyla Bacteroidetes (30% Sphingobacteriaceae, 26% Flavobacteriaceae) in Eingangs- und Firmicutes (28 % Paenibacillaceae) und Proteobacteriaceae (23%, Caulobacteraceae) in Ausgangsproben (Tabelle 21).

Isolate des Phylums Proteobacteria sind die Familien-reichsten (13 Familien) in dieser Studie. Sie konnten von sieben Medien mit bis zu 86 Isolaten (CHROMagar ESBLs E) identifiziert werden. Wenig Isolate, in einem Bereich von null bis vier, generierten die Medien GEA/SB, MSA und CHROMagar MRSA (Abbildung 15). Enterobacteriaceae stellen den größten Teil der Isolate dieses Phylums dar. Auf den Medien EMB/MC, SS und CHROMagar ESBL machen sie zwischen 25 % und

50 % aller Isolate in Eingangsproben aus. Auf vier Medien (CASO, R2A, CHROMagar ESBL und CHROMagar VRE) sind deutlich weniger Isolate dieser Familie in Ausgangsproben zu finden während sie auf den Medien EMB/MC und SS aus Eingangs- und Ausgangsproben gleichermaßen isoliert werden konnten (Abbildung 15). Alcaligenaceae bilden eine weitere häufig isolierte Familie, die auf sechs der Medien gefunden werden konnte. Auf den Medien CASO, EMB/MC, CHROMagar ESBL und CHROMagar VRE werden Vertreter dieser Familie häufiger aus Ausgangsproben isoliert. Auf CASO und EMB/MC machen sie in Ausgangsproben zwischen 40 % und 60 % aller Isolate aus. Die Medien GEA/SB, MSA und MRSA generierten keine Isolate dieser Familie (Abbildung 15). Pseudomonadaceae wurden verstärkt von CASO, SS und CHROMagar ESBL isoliert. Auf diesen Medien bilden sie zwischen 20 % (CASO; A und CHROMagar ESBL; E/A) und 40 % (SS; E und A) aus (Abbildung 15).

Der überwiegende Teil aller Isolate die von Komplexmedien isoliert wurden gehören sowohl in Eingangs- als auch in Ausgangsproben der Familie Bacillaceae an. 25 % bis 23 % der Isolate aus Eingangs- und 78 % bis 86 % aller Isolate aus Ausgangsproben sind der dieser Familie zugeordnet. Die häufigste Gattung auf beiden Medien ist *Bacillus* mit einer Prävalenz von 20 %-30 % der Eingangs isolate und 65 % bis 70 % im Ausgang (Tabelle 21). Ebenfalls stark vertreten sind die Familien Micrococcaceae und Corynebacteriaceae (10 %-13 %) in Eingangsproben sowie Paenibacillaceae (5 %CASO und 17 % R2A) in Ausgangsproben (Tabelle 21).

Die Selektivmedien zur Kultivierung von Staphylokokken MSA und CHROMagar MRSA zeigten überwiegend Isolate der Firmicutes. Von MSA konnten in Eingangsproben 39 % Vertreter der Familie Staphylococcaceae isoliert werden dicht gefolgt von Bacillaceae mit 37 % aller Isolate. In Ausgangsproben wurden zu 94 % Bacillaceae gefunden (Tabelle 21). Die häufigst-isolierte Gattung auf diesem Medium war in beiden Probenformen *Bacillus* (Tabelle 21). CHROMagar MRSA zeigte sowohl in Eingangs- als auch Ausgangsproben vornehmlich Isolate der Familie Bacillaceae (E:32 % und A:72 %). Weitere häufige Familien auf beiden Probenformen waren die Enterococcaceae mit 12 % bis 14 % und Paenibacillaceae mit 22 % und 13 % aller Isolate (Tabelle 21). Die häufigsten Gattungen auf diesem Medium sind *Paenibacillus* (22 % aller Isolate) in Eingangs- und *Lysinibacillus* (36 % aller Isolate) in Ausgangsproben (Tabelle 21).

Die vier Selektivmedien zur Kultivierung von Enterobacteriaceae zeigen in Eingangsproben eine Prävalenz der Schlüsselfamilie von 23% (EMB) über 32% (MC) und 47% (SS) bis hin zu 50% (CHROMagar ESBL) aller Isolate (Tabelle 21). Ebenfalls häufig isoliert wurden Vertreter der Moraxellaceae (20%; EMB), Brucellaceae (20%; MC) und Pseudomonadaceae (32%; SS, 18 %; CHROMagar ESBL). Ausgangsproben der Selektivmedien generieren vermehrt Isolate des Phylums Proteobacteriaceae. MC und SS generierten auch in den Ausgangsproben noch 20 % bzw. 36 % Isolate der Familie Enterobacteriaceae (Tabelle 21). Von EMB-Medium konnten hingegen zu 29 % Alcaligenaceae und zu 25% Bacillaceae isoliert werden. Die häufigste Gattung war auch hier *Bacillus* mit 26 % der Isolate. CHROMagar ESBL zeigte das diverseste Bild der Isolate innerhalb der Proteobacteria mit 24 % Brucellaceae und Rhodobacteriaceae sowie 16 % Xanthomonadaceae und Pseudomonadaceae (Tabelle 21). Die häufigsten Gattungen sind für jedes der Medien unterschiedlich. In Eingangsproben gehören sie den Proteobacteria an mit Enterobacteriaceae-spezifischen Ergebnissen, 18 % *Escherichia/Shigella* auf MC und 24 % *Serratia* auf CHROMagar ESBL, während EMB (20 % *Acinetobacter*) und SS (32 % *Pseudomonas*) weniger selektive Gattungen zeigen (Tabelle 21). In Ausgangsproben sind neben Gattungen der Proteobacteria *Pseudomonas* (31% auf SS) und *Ochrobactrum* (31% auf CHROMagar ESBL) *Bacillus* (EMB:26 %, MC: 40 %), eine Gattung der Firmicutes prävalent (Tabelle 21).

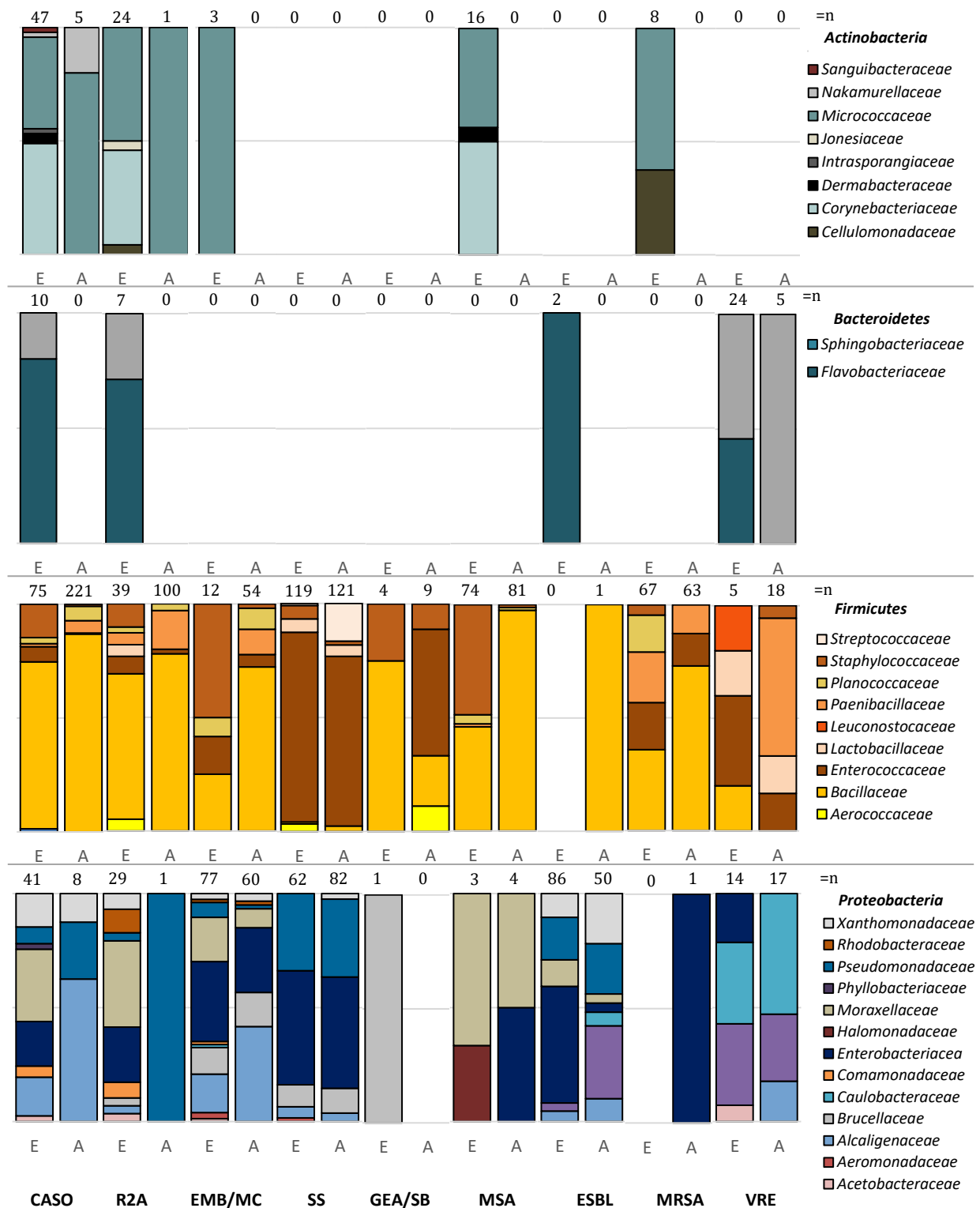


Abbildung 15 Bakterielle Diversität und Medienspezifität der Proben des screenings 2012. Kolonien wurden stichprobenartig isoliert und über 16s rRNA-Gene-Fragment-Sequenzierung oder MALDI TOF identifiziert. Isolate [n=100 %] jeder [E]ingangs- und [A]usgangsprobe wurden auf Genus-Ebene summiert und in die abgebildeten Phyla unterteilt. Daten der Anlagen BGA1-BGA7 und BGA12 wurden vom IAM (Justus-Liebig-Universität, Gießen) erhoben.

Tabelle 21 Prävalenz der Gattungen auf Komplex- und Selektivmedien.

Medien	Eingang			Ausgang		
	Isolate [n]	Anteil [%]	Gattung	Isolate [n]	Anteil [%]	Gattung
EMB	30	20%	<i>Acinetobacter</i>	47	26%	<i>Bacillus</i>
MC	62	18%	<i>Escherichia/Shigella</i>	67	40%	<i>Bacillus</i>
SS	66	32%	<i>Pseudomonas</i>	91	31%	<i>Pseudomonas</i>
ESBL	88	24%	<i>Serratia</i>	51	31%	<i>Ochrobactrum</i>
CASO	173	27%	<i>Bacillus</i>	234	71%	<i>Bacillus</i>
R2A	99	22%	<i>Bacillus</i>	102	65%	<i>Bacillus</i>
MSA	93	35%	<i>Bacillus</i>	85	91%	<i>Bacillus</i>
VRE	43	30%	<i>Sphingobacterium</i>	40	28%	<i>Paenibacillus</i>
MRSA	78	22%	<i>Paenibacillus</i>	64	36%	<i>Lysinibacillus</i>
SB	66	91%	<i>Enterococcus</i>	74	65%	<i>Enterococcus</i>
GEA	54	72%	<i>Enterococcus</i>	47	81%	<i>Enterococcus</i>

Die Analyse der Medienfunktionalität anhand isolierter Bakterien zeigt eine abnehmende Diversität in Ausgangsproben auf allen untersuchten Medien mit zunehmender Prävalenz von Bacillaceae. Ein Großteil der Medien insbesondere Komplexmedien wird von Isolaten des Phylums Firmicutes dominiert, die in Ausgangsproben zunehmen und die Frequenz spezifischer Isolation erniedrigen. Die Isolation von Enterococcaceae ist sowohl in Eingangs- als auch Ausgangsproben mit Hilfe der Selektivmedien erfolgreich während Enterobacteriaceae und vor allem Staphylococcaceae in Ausgangsproben von unspezifischen Bakterien überlagert werden. CHROMagar sind nur bedingt zum Einsatz an dem komplexen Probenmaterial geeignet, da spezifische Isolationen nur von CHROMagar ESBL erfolgten.

3.3 ABUNDANZ UND DIVERSITÄT VON RESISTENTEN UND RESISTENZGEN-TRAGENDEN SCHLÜSSELORGANISMEN IN LANDWIRTSCHAFTLICHEN ABWÄSSERN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DES RÜCKHALTUNGSPOTENTIALS EINER BIOTECHNOLOGISCHEN BARRIERE



Abbildung 16 Übersicht des methodischen Ablaufs und der verwendeten Testverfahren zur mikrobiologischen Charakterisierung landwirtschaftlicher Abwasserproben.

Der starke Einsatz antibiotisch-wirksamer Substanzen in der Landwirtschaft fördert Bildung und Persistenz resistenter bzw. Resistenzgen-tragender Organismen in landwirtschaftlichen Abwässern.

Die funktionelle Zuordnung einer Resistenz über die Bestimmung der Minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) und eines Resistenzgens zum Trägerorganismus ist nötig um die klinische Relevanz der zuvor akkumulierten Schlüsselorganismen zu eruieren. Doch nicht nur bekannte Pathogene, sondern auch Kommensale und Umweltorganismen können Resistenzen tragen und diese über Mechanismen des horizontalen Gentransfers weiterverbreiten.

Die Kontamination landwirtschaftlicher Abwässer durch resistente und Resistenzgen-tragende Bakterien, sowie den eliminierenden bzw. rückhaltenden Einfluss von Biogasanlagen auf diese Kontaminanten wird im Folgenden untersucht.

Nach phylogenetischer Identifizierung der Isolate wurden sie in die Familien Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Staphylococcaceae, Actinobacteriaceae, Xanthomonadaceae, Bacillaceae und Clostridiaceae zusammengefasst und ihre Empfindlichkeit gegenüber acht veterinärmedizinisch relevanten Antibiotika getestet (Abbildung 17). Folgende Antibiotikagruppen wurden untersucht: β -Lactam-Antibiotika (Amoxicillin AMX, Oxacillin OXA), Fluorchinolone (Enrofloxacin ENR), Tetracycline (Tetracycline TET), Makrolide (Tylosin TLS), Fenicol (Florfenicol FLL) und Sulfonamide (Trimethoprim mit Sulfamethoxazol T/S, Sulfamethoxazol SMO) (Abbildung 16). Isolate der Familien Enterobacteriaceae und Enterococcaceae wurden zusätzlich auf ein Spektrum von 12 Tetracyclinresistenzgenen und drei Sulfonamidresistenzgenen untersucht (Abbildung 17).

3.3.1 Verteilung der Minimalen-Hemmstoff-Konzentration veterinärmedizinisch relevanter Antibiotika in Biogasanlagen

202 Isolate (E:137 n, A: 65 n) der Enterobacteriaceae mit insgesamt 15 Gattungen wurden in die MHK-Testung eingesetzt. Die häufigsten Gattungen sind *Escherichia* mit 79 Isolaten, *Citrobacter* und *Proteus* mit jeweils 25, sowie *Serratia* mit 22 Isolaten. Bekannte Grenzwerte liegen für die Substanzen ENR, AMX, TET, T/S und SMO vor (Tabelle A7). Ähnliche Resistenzmuster ergeben sich für Eingangs und Ausgangsproben. Für drei (AMX, ENR, T/S) der acht Substanzen kann eine leichte Abnahme resistenter Organismen in Ausgangsproben gezeigt werden. Organismen die aus Ausgangsproben isoliert wurden sind zu 10 % empfindlicher gegenüber AMX als Isolate aus Eingangsproben. Ähnliche Unterschiede zwischen Eingang und Ausgang können für T/S (9 %), ENR (4 %) und FLL (3 %) gezeigt werden. Der Anteil resistenter Isolate ist jedoch gegenüber AMX mit 70 % bzw. 60 % deutlich höher gegenüber den anderen Substanzen die zwischen 6 % (ENR; A) und 20% (T/S, E) liegen. Die Testung der MHK von TET zeigte hingegen vermehrt sensible Isolate in Eingangsproben (8 %). Der Umbruchspunkt für SMO liegt außerhalb des gemessenen Bereichs, so dass das Resistenzverhalten nicht geklärt werden kann. Sensible Isolate machen jedoch sowohl in Eingang als auch Ausgang 20 % des Gesamtspektrums aus. Keine Empfindlichkeit gegenüber OXA und TLS konnte gefunden werden (Abbildung 17).

In 195 Isolaten der Enterococcaceae wurden 113 Isolate des Eingangs, 82 des Ausgangs sowie die beiden Gattungen *Enterococcus* (189 n) und *Vagococcus* (6 n) zusammengefasst. *Breakpoints* sind für die Antibiotika AMX, ENR, TET und T/S bekannt (Tabelle A7). Resistenzmuster sind in Eingangs- und Ausgangsproben ähnlich. 5 % aller Isolate aus Eingang und Ausgang sind resistent gegenüber AMX. Gegenüber ENR, TET und T/S nimmt der Anteil resistenter Isolate in Ausgangsproben ab. Am deutlichsten wird dies bei der Testung von T/S mit einer Divergenz von 12 %. Für die Substanzen OXA, TLS, FLL und SMO liegen keine Grenzwerte vor. Isolate werden nach Wachstum auf der höchsten Konzentrationsstufe („resistent“), kein Wachstum auf der niedrigsten Konzentration

rationsstufe („sensibel“) und Wachstum auf einer intermediären Konzentrationsstufe („intermediär“) eingeteilt. Es ist anzunehmen, dass die *breakpoints* innerhalb oder über dem intermediären Bereich liegen. Isolate die auf der niedrigsten Konzentrationsstufe kein Wachstum zeigten bilden für alle vier Substanzen den geringsten Anteil zwischen 0 % (TSL E und A) und 5 % (FLL E). Den größten Anteil der Isolate liegen im Test gegen TSL und FLL im intermediären Bereich während zwischen 56 % (OXA A) und 95 % (SMO E) der Isolate bei den Substanzen OXA und SMO im „resistenten“ Bereich liegen. Sowohl bei OXA als auch SMO ist ein leichter Rückgang des „resistente“ Anteils in Ausgangsproben zu sehen (Abbildung 17).

Staphylococcaceae wurden mit insgesamt 46 Isolaten (E 43n, A3 n) und der einzelnen Gattung *Staphylococcus* in die MHK-Testung eingesetzt. Klinische *breakpoints* liegen für die Substanzen OXA, ENR, TET, T/S und SMO vor (Tabelle A7). Die OXA-Testung zeigt als einzige einen Anstieg resistenter Isolate von 37% in Ausgangsproben was einer Erniedrigung der sensiblen Isolate von 67% im Eingang zu 33 % im Ausgang entspricht. Isolate der Ausgangsproben waren sowohl gegen ENR als auch T/S empfindlich während in Eingangsproben ein geringer Anteil (5 % ENR und 23 % T/S) resistenter Isolate zu finden war. Der Test gegen TET offenbarte keine resistenten Isolate. In Ausgangsproben konnte jedoch ein Anteil von 30 % nicht eindeutig als sensibel identifiziert werden. Der Grenzwert für Resistenzbestimmung gegen SMO liegt außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereichs. Es zeichnet sich jedoch ein leichter Anstieg sensibler Isolate von 26 % in Eingangs- zu 33 % in Ausgangsproben ab. Für die Substanzen AMX, TLS und FLL liegen keine *breakpoints* vor. Gegenüber aller drei Antibiotika ist ein Anstieg der Isolate im „resistenten“ Bereich in den Ausgangsproben festzustellen (Abbildung 17).

31 Isolate der Familie Acinetobacteriaceae (E: 26 n, A; 5 n) wurden mit den zwei Gattungen *Acinetobacter* (25N) und 6 *Psychrobacter* (6 n) in die MHK-Testung eingesetzt. Grenzwerte liegen für die Substanzen ENR, TET und T/S vor (Tabelle A7). Das Resistenzprofil ergibt ein sehr gleichförmiges Bild für alle verwendeten Antibiotika mit geringen Schwankungen zwischen Eingangs- und Ausgangsproben. Resistente Isolate bzw. solche, welche Wachstum auf der höchsten Konzentrationsstufe zeigen, bilden den geringsten Anteil zwischen 5 % und 20 % aller Isolate (Abbildung 17).

Pseudomonadaceae konnten mit insgesamt 44 Isolaten, die sich aus 32 Eingangs- und 12 Ausgangsisolaten zusammensetzen, in die MHK-Bestimmung eingesetzt werden. Keine Grenzwerte liegen für diese Familie vor. Ein Rückgang des Anteils von Isolaten mit Wachstum auf der höchsten Konzentrationsstufe ist für jedes Antibiotikum zu erkennen, Diese Rückläufigkeit bewegt sich zwischen 4 % (TLS) und 39 % (T/S). Kein Wachstum im „resistenten“ Bereich kann für Isolate in Ausgangsproben für die Substanzen ENR, TET, FLL und T/S ermittelt werden. Die Gruppen OXA-Eingang, und TLS-Eingang und Ausgang zeigen hingegen ausschließlich Isolate mit Wachstum auf der höchsten Konzentrationsstufe. Dennoch ist der Anteil „sensibler“ Isolate in allen Gruppen sehr gering und liegt zwischen 0 % (6 Gruppen) und 33 % (1 Gruppe). Ein marginaler Anstieg des „sensiblen“ Anteils, zwischen 3 % und 20 % kann gegenüber AMX, ENR, FLL und T/S gezeigt werden (Abbildung 17).

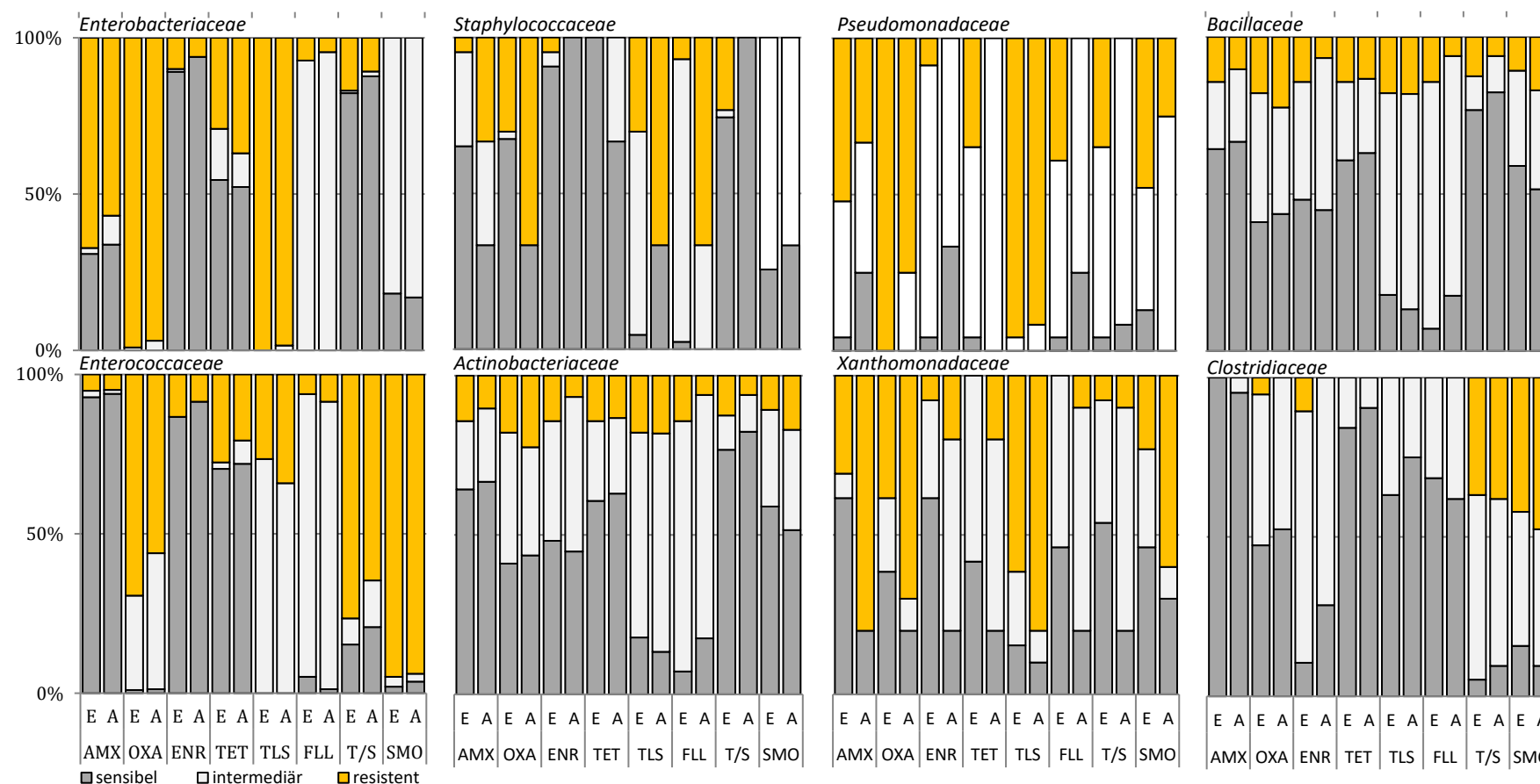


Abbildung 17 Antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung vorherrschender bakterieller Familien in Eingangs- (E) und Ausgangsproben (A) unter Angabe des Anteils resistenter, intermediärer- und empfindlicher Isolate in Bezug zu vorliegenden Grenzwerten. Empfindlichkeitsprüfungen wurden in Mikrotiterplatten mit relevanten Veterinärantibiotika in definierten Konzentrationsbereichen durchgeführt. Antibiotikakonzentration in mg/L: AMX: Amoxicillin (0,5-64), OXA: Oxacillin (0,25-32), ENR: Enrofloxacin (0,0625-8), TET: Tetracyclin (0,25-32), TLS: Tylosin (0,125 bis 16), FLL: Florfenicol (0,5-64), T/S: Trimethoprim / Sulfamethoxazol (0,0625 / 1,125 - 8/125) und SMO: Sulfamethoxazol (4-256). Grenzwerte zur Ermittlung resistenter und empfindlicher Isolate können Tabelle A7 im Anhang entnommen werden. Daten der Anlagen BGA1-BGA7 und BGA12 wurden am IAM (Justus-Liebig-Universität, Gießen) erhoben. (T Schauss et al. 2016)

Xanthomonadaceae wurden mit insgesamt 23 Isolaten (E13 n und A10 n) und zwei Gattungen (*Stenotrophomonas* 18 n, *Ignatzschineria* 5 n) in die MHK-Testung eingesetzt. Grenzwerte für diese Familie liegen nicht vor. Das Antibiotogramm dieser Familie zeigt ein wenig gleichmäßiges Bild mit bisweilen starken Unterschieden zwischen Eingangs- und Ausgangsproben. Ein Anstieg „resistenter“ Isolate aus Ausgangsproben sowie der Rückgang „sensibler“ Isolate kann für jedes der Antibiotika verzeichnet werden. Keine Isolate mit Wachstum auf der höchsten Konzentrationsstufe können für TET-Eingang und FLL-Eingang gefunden werden (Abbildung 17).

221 Isolate der Bacillaceae mit 56 Isolaten aus Eingangsproben und 165 Isolaten aus Ausgangsproben wurden betrachtet. Die häufigsten Gattungen sind *Bacillus* (195 n), *Lysinibacillus* (22 n) und *Oceanobacillus* (4 n). Das Antibiotogramm zeigt ein gleichmäßiges Bild mit minimalen Schwankungen zwischen Eingangs- und Ausgangsproben. Isolate mit Wachstum in „resistente“ Bereich der Antibiotikakonzentration stellen für jedes Antibiotikum den geringsten Anteil mit Werten zwischen 6,5 und 22 % dar. Für sechs der Antibiotika (AMX, OXA, ENR, TET, T/S und SMO) wird der Hauptanteil aus „sensiblen“ Isolaten gebildet während TLS und FLL den größten Anteil im intermediären Bereich haben (Abbildung 17).

Die Familien der Clostridiaceae konnte mit insgesamt 40 Isolaten bestehend aus 19 des Eingangs und 21 des Ausgangs in den MHK-Test eingesetzt werden. Für diese Familie liegen keine Grenzwerte vor. Nur gegen vier Antibiotika kann Wachstum auf der höchsten Konzentrationsstufe ermittelt werden. Zwischen 5 % und 11 % der Isolate aus Eingangsproben zeigen Wachstum im „resistenten“ Konzentrationsbereichs von OXA und ENR, „resistente“ Isolate beider Probenarten machen zwischen 40 % und 50 % der Isolate in dem Test von T/S und SMO aus. Gegenüber den anderen Substanzen machen Isolate des „sensiblen“ Konzentrationsbereichs zwischen 60 % (TLS, FLL) und 100 % (AMX) aus (Abbildung 17).

Der Großteil der Isolate aus den vorliegenden Umweltproben ist empfindlich gegenüber den getesteten Antibiotika mit einer tendenziellen Zunahme in Ausgangsproben. Auch Schlüsselbakterien wie Enterobacteriaceae und Enterococcaceae zeigen mit Ausnahme des Verhaltens gegenüber SMO vermehrt sensible Isolate zwischen 97 % und 90 %. Mangelnde Grenzwerte zur Bestimmung der Resistenz klinisch weniger relevanter Bakterien erschwert die Bewertung der Ergebnisse. Demnach kann zwar aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine Inaktivierung oder Eliminierung resistenter Bakterien durch die komplexen Prozessbedingungen in Biogasanlagen nicht bewiesen, die Akkumulation resistenter bzw. pathogener Organismen jedoch ausgeschlossen werden.

3.3.2 Vorkommen und Verbleib von Antibiotikaresistenzgenen in Umweltproben und auf Isolatebene

In DNA-Extraktionen aus Substrat und Gärrest von 15 Biogasanlagen wurden im *screening* 2012 12 Tetrazyklin- und drei Sulfonamidresistenzgene qualitativ nachgewiesen. Vier der Antibiotikaresistenzgene (ARG) können in keiner Probe nachgewiesen werden (*tetS*, *tetX*, *otrA* und *sul3*). Das ARG *tetW* tritt ubiquitär in jeder Probe auf während *tetM*, *sul1* und *sul2* in jeder Probe mit Ausnahme von BGA7E und *tetT* nur in BGA4A nicht nachgewiesen werden können. Die ARG *tetW*, *tetM*, *sul1*, *sul2*, *tetT* und *tetA* können demnach im Probenmaterial jeder Anlage amplifiziert werden. Mit Abnehmender Häufigkeit werden die ARG *tetQ* (22 Proben, 14 Anlagen), *tetO* (13 Proben, 11 Anlagen), *tetG* (18 Proben, 9 Anlagen), *tetC* (4 Proben, 4 Anlagen) und *tetB* (3 Proben, 3 Anlagen) nachgewiesen. Für die betrachteten Biogasanlagen ergibt sich ein variables Bild mit sieben (BGA9) bis zehn (BGA2, BGA3) unterschiedlichen ARG. Die häufigsten Resistenzgenfunde in Eingangs- und Ausgangsproben generieren jedoch in BGA1 (18 n), BGA8, BGA10 und BGA15 (17 n). Die niedrigsten Funde erfolgen in BGA7 (12 n), BGA4 und BGA9 (13 N). In vier BGA finden sich mehr ARG in Ausgangsproben. Drei der betreffenden BGA (BGA3, BGA9, BGA12) zeigen eine Zunahme von ein bis zwei zusätzlichen ARG im Gegensatz zum Spektrum der Eingangsproben während BGA8 ein anderes ARG-Spektrum im Ausgang aufweist.

Tabelle 22 Qualitativer Nachweis von Resistenzgenen in Screeningproben 2012.

Biogasanlagen	Substrat (E)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Tetrazyklinresistenzgene															
<i>tetA</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>tetB</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>tetC</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>tetG</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>tetS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetX</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetM</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetT</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetQ</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>tetW</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetO</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>otrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfonamidresistenzgene															
<i>sul1</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sul2</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sul3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biogasanlagen	Gärrest (A)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Tetrazyklinresistenzgene															
<i>tetA</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetC</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetG</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>tetS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetX</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>tetM</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetT</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetQ</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>tetW</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetO</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>otrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfonamidresistenzgene															
<i>sul1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sul2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sul3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Wiederum vier Anlagen zeigen eine Abnahme der ARG in Ausgangsproben. BGA2, BGA4 und BGA15 behalten einen Teil des ARG-Spektrum der Eingangsproben bei und BGA10 zeigt ein anderes Spektrum in Ausgangsproben. In BGA7 und BGA14 bleibt die Anzahl der ARG mit einem veränderten Spektrum in Ausgangsproben bestehen (Tabelle 22).

In 2013 konnten drei Biogasanlagen mit fünf Probenahmezeitpunkten über den Jahresgang begleitet werden. Die Analyse zeigte, dass von den im *screening* 2012 nicht detektierten ARG einzig *sul3* weiterhin nicht gefunden wird. Die häufigsten ARG sind *tetM* und *sul1*, die in jeder Probe amplifiziert werden konnten und wie im Screening die ARG *tetT*, *tetQ* und *tetW*. BGA1 zeigt zwischen 10-13 ARG in Eingangs- und 8-9 ARG in Ausgangsproben. Ausgangsproben weisen dasselbe ARG-Spektrum auf wie Eingangsproben mit einer Ausnahme für *tetB* in (13.4 BGA1A), das in der korrespondierenden Eingangsprobe nicht gefunden wird. BGA8 zeigt zwischen 7 und 12 ARG in Eingangs- und 9 bis 13 ARG in Ausgangsproben. Eine Spektrumsverschiebung findet jedoch nur von 13.2 BGA8E zu 13.3 BGA8A bei den ARG *tetG* und *sul2* statt. Zwischen 10 und 12 ARG in Eingangsproben und 8 bis 11 ARG in Ausgangsproben wurden in Material von BGA15 amplifiziert. Eingangs- und Ausgangspektren dieser Anlage sind gleichförmig, nur in 13.4 BGA15A ist ein ARG (*tetB*) zu finden, dass im zugehörigen Eingang nicht detektiert wird (Tabelle 23).

Tabelle 23 Qualitativer Nachweis von Resistenzgenen in Substrat und Gärrestproben des Jahresganges 2013.

Biogasanlagen	Substrat (E)										Gärrest (A)				
	BGA 1					BGA8					BGA15				
Probenahme	13.1	13.2	13.3	13.4	13.5	13.1	13.2	13.3	13.4	13.5	13.1	13.2	13.3	13.4	13.5
Tetrazyklinresistenzgene															
<i>tetA</i>	+	+	+	+		+	-	+	-		+	+	+	+	
<i>tetB</i>	+	+	-	+		-	-	-	+		-	+	-	+	
<i>tetC</i>	+	+	+	+		+	+	+	+		+	-	+	+	
<i>tetG</i>	+	+	-	+		+	+	+	+		+	+	-	+	
<i>tetS</i>	+	-	+	+		-	-	-	-		+	+	+	+	
<i>tetX</i>	-	-	+	+		-	-	+	+		+	-	-	-	
<i>tetM</i>	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	
<i>tetT</i>	+	+	+	+		+	+	+	+		+	-	+	+	
<i>tetQ</i>	+	-	+	+		+	-	+	+		+	+	+	+	
<i>tetW</i>	+	+	+	+		+	+	+	+		+	-	+	+	
<i>tetO</i>	+	-	+	+		+	-	+	+		+	+	+	+	
<i>otrA</i>	+	+	+	-		+	-	+	-		-	+	+	-	
Sulfonamidresistenzgene															
<i>sul1</i>	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	
<i>sul2</i>	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	
<i>sul3</i>	-	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	-	
Tetrazyklinresistenzgene															
<i>tetA</i>		+	+	-	+		+	+	-	+		+	+	+	+
<i>tetB</i>		-	-	+	-		-	-	+	+		-	-	+	-
<i>tetC</i>		+	+	-	-		+	+	+	+		-	+	-	-
<i>tetG</i>		+	-	+	+		+	-	+	+		+	-	+	+
<i>tetS</i>		-	-	-	-		-	-	-	+		+	-	+	+
<i>tetX</i>		-	-	-	+		-	-	-	+		-	-	-	+
<i>tetM</i>		+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+
<i>tetT</i>		+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+
<i>tetQ</i>		-	+	+	+		-	+	+	+		-	+	+	+
<i>tetW</i>		+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+
<i>tetO</i>		-	+	+	-		-	+	+	+		-	+	+	-
<i>otrA</i>		+	-	-	-		+	+	-	-		-	-	-	-
Sulfonamidresistenzgene															
<i>sul1</i>		+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+
<i>sul2</i>		+	-	+	+		+	-	+	+		+	-	+	+
<i>sul3</i>		-	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	-

Screening nach Tetrazyklin- und Sulfonamide-Resistenzgenen ausgewählter Isolate aus landwirtschaftlichen Abwässern

Insgesamt 66 Isolate der Enterobacteriaceae (56 n) mit den neun Gattungen Citrobacter, Escherichia, Hafnia, Morganella, Proteus, Providencia, Rahnella, Serratia und Yersinia und einer Gattung der Enterococcaceae (10 n), die zuvor im Antibiotogramm getestet wurden, wurden molekulargenetisch auf 12 Tetrazyklin- und drei Sulfonamidresistenzgene untersucht. Fünf der 14 Antibiotikaresistenzgene (*tetM*, *tetQ*, *tetO*, *otrA* und *sul2*) konnten in keinem Isolat detektiert werden. Isolate der Enterococcaceae wiesen zusätzlich die ARG *tetC*, *sul1* und *sul3* nicht auf. Isolate der Enterobacteriaceae zeigen zwei ARG weniger in Ausgangsproben (*tetW* und *sul3*) während Enterococcaceae ausschließlich *tetB* und *tetG* in Ausgangsproben zeigen und demnach fünf ARG weniger in Ausgangsproben aufweisen (Tabelle 24, Tabelle 25, Tabelle 26).

Die häufigsten ARG *tetT* und *tetA* können in 65 % bzw. 55 % aller Isolate gefunden werden. Ebenfalls häufig mit einer Detektion in 26 %-38 % der Isolate sind die ARG *tetB*, *tetC* und *tetX*. *TetG*, *tetS*, *tetW*, *sul1* und *sul3* kommen in 5 %-17 % aller Isolate vor (Tabelle 23, Tabelle 24, Tabelle 25). Bei separierter Betrachtung von Isolaten aus Eingangsproben ergibt sich ein ähnliches Bild. *TetT* (79 %) und *tetA* (68 %) sind die häufigsten ARG in Isolaten aus Eingangsproben. *TetB* (45 %), *tetC* (43 %) und *tetX* (47 %) können ebenfalls häufig in Isolaten aus Eingangsproben detektiert werden (Tabelle 24, Tabelle 25). In Ausgangsproben hingegen hat das ARG *tetG* mit 42 % der Isolate die größte Häufigkeit. Ebenfalls häufig in Isolaten des Ausgangs sind *tetT* mit 32 % und *tetA*, *tetC* und *sul1* mit 21 % (Tabelle 26).

Isolate der Enterobacteriaceae tragen zu 71 % *tetT*, zu 63 % *tetA*, zu 43 % *tetC* und *tetX* und *tetB* zu 39 % (Tabelle 24, Tabelle 25, Tabelle 26).

Enterococcaceae hingegen tragen zu 50 % *tetG*, 30 % *tetT*, 20 % *tetB* und 10 % der Isolate tragen die ARG *tetA*, *tetS*, *tetX* und *tetW* (Tabelle 25, Tabelle 26).

In 90 % aller Isolate kann ein Tetrazyklinresistenzgen nachgewiesen werden. 63 % dieser Isolate zeigen sich im Antibiotogramm empfindlich gegenüber Tetrazyklin. 82 % der Isolate tragen kein Sulfonamidresistenzgen, während nur 10 % eine Empfindlichkeit gegenüber SMO im Antibiotogramm aufweisen (Tabelle 24, Tabelle 25, Tabelle 26).

Insgesamt sechs Isolate (E:3 n und A:3 n) tragen keins der untersuchten ARG. Vier dieser Isolate sind Enterobacteriaceae und zwei gehören der Gattung Enterococcaceae an. Drei dieser Isolate zeigen Resistenzen gegenüber TET und T/S im Antibiotogramm. Enterococcus (BGA10A) und Providencia (BGA8A) zeigten eine Resistenz gegenüber TET und Enterococcus (BGA10A) ist unempfindlich gegenüber T/S. Weitere vier Isolate prägen eine Resistenz gegen T/S aus und tragen keins der untersuchten ARG (Tabelle 24, Tabelle 25, Tabelle 26).

Durchschnittlich tragen Isolate aus Eingangsproben 3,2 ARG und Isolate aus Ausgangsproben 1,8 ARG. Zwei der 66 Isolate haben die höchste Dichte mit je sechs ARG in BGA8E Enterococcus (*tetA*, *tetB*, *tetG*, *tetX*, *tetT* und *tetW*) und BGA8A Serratia (*tetB*, *tetC*, *tetG*, *tetS*, *tetX* und *sul1*). Der überwiegende Teil mit 42 % aller Isolate trägt zwei oder vier ARG. Isolate der Enterobacteriaceae zeigen im Mittel drei ARG (Eingang: 3,2 ARG/ Isolat, Ausgang: 2,3 ARG/Isolat) und Enterococcaceae durchschnittlich 1,4 ARG (Eingang: 2,5 ARG/ Isolat, Ausgang 0,6 ARG/Isolat) (Tabelle 24, Tabelle 25, Tabelle 26).

Tabelle 24 Qualitativer Nachweis von 12 Tetrazyklin- und 3 Sulfonamidresistenzgenen in 43 Isolaten der Familie der Enterobacteriaceae aus Eingangsproben der Biogasanlagen BGA8, BGA9, BGA10 und BGA11.

BGA	Familie	Isolat	Resistenzgene												Antibiogramm					
			tetA	tetB	tetC	tetG	tetS	tetX	tetM	tetT	tetQ	tetW	tetO	otrA	su/1	su/2	su/3	TET	T/S	SMO
9	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
11		<i>Citrobacter braakii</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
8		<i>Citrobacter braakii</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	S	S	S
8		<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
8		<i>Citrobacter spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
8		<i>Citrobacter spp.</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
9		<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S
8		<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S
9		<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
9		<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
10		<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	R	S	I
8		<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
8		<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
8		<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
8		<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
8		<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	R	I
8		<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
8		<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
9		<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	S	S	I
9		<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
10		<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
11		<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	S	S	I
11		<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
11		<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
9		<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S
8		<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S
11		<i>Morganella morganii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S
9		<i>Proteus hauseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
10		<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
11		<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	R	R	I
11		<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	S	R	I
9		<i>Providencia heimbachae</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	R	R	I
9		<i>Rahnella aquatilis</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	S	S	I
8		<i>Serratia fonticola</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
9		<i>Serratia fonticola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
9		<i>Serratia fonticola</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
10		<i>Serratia fonticola</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
10		<i>Serratia fonticola</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
10		<i>Serratia fonticola</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I

Tabelle 24 fortgesetzt.

BGA	Familie	Isolat	Resistenzgene												Antibiogramm					
			tetA	tetB	tetC	tetG	tetS	tetX	tetM	tetT	tetQ	tetW	tetO	otrA	sul1	sul2	sul3	TET	T/S	SMO
10	Enterobacteriaceae	<i>Serratia fonticola</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
9		<i>Serratia fonticola</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
8		<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	S	S	I
9		<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	S	S	I

Tabelle 25 Qualitativer Nachweis von 12 Tetrazyklin- und 3 Sulfonamidresistenzgenen in 4 Isolaten der Familie der Enterococcaceae aus Eingangsproben der Biogasanlage BGA8.

BGA	Familie	Isolat	Resistenzgene												Antibiogramm					
			tetA	tetB	tetC	tetG	tetS	tetX	tetM	tetT	tetQ	tetW	tetO	otrA	sul1	sul2	sul3	TET	T/S	SMO
8	Enterococ- caceae	Enterococcus faecalis	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	S	S	I
8		Enterococcus hirae	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
8		Enterococcus hirae	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	S	S	I
8		Enterococcus pseudoavium	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I

Tabelle 26 Qualitativer Nachweis von 12 Tetrazyklin- und 3 Sulfonamidresistenzgenen in 19 Isolaten der Familie der Enterobacteriaceae und Enterococcaceae aus Ausgangsproben der Biogasanlagen BGA8, BGA9 und BGA10.

BGA	Familie	Isolat	Resistenzgene												Antibiogramm					
			tetA	tetB	tetC	tetG	tetS	tetX	tetM	tetT	tetQ	tetW	tetO	otrA	sul1	sul2	sul3	TET	T/S	SMO
8	Enterobacteriaceae	Citrobacter freundii	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
8		Citrobacter spp.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	I	S	S
8		Hafnia alvei	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
8		Hafnia alvei	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
9		Proteus mirabilis	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
8		Proteus mirabilis	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
9		Proteus mirabilis	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	S	S	I
9		Proteus mirabilis	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	S	S	I
9		Proteus mirabilis	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	S	S	I
8		Proteus vulgaris	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
8		Providencia heimbachae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
8		Serratia fonticola	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
8		Serratia proteamaculans	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	S	S	I
10	Enterococcaceae	Enterococcus asini	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	R	I
10		Enterococcus asini	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	R	I
10		Enterococcus faecalis	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I
10		Enterococcus faecalis	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	I
10		Enterococcus faecium	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	I
10		Enterococcus pseudoavium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S	I

Screening nach Tetrazyklin- und Sulfonamide-Resistenzgenen ausgewählter Isolate aus Proben der Fermenterstudie

Im Rahmen der Fermenterstudie konnten 62 Isolate aus drei Labormaßstabsfermentern von Selektivmedien isoliert werden. 23 Isolate stammen aus Fermenter 1 (Phase1: 12 n, Phase2: 11 n), 20 aus Fermenter 2 (Phase1: 6 n, Phase2: 14 n) und 19 aus Fermenter 3 (Phase1: 10 n, Phase2: 9 n). 58 der Isolate gehören der Familie Enterococcaceae und vier Isolate der Familie Enterobacteriaceae. Der genetische Nachweis von 12 Tetrazyklin- und drei Sulfonamidresistenzgenen ist im Folgenden dargestellt. Die sechs ARG *tetS*, *tetX*, *tetQ*, *tetW*, *tetO* und *otrA* können in keinem der Isolate nachgewiesen werden. Durchschnittlich tragen Isolate 0,8 ARG. 21 % der Isolate tragen das häufigste ARG *tetT*. Ebenfalls häufig treten *tetB* und *tetC* in 13 % der Isolate auf (Tabelle 27, Tabelle 28). 48 % der Isolate tragen keins der untersuchten ARG, 32 % tragen ein ARG, und 12 % zwei ARG. In einem einzigen Isolat (Enterococcus F1, Phase2) kann ein Maximum von fünf ARG nachgewiesen werden (Tabelle 28).

Die separate Betrachtung der drei Fermenter zeigt Ähnlichkeiten zwischen dem Kontrollfermenter (Fermenter 1) und den Antibiotika-dotierten Fermentern 2 (tägl. Zugabe: 24mg Sulfadiazin, 24 mg Sulfamethazin, 2,5 mg Trimethoprim) und 3 (tägl. Zugabe: 14,4 mg Chlortetrazyklin, 14,4 mg Tetrazyklin). In jedem der Fermenter wurden zehn Isolate gewonnen, die keins der untersuchten ARG tragen. 56 % der Isolate in Fermenter 1, 25 % in Fermenter 2 und 52 % in Fermenter 3 tragen Tetrazyklinresistenzgene. Sulfonamidresistenzgene werden in 17 % der Isolate aus Fermenter 1, 10 % aus Fermenter 2 und 16 % aus Fermenter 3 detektiert. *TetT* tritt als häufigstes ARG in Fermentern 2 und 3 auf während Isolate des Kontrollfermenters vermehrt *tetM* aufweisen. Durchschnittlich tragen Isolate 0,78 ARG in Fermenter1, 0,75 ARG in Fermenter 2 und 0,89 ARG in Fermenter 3 (Tabelle 27, Tabelle 28).

Beider vergleichenden Betrachtung der Versuchsphasen (Phase 1: tägl. Antibiotikazugabe und Phase 2: keine Antibiotikazugabe) wird eine Zunahme der ARG-Funde, ARG-tragender Isolate und des ARG-Spektrums zu Phase 2 in Isolaten der Fermenter 2 und 3 deutlich. Sowohl ARG-Funde, ARG-tragende Isolate und das Spektrum nachgewiesener ARG ist in Phase 1 im Kontrollfermenter höher als den übrigen Fermentern, nimmt jedoch über den Versuchszeitraum leicht ab. Fermenter 2 zeigt eine Zunahme der ARG-Funde um den Faktor vier, eine 2,6-fache Zunahme ARG-tragender Isolate und eine Erweiterung des ARG-Spektrums um den Faktor 2. ARG-Funde in Fermenter 3 sind in Versuchsphase 2 verdoppelt, während ARG-tragende Isolate und das Spektrum der ARG um die Faktoren 1,6 und 1,4 zunimmt (Tabelle 27, Tabelle 28).

Tabelle 27 Qualitativer Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in 28 Isolaten der Familie der Enterobacteriaceae und Enterococcaceae aus Fermenter 1-3 der Fermenterstudie 2013 unter Zugabe von Antibiotika.

Phase	Fermenter	Familie	Isolat	Resistenzgene												sul1	sul2	sul3			
				tetA	tetB	tetC	tetG	tetS	tetX	tetM	tetT	tetQ	tetW	tetO	otrA						
Antibiotika-Zugabe (Versuchstage 1-30)	Fermenter 1	Enterococcaceae	Enterococcus durans	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			Enterococcus durans	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus hirae	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus hirae	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus spp	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus spp	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fermenter 2	Enterococcaceae	Citrobacter spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Fermenter 3	Enterococcaceae	Citrobacter spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Proetus vulgaris	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus hirae	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Die kultivierungsunabhängige Erfassung von Tetrazyklinresistenzgenen zeigt ein ubiquitäres Vorkommen in allen Anlagen ohne Einfluss von Betriebsbedingungen, saisonalen Schwankungen oder der Anlagenpassage. In Schlüsselorganismen der Enterobacteriaceae und Enterococcaceae hingegen finden die Resistenzmarker nur wenig Verbreitung selbst unter Applikation spezifischer Antibiotika in der Fermenterstudie und eine reduzierende Wirkung der Resistenzgene durch den Fermentationsprozess ist erkennbar.

Tabelle 28 Qualitativer Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in 34 Isolaten der Familie der Enterobacteriaceae und Enterococcaceae aus Fermenter 1-3 der Fermenterstudie 2013 nach Zugabe von Antibiotika.

Phase	Fermenter	Familie	Isolat	Resistenzgene													sul1	sul2	sul3	
				tetA	tetB	tetC	tetG	tetS	tetX	tetM	tetT	tetQ	tetW	tetO	otrA					
Ohne Antibiotika-Zugabe (Versuchstage 30-60)	Fermenter 1	Citrobacter koseri		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
			Escherichia coli	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
		Enterococcaceae	Enterococcus durans	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus hirae	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus saccharolaticus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fermenter 2	Citrobacter koseri		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Citrobacter koseri	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
			Citrobacter koseri	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Escherichia coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Enterococcaceae	Enterococcus durans	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus hirae	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
			Enterococcus hirae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Enterococcus spp.		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Enterococcus spp.		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Fermenter 3	Enterococcaceae	Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus faecium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Enterococcus hirae	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
			Enterococcus hirae	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Enterococcus spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.4 ERMITTLUNG DES EINFLUSSES BIOTECHNOLOGISCHER VERFAHREN AUF DAS VORKOMMEN UND DIE PERSISTENZ VON ANTIBIOTIKARESISTENZGENEN IN LANDWIRTSCHAFTLICHEN ABWÄSERN



Abbildung 18 Übersicht des methodischen Ablaufs und der verwendeten Testverfahren zur mikrobiologischen Charakterisierung landwirtschaftlicher Abwasserproben.

Langwierige und materialaufwändige mikrobiologische Methoden sind nötig um die Gefährdung durch resistente Pathogene auf klinischer Ebene aufzuklären. Die molekularbiologische Erfassung und Quantifizierung von Antibiotikaresistenzgenen zur Bewertung der umweltrelevanten Beschaffenheit einer Abwasserprobe stellt eine zügige und ökonomische Alternative dar. Derzeit ermöglicht diese Methode die Darstellung eines sensiblen Trends, dem der methodische und zeitliche Aufwand kultivierungsabhängiger Verfahren fehlt.

Die Quantifizierung von drei Tetrazyklinresistenzgenen (*tetA*, *tetM* und *tetO*) und einem Sulfonamidresistenzgen (*sul2*), die in qualitativen Analysen zuvor ubiquitär bis häufig detektiert werden konnten, in sowohl Proben des *screenings* 2012 als auch des Jahresgangs 2013 und der Fermenterstudie demonstrieren das Niveau von Resistenzgenen in landwirtschaftlichen Abwässern sowie den Einfluss von Antibiotika, Schwermetallen und intensiven Abwasserbehandlungsmethoden (Abbildung 18).

3.4.1 Labormaßstabsversuche zur mikrobiologischen Populationsverschiebung sowie Entwicklung und Persistenz von Antibiotikaresistenzgenen über den Prozess der Biogasproduktion

In einer Fermenterstudie wurden drei kontinuierliche Durchflussfermenter unter definierter Zugabe von Antibiotika (AB) in den ersten 30 Versuchstagen, in zwei der Fermenter gegenüber eines Kontrollfermenters über einen Gesamtzeitraum von 60 Tagen untersucht. Die tägliche Substratzugabe der Durchflussfermenter setzte sich zusammen aus einer Mischung von Rindergülle (von BGA15 oder BGA14 bezogen) und Maissilage (Abbildung 9). Betrachtet wurde der Einfluss hoher Antibiotikagaben über einen kurzen Zeitraum auf das Vorkommen und die Quantität von Resistenzgenen sowie auf das Wachstum kultivierbarer Schlüsselorganismen mit besonderem Augenmerk auf die Wirkung einer biotechnologischen Barriere zur Verminderung dieser bakteriellen Kontaminanten.

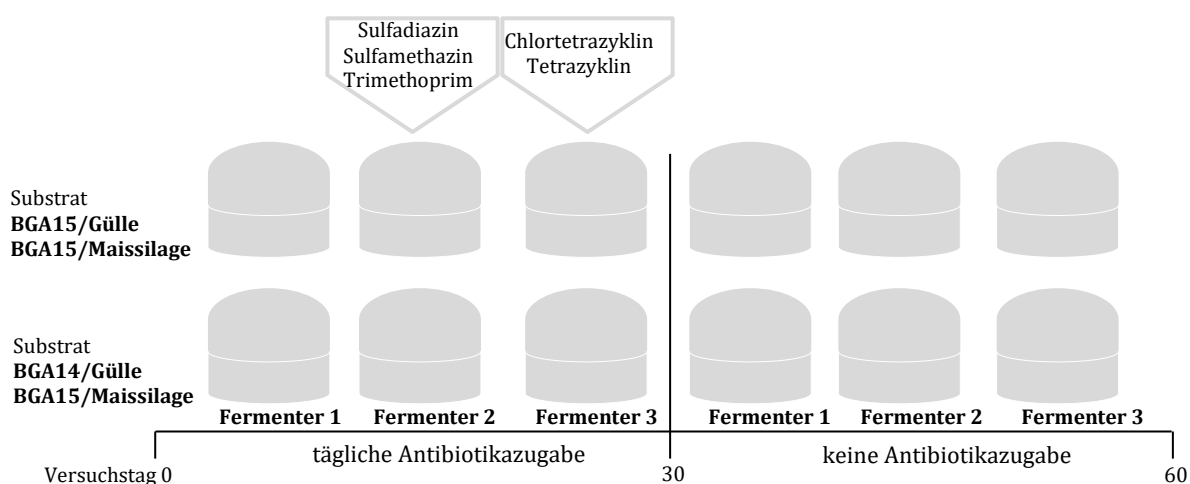


Abbildung 19 Schematische Darstellung des Versuchablaufs einer Durchflussfermenter-Studie im Labormaßstab. In kontinuierlichen Durchflussfermentern wurde der Effekt einer definierten Zugabe von Antibiotika (AB) über einen Zeitraum von 60 Tagen auf die Fermenterbiologie untersucht. Hierzu wurden zwei Fermenter in der ersten Versuchsphase (29 Tage) mit täglicher Antibiotikazugabe (Fermenter 2: 24 mg Sulfadiazin, 24 mg Sulfamethazin, 2,5 mg Trimethoprim; Fermenter 3: 14,4 mg Chlortetrazyklin, 14,4 mg Tetrazyklin) einem Kontrollfermenter (Fermenter 1) ohne Antibiotikazugabe gegenüber gestellt gefolgt von einer zweiten Versuchsphase ohne Antibiotikazugabe. Die tägliche Fütterung der Durchflussfermenter setzte sich zusammen aus einer Mischung von Rindergülle (von BGA15 oder BGA14 bezogen) und Maissilage (Verhältnis 1 zu 3 bezogen auf oTS).

Der Qualitative Nachweis von 12 Tetrazyklin- und drei Sulfonamidresistenzgenen zeigt ein ubiquitäres Vorkommen der ARG im genetischen Material aus Umweltproben (Tabelle 29). Die Fermenter 1-3 weisen in der qualitativen Analyse gleichmäßige ARG-Muster auf. Mit Ausnahme

von *sul3* werden alle ARG im Versuchsablauf amplifiziert. Die ARG *tetA*, *tetG*, *tetS*, *tetT*, *tetW*, *tetO*, *otrA* und *sul1* sind in allen Versuchsproben nachweisbar. Ein unterschiedliches Nachweismuster zeigt sich nicht zwischen Fermenter 1-3, sondern zwischen den beiden Versuchsansätzen mit Substrat aus BGA15 und BGA14. Die Beschickung mit Substrat aus BGA15 ermöglicht den Nachweis aller ARG mit Ausnahme von *tetX* und *sul3* in allen Versuchsproben. Nur *tetC* und *tetQ* werden in Einzelproben nicht isoliert. Die Untersuchung von Proben mit Substrat aus BGA14 ermöglicht den Nachweis aller ARG mit Ausschluss von *sul3*. *TetB*, *tetC*, *tetM* und *tetQ* werden in den drei Fermentern nur in Proben fortgeschrittener Versuchstage (40 d und 60 d) nachgewiesen. *TetX* hingegen nur in Proben der Versuchstage 12 d und 33 d (Tabelle 29).

Tabelle 29 Qualitative Bestimmung der Resistenzgene in Proben der Fermenterstudien mit Substrat aus BGA14 und BGA15.

Versuchstage	BGA 15											
	Fermenter 1				Fermenter 2				Fermenter 3			
	12	33	40	60	12	33	40	60	12	33	40	60
Tetrazyklinresistenzgene												
<i>tetA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetC</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>tetG</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetS</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetX</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetM</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>tetT</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetQ</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>tetW</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetO</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>otrA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sulfonamidresistenzgene												
<i>sul1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sul2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sul3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGA14												
Tetrazyklinresistenzgene												
<i>tetA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetB</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>tetC</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>tetG</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetS</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetX</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>tetM</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>tetT</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetQ</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>tetW</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tetO</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>otrA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sulfonamidresistenzgene												
<i>sul1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sul2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sul3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Eine quantitative Analyse der ARG *tetA*, *tetM*, *tetO* und *sul2* in drei Labormaßstabsfermentern mit unterschiedlicher Antibiotikadotierung soll eine deutlichere Darstellung der Folge von Antibiotikagaben auf die Distribution und Persistenz von ARG geben. Die Auswahl der ARG erfolgte auf Grundlage ihres ubiquitären Vorkommens in qualitativen Untersuchungen in den Abschnitten 3.3.2 und 3.4.1 und zur Einbezugnahme der prävalenten Tetrazyklinresistenz-vermittelnden Mechanismen, Efflux-Pumpe und RPP, sowie eines Sulfonamidresistenz-vermittelnden Gens. Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen im linken Darstellungsbereich Kopienzahlen der vier quantitativ untersuchten Resistenzgene in den Fermentern 1-3 über den Versuchszeitraum von ca. 60 Tagen mit Substraten der BGA15 (Abbildung 20) und BGA14 (Abbildung 21).

Die Kopienzahlen aller ARG liegen in einem Bereich zwischen $2,1 \times 10^{11}$ (BGA15-*tetO*-F1-29 d) und $5,5 \times 10^{13}$ (BGA15-*sul2*-F2-43d) Kopien pro kg Trockengewicht (K/ kg TS). Eine Zunahme der Kopien über den Versuchsverlauf aller ARG kann in jedem der Fermenter festgestellt werden. Durchschnittlich sind die Kopien in der zweiten Versuchshälfte um den Faktor 2,5 (F1) bis 3,2 (F2) erhöht. Im Durchschnitt treten die höchsten Kopienzahlen in Fermenter 3 ($4,9 \times 10^{12}$ K/ kg TS) und die niedrigsten in Fermenter 1 ($3,2 \times 10^{12}$ K/ kg TS) auf (Abbildung 20, Abbildung 21).

Kopienzahlen der untersuchten ARG bewegen sich in einem eingeschränkten Bereich mit geringen Abweichungen zwischen ARG, Fermenter und dem Versuchsverlauf. *Sul2* ist das kopienstärkste ARG mit durchschnittlich $8,7 \times 10^{12}$ K/ kg TS und der deutlichsten Zunahme der betrachteten ARG in der zweiten Versuchsphase um den Faktor 4,2 in Fermenter 1, 4,3 in Fermenter 2 und 3,0 in Fermenter 3. Das ARG *tetM* tritt mit durchschnittlich $5,5 \times 10^{12}$ K/ kg TS (F1: $3,7 \times 10^{12}$ K/ kg TS, F2: $5,7 \times 10^{12}$ K/ kg TS, F3: $7,1 \times 10^{12}$ K/ kg TS) auf mit einer Zunahme in der zweiten Versuchsphase um den Faktor 1,8 in Fermenter 1 bis 3,4 in Fermenter 2. *TetO* kann mit einer mittleren Kopienzahl von $1,8 \times 10^{12}$ K/ kg TS in allen Fermentern nachgewiesen werden. Die höchsten Kopienzahlen werden in Fermenter 2 in der zweiten Versuchsphase mit $3,2 \times 10^{12}$ K/ kg TS erreicht. Die niedrigsten Kopienzahlen sowohl vor als auch nach dem Phasenwechsel sowie auch die deutlichste Zunahme der Kopienzahlen ist in Fermenter 1 mit einer Zunahme um den Faktor 3,5 zu sehen. Das kopien schwächste ARG *tetA* mit durchschnittlich $1,7 \times 10^{12}$ K/ kg TS zeigt maximale Kopienzahlen in der zweiten Versuchsphase der Fermenter 2 und 3 mit der deutlichsten Zunahme um den Faktor 2,5 in Fermenter 2 (Abbildung 20, Abbildung 21).

Im Vergleich der zwei Versuchsansätze mit Substraten der BGA14 und BGA15 stellen sich Unterschiede zwischen den Substraten heraus. Kopienzahlen der ARG im Versuch mit Substrat der BGA14 liegen im Bereich von $2,4 \times 10^{11}$ K/ kg TS (BGA14-*tetA*-F2-29d) bis maximal $9,2 \times 10^{12}$ K/ kg TS (BGA14-*tetM*-F2-57d) mit einer durchschnittlichen Kopienzahl aller ARG von $1,8 \times 10^{12}$ K/ kg TS (Abbildung 20, Abbildung 21). Im Versuch mit Substrat von BGA15 liegen Kopienzahlen höher bei durchschnittlich bei $6,3 \times 10^{12}$ K/ kg TS in einem Bereich von $2,1 \times 10^{11}$ K/ kg TS ((BGA15-*tetO*-F1-29d) bis $5,5 \times 10^{13}$ K/ kg TS (BGA15-*sul2*-F2-43d). Mit Ausnahme der Ergebnisse von *tetO* liegen die Kopienzahlen aller Gene in den Fermentern, dotiert mit Substrat der BGA15, deutlich höher als die der BGA14. Am deutlichsten wird dies bei *sul2*, das durchschnittlich um den Faktor 11,2 mehr in Versuchsproben von BGA15 amplifiziert werden kann. Weniger deutlich ist diese Divergenz mit den Faktoren 2,5 für *tetA* und 2,8 für *tetM* (Abbildung 20, Abbildung 21).

Kolonie bildende Einheiten der Schlüsselorganismen Enterobacteriaceae (MC), Enterococcaceae (S&B) und anaerobe Sporenbildner (ColSB) wurden erstellt um den Einfluss hoher Antibiotikagaben auf die kultivierbare Fermenterbiologie, insbesondere das Wachstum klinisch relevanter Bakterien, zu erfassen. Kolonie-bildende Einheiten der Enterobacteriaceae liegen im Bereich von $9,5 \times 10^6$ bis $9,3 \times 10^9$ KBE/ g TS. Die durchschnittliche KBE der Laborfermenter liegt am höchsten in Fermenter 2 mit 2×10^9 KBE/ g TS gefolgt von $8,7 \times 10^8$ KBE/ g TS in Fermenter 1 und $8,2 \times 10^8$ KBE/ g TS in Fermenter 3. Die Analyse aller Fermenter zeigt im Mittel ein größeres Wachstum vor dem Phasenwechsel.

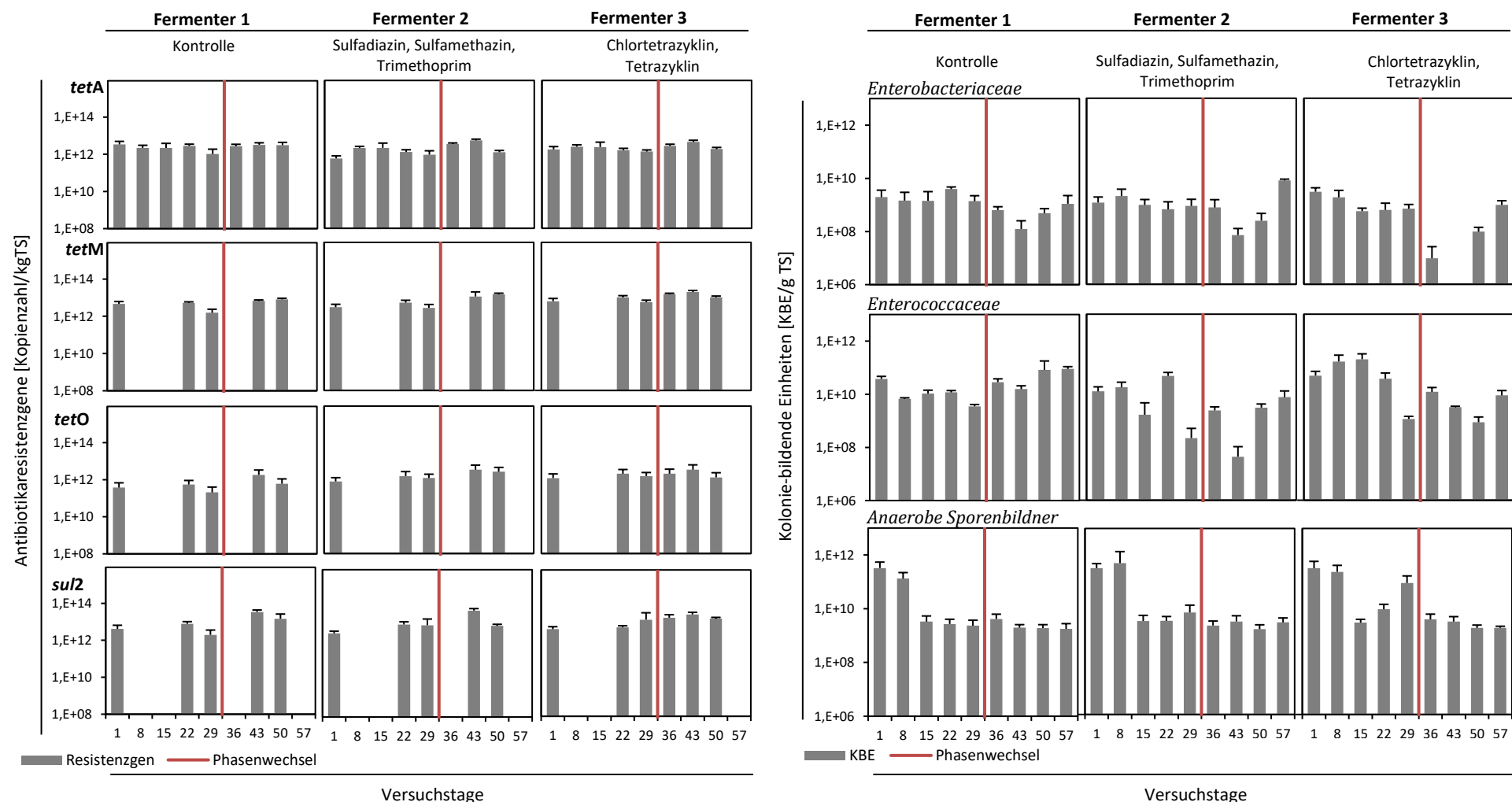


Abbildung 20 Quantitative Erfassung von Antibiotikaresistenzgenen (*tetA*, *tetM*, *tetO*, *sul2*) und KBE in einer Fermenterstudie über einen Zeitraum von 60 Tagen, mit und ohne Zugabe von Antibiotika, mit Substrat aus BGA15. Neben einem Kontrollfermenter (Fermenter 1) wurden Fermenter 2 (tägliche Zugabe: 24mg Sulfadiazin, 24 mg Sulfamethazin, 2,5 mg Trimethoprim) und Fermenter 3 (tägliche Zugabe: 14,4mg Chlortetracyclin, 14,4mg Tetracyclin) für die erste Versuchsphase von 29 Tagen mit verschiedenen Antibiotikakombinationen versetzt, gefolgt von einer eben so langen Auswaschphase ohne Antibiotikazugabe. ARG wurden quantifiziert über quantitative Real Time PCR gegen einen absoluten Plasmidstandard mit fünf definierten Konzentrationsstufen im Triplikate. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen DNA-Extraktionen im Triplikate mit 3 Verdünnungsstufen die wiederum im Triplikate aufgetragen wurden. Kolonie-bildende Einheiten sind abgebildet als Mittelwerte und Standardabweichung von trinlikater Ausplattierung über multiple Verdünnungsstufen.

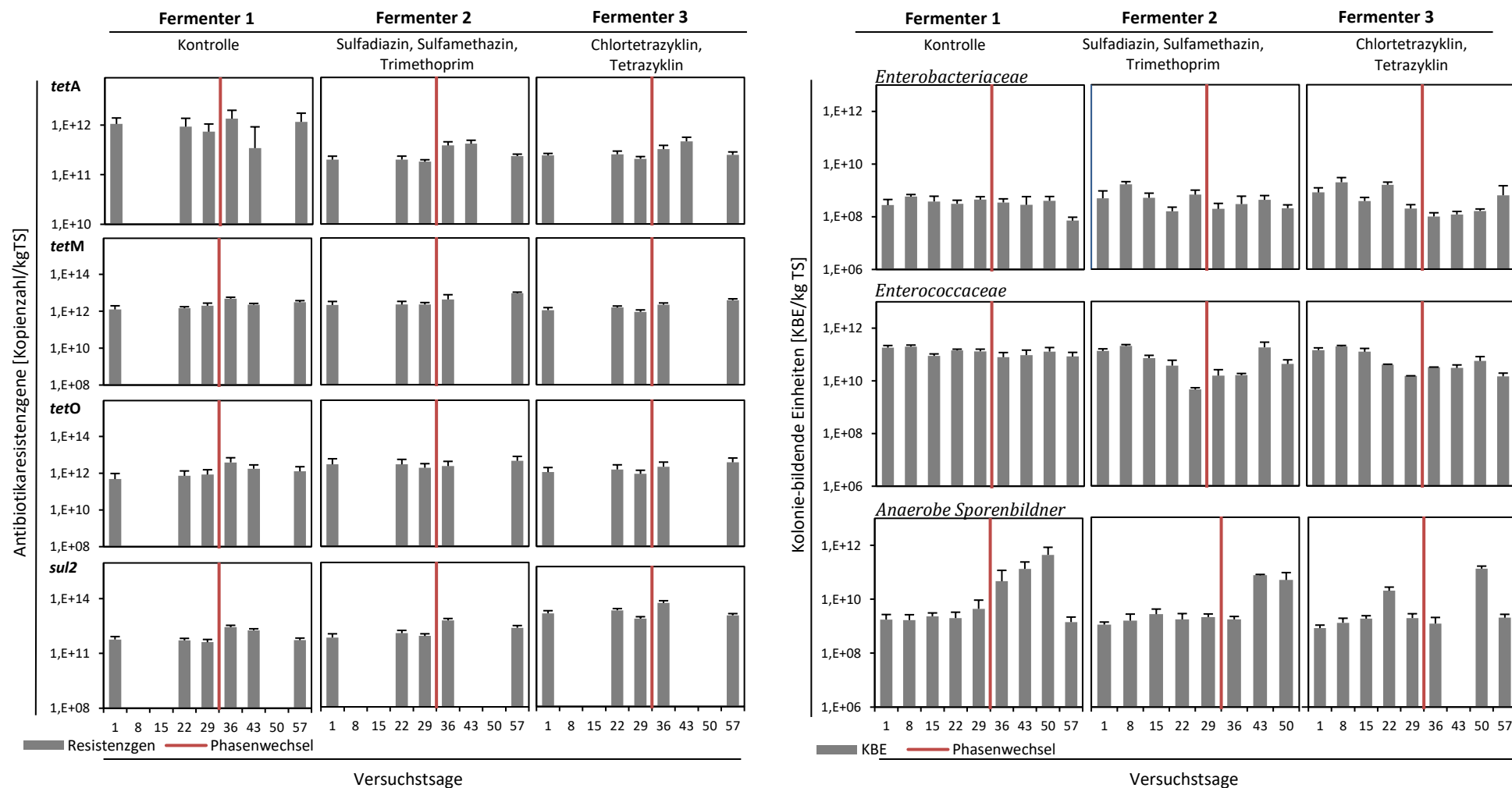


Abbildung 21 Quantitative Erfassung von Antibiotikaresistenzgenen (*tetA*, *tetM*, *tetO*, *sul2*) und KBE in einer Fermenterstudie über einen Zeitraum von 60 Tagen, mit und ohne Zugabe von Antibiotika, mit Substrat aus BGA14.

Die stärkste Abnahme um den Faktor 4,1 findet in Fermenter 3 statt, geringere Erniedrigungen der KBE zeigen Fermenter 2 um den Faktor 2,7 und Fermenter 1 um 2,2. Ergebnisse des Versuchs mit Substrat der BGA15 zeigen in allen Fermentern eine höhere KBE als in der BGA14. Dieser Unterschied spannt sich von über einer Größenordnung in Fermenter 1 und 2 bis zu einem marginalen Unterschied um den Faktor 1,5 in Fermenter 3.

Wie zuvor in der Gesamtbetrachtung der Enterobacteriaceae zeigt auch die separierte Analyse der Versuche mit unterschiedlichem Substrat ein durchschnittlich geringeres Wachstum in der zweiten Versuchsphase. Am stärksten ausgeprägt ist dieses Gefälle der KBE für Versuche beider Substrate in Fermenter 3 mit einem Rückgang im Bereich einer Größenordnung (Abbildung 20 Abbildung 21).

Das Wachstum der Enterococcaceae liegt im Bereich von $8,6 \times 10^8$ bis $2,2 \times 10^{11}$ KBE/ g TS mit einer durchschnittlichen KBE von $7,9 \times 10^{10}$ KBE/ g TS in Fermenter 1, $7,0 \times 10^{10}$ KBE/ g TS in Fermenter 2 und $6,3 \times 10^{10}$ KBE/ g TS in Fermenter 3. Ein Gefälle der Bakteriendichte zwischen erster und zweiter Versuchsphase ist in jedem der Fermenter nachzuvollziehen. Die deutlichste Abnahme um eine Größenordnung findet in Fermenter 3 und 2 statt. Der Vergleich der Versuche mit unterschiedlichen Substraten zeigt ein höhere Bakteriendichte in BGA14 bei Betrachtung der Enterococcaceae. Am ausgeprägtesten ist dies in Proben der Fermenter 1 zu erkennen, hier ist die durchschnittliche KBE um eine Größenordnung höher. In allen Proben mit Ausnahme von BGA15 Fermenter 1 ist ein deutlicher Rückgang der Enterococcaceae in der zweiten Versuchsphase erkennbar. Die ausgeprägteste Reduktion um drei Größenordnungen tritt in Fermenter 3 mit Substrat der BGA15 auf (Abbildung 20, Abbildung 21).

Anaerobe Sporenbildner liegen im Bereich von $8,2 \times 10^8$ bis $5,0 \times 10^{11}$ KBE/ g TS. Die durchschnittliche KBE schwankt nur leicht zwischen dem maximalen Wert $6,2 \times 10^{10}$ KBE/ g TS in Fermenter 1, $5,4 \times 10^{10}$ KBE/ g TS in Fermenter 2 und dem Minimum $4,8 \times 10^{10}$ KBE/ g TS in Fermenter 3. Die Abnahme der Sporenbildner über den Versuchsverlauf ist in jedem Fermenter zu sehen und liegt im Bereich einer Größenordnung. Die stärkste Ausprägung erfährt dies in Fermenter 2 gefolgt von Fermenter 3. Die durchschnittliche KBE der Sporenbildner in Versuchsansätzen mit unterschiedlichem Substrat zeigt erhöhte Werte im Versuch mit BGA15 in den Fermentern 2 und 3. Fermenter 1 hingegen zeigt eine höhere Dichte im Versuch mit Substrat der BGA14. In allen Fermentern mit Substrat der BGA14 tritt eine um eine Größenordnung erhöhte durchschnittliche KBE in der zweiten Versuchsphase auf, während der Versuch mit Substrat der BGA15 eine KBE mit zwei bis drei Größenordnungen niedriger in der zweiten Versuchsphase ausweist (Abbildung 20, Abbildung 21).

Die Fermenterstudie zeigt im Mittel ein vermindertes Wachstum der Schlüsselbakterien Enterobacteriaceae, Enterococcaceae und anaeroben Sporenbildnern über die Zeit des Versuchs und darüber hinaus eine verstärkte Wachstumshemmung in Fermentern mit Tetracyclin-Beigabe. Der Qualitative Resistenzgennachweis zeigt ein ubiquitäres Vorkommen der ARG in allen Versuchsansätzen mit minimalen Abweichungen aufgrund des Substrateinsatzes von BGA14 bzw. BGA15, während eine Zunahme der ARG-Kopien über den Versuchsverlauf sowohl in dotierten als auch dem Kontrollfermenter auftritt.

3.4.2 Quantitative Erfassung von Antibiotikaresistenzgenen in Substrat und Gärrest deutscher Biogasanlagen

Die quantitative Bestimmung von vier ARG in fünfzehn realen Biogasanlagen im *screening* 2012 und drei Anlagen über den Jahresgang 2013 ermöglicht die kultivierungsunabhängige Erfassung von ARG über ein weites Spektrum an Anlagensystemen, Substraten und eines zeitlichen Verlaufs von 12 Monaten sowie die Aufklärung des Rückhaltungs- bzw. Eliminierungspotentials des Fermentationsprozesses für ARG.

Deutschlandweites *screening* von Biogasanlagen zur Evaluierung des Prozesseinflusses auf den Verbleib von Antibiotikaresistenzgenen

Ein stichprobenhaftes *screening* von Substrat und Gärrest 15 deutscher BGA zeigt die Belastung der Abwässer unterschiedlicher landwirtschaftlicher Betriebssysteme und Barrierefunktion der Biogasanlagen. Proben der Biogasanlagen 1 bis 15 wurden quantitativ auf die ARG *sul2*, *tetA*, *tetM* und *tetO* untersucht. Abbildung 22 stellt die nachgewiesenen Kopienzahlen der vier untersuchten Resistenzgene in den Substrat- und Gärresteproben aus den 15 Biogasanlagen dar.

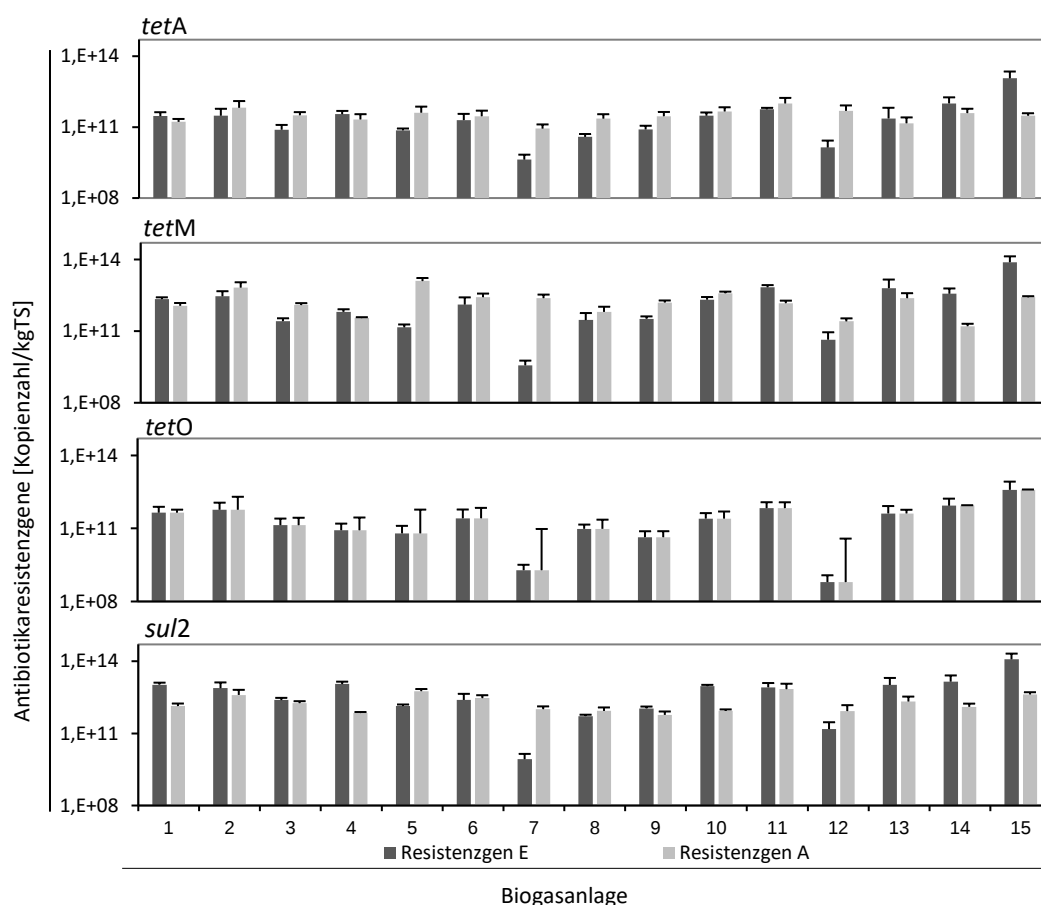


Abbildung 22 Quantitative Erfassung von Antibiotikaresistenzgenen (*tetA*, *tetM*, *tetO*, *sul2*) in Gärsubstrat (E) ohne NaWaRo und Gärrest (A) von 15 deutschen Biogasanlagen im Screening 2012. Quantifiziert wurde über quantitative Real Time PCR gegen einen absoluten Plasmidstandard mit fünf definierten Konzentrationsstufen im Triplikate. Abgebildet ist die logarithmische Auftragung der Mittelwerte und Standardabweichungen triplikatier DNA-Extraktionen mit 3 Verdünnungsstufen die wiederum im Triplikate aufgetragen wurden.

Kopienzahlen aller ARG liegen im Bereich 10^8 K/ g TS (BGA12-E-*tetO*) bis 10^{14} K/ g TS (BGA15-E-*sul2*). Das ARG mit der höchsten mittleren Kopienzahl von 3×10^{13} K/ g TS in Eingangsproben ist *sul2*. Durchschnittliche Kopienzahlen der Gene *tetM* und *tetA* in Eingangsproben liegen im Bereich

10^{12} K/ g TS, während das kopienschwächste ARG *tetO* eine mittlere Kopienzahl von 10^{11} K/ g TS aufweist. Ausgangsproben zeigen im Durchschnitt eine niedrigere Kopiendichte für alle ARG und eine andere Verteilung der Häufigkeiten. Das kopienstärkste *tetM* liegt mit *sul2* im Bereich von 10^{12} K/ g TS was einer Reduktion der Kopien um 80 % bei *sul2* und 60% bei *tetM* gleichkommt. Die kopienschwächeren *tetA* und *tetO* liegen im Bereich 10^{11} K/ g TS und erfahren eine Reduktion von 65% bei *tetA* und nur 30 % bei *tetO*. Auf Fallebene betrachtet zeigen 27 Ausgangsproben eine geringere Kopienzahl und 33 Ausgangsproben eine höhere Kopienzahl als die entsprechenden Eingangsproben.

Die vier Anlagen BGA1 und BGA13-BGA15 zeigen eine deutliche Reduktion der Kopienzahlen für jedes untersuchte ARG. Für alle dieser Anlagen außer BGA15, deren maximale Reduktion bei *tetA* zu sehen ist, erfolgt die stärkste Reduktion bei *sul2*. Die Anlage BGA4 zeigt erniedrigte Kopienzahlen im Ausgang für die ARG *tetA*, *tetM* und *sul2*, BGA9 und BGA11 bei *tetO* bzw. *tetM* und *sul2*, sowie die BGA2 und 3 ausschließlich bei *sul2*. Während *sul2* nur in fünf Anlagen keine Reduktion erfährt werden die anderen Gene in neun bis 10 Anlagen unvermindert in Ausgangsproben gefunden. BGA5-8 und BGA12 zeigen für keins der ARG eine Reduktion in Ausgangsproben. In diesen Anlagen sind alle ARG verstärkt im Ausgang amplifiziert worden, besonders deutlich wird dies in BGA7 mit einer Zunahme der ARG zwischen ein bis zwei Größenordnungen.

Die höchsten Kopienzahlen aller Gene der Eingangsprobe, sowie die deutlichste Abnahme zur Ausgangsprobe treten in der BGA15 auf. BGA7 zeigt die niedrigsten Kopienzahlen für *tetA*, *tetM* und *sul2* in Eingangsproben, während die niedrigsten Funde für *tetO* in BGA12 auftreten.

Jahresgang dreier ausgewählter Biogasanlagen zur näheren Bestimmung des Antibiotika- und Fermentationseinflusses auf Antibiotikaresistenzgene

Im Anschluss an die stichprobenhafte Untersuchung wurden im Jahr 2013 drei der BGA über einem Jahresgang beprobt um den saisonalen Verlauf sowie den direkten Bezug von Ein- und Ausgangsproben zu erfassen. Fünf Probenahmezeitpunkte wurden mit einem Abstand von ca. 60 Tagen gewählt um die durchschnittliche mittlere Verweilzeit der Substrate in den Anlagen zu Berücksichtigen. Somit ergibt sich eine Korrelation der Eingangsproben zur Ausgangsproben des darauffolgenden Entnahmezeitpunkts. Die Anlagen BGA1, BGA8 und BGA15 wurden auf Grund der Erkenntnisse der *screenings* 2012 zur näheren Betrachtung ausgewählt. BGA1 stellt eine moderat belastete Anlage mit leichter Barrierefunktion, BGA8 eine leicht belastete Anlage mit sehr geringer oder keiner Rückhaltung der ARG und zuletzt BGA15 mit starker Belastung und sehr ausgeprägtem Gefälle der Kopienzahlen zu Ausgangsproben dar. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind in Abbildung 23 dargestellt.

ARG liegen in allen drei Anlagen in einem Bereich zwischen $7,8 \times 10^{10}$ K/ g TS und $1,1 \times 10^{14}$ K/ g TS in Eingangs- und zwischen $7,3 \times 10^{10}$ K/ g TS und $1,6 \times 10^{13}$ K/ g TS in Ausgangsproben mit einer durchschnittlichen Dichte von $1,1 \times 10^{13}$ K/ g TS bzw. $1,6 \times 10^{12}$ K/ g TS sowie einer mittleren Reduktion um 85 % zu Ausgangsproben. In Eingangs- und Ausgangsproben aller Anlagen zeigt sich *sul2*, mit durchschnittlich $2,8 \times 10^{13}$ K/ g TS bzw. $3,8 \times 10^{12}$ K/ g TS, als kopienstärkste ARG mit der ausgeprägtesten Abnahme zu Ausgangsproben um 86 %. In derselben Größenordnung bewegt sich *tetM*. Die mittlere Kopienzahl liegt bei $1,0 \times 10^{13}$ K/ g TS in Eingangs- und $2,0 \times 10^{12}$ K/ g TS in Ausgangsproben mit einer Reduktion von durchschnittlich 80 %. Die mittleren Kopienzahlen der ARG *tetA* und *tetO* liegen sowohl in Eingangs- als auch Ausgangsproben um eine Größenordnung niedriger als die der anderen ARG. Die durchschnittliche Abnahme der Kopienzahlen in Ausgangsproben ist ebenfalls geringer bei 79 % bzw. 74 %.

BGA15 zeigt mit durchschnittlich $2,4 \times 10^{13}$ K/ g TS in Eingangs- und $3,0 \times 10^{12}$ K/ g TS in Ausgangsproben die höchste ARG-Dichte sowie die ausgeprägteste Reduktion über den biotechnologischen Prozess um knapp 90 %. Die Anlage mit der zweithöchsten ARG-Belastung ist BGA1. ARG liegen zwischen $4,86 \times 10^{12}$ K/ g TS in Eingangs- und $9,3 \times 10^{11}$ K/ g TS in Ausgangsproben und werden um durchschnittlich 80 % reduziert. Die geringsten Kopienzahlen finden sich in BGA8 mit durchschnittlich $2,3 \times 10^{12}$ K/ g TS in Eingangs-, $9,1 \times 10^{11}$ K/ g TS in Ausgangsproben und einer Abnahme der ARG um 60 %.

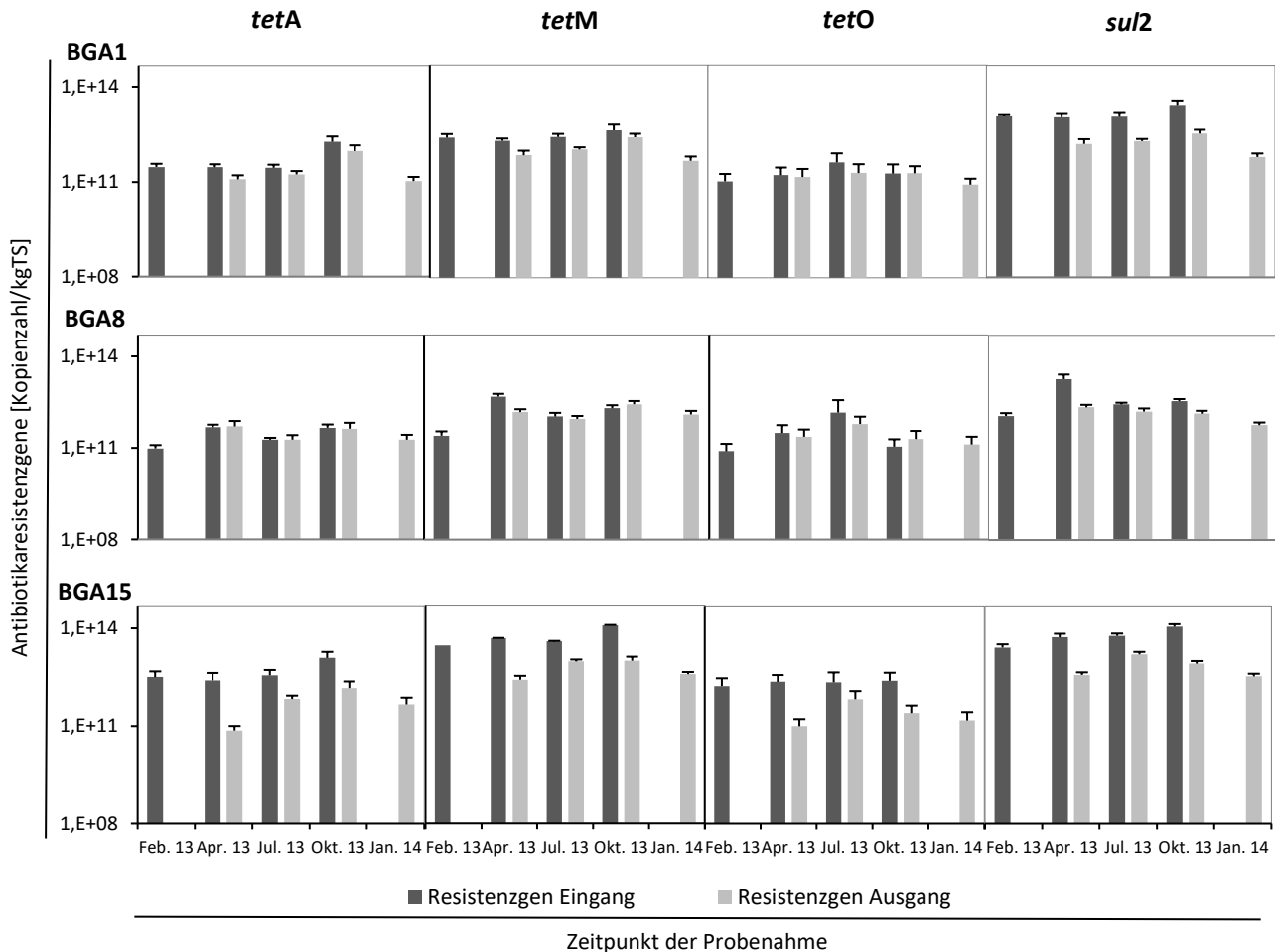


Abbildung 23 Quantitative Erfassung von Antibiotikaresistenzgenen (*tetA*, *tetM*, *tetO*, *sul2*) in Gärsubstrat (E) ohne NaWaRo und Gärrest (A) von BGA1, BGA8 und BGA15 beprobt über den Jahresgang 2013 mit 5 Messpunkten. Quantifiziert wurde über quantitative Real Time PCR gegen einen absoluten Plasmidstandard mit fünf definierten Konzentrationsstufen im Triplikate. Abgebildet ist die logarithmische Auftragung der Mittelwerte und Standardabweichungen DNA-Extraktionen im Triplikate mit 3 Verdünnungsstufen die wiederum im Triplikate aufgetragen wurden.

Von insgesamt 48 Fällen konnte in 38 eine Abnahme der ARG in Ausgangsproben festgehalten werden. BGA15 zeigte in jedem entsprechenden Paar von Eingangs- und Ausgangsproben eine deutliche Reduktion der Kopienzahlen. In BGA1 treten in 13 der 16 betrachteten Fälle geringere Kopienzahlen im Ausgang auf. Zunahmen innerhalb einer Größenordnung treten bei *tetA* im Ausgang 13.4 und *tetO* in den Ausgängen 13.2 und 13.3 auf. BGA8 zeigt nur in 9 der Fälle reduzierte Kopienzahlen in Ausgangsproben. Besonders prägt sich dies bei *tetO* mit einer Zunahme der Kopien von einer Größenordnung in drei der vier Probenpaare aus. Aber auch *tetM* mit den Ausgangsproben 13.2 und 13.4, *tetA* und *sul2* mit den Proben 13.4 bzw. 13.2 zeigen eine Zunahme in Ausgangsproben.

Saisonale Schwankungen oder signifikante Einzelereignisse können für keine der Anlagen verzeichnet werden.

Generell werden alle der betrachteten ARG ubiquitär auf hohem Niveau jedoch mit einer niedrigeren Kopienzahl und anderen Verteilung in Ausgangsproben detektiert. Mit abnehmender Häufigkeit und einer entsprechend verminderten Reduktion treten *sul2*, *tetM*, *tetA* und das kopienschwächste *tetO* in allen Anlagen auf. Sowohl das ARG-Niveau als auch die Reduktionseffizienz zeigt anlagenspezifische Unterschiede mit maximalen Werten in BGA15 sowie dem niedrigsten Aufkommen in BGA7 im *screening* bzw. BGA8 im Jahresgang.

IV. DISKUSSION

Die moderne Landwirtschaft produziert neben Lebensmitteln und Tiernahrung große Mengen Abwässer die durch die Freisetzung mikrobiologischer Risikofaktoren, sowie Schwermetall- und pharmazeutischen Rückständen Risiken für die menschliche Gesundheit und die Umwelt darstellen (Wings and Dott 2015).

Diese Studie untersucht das Vorkommen resistenter und potentiell pathogener Mikroorganismen über kultivierungsabhängige Methoden sowie in einem populationsgenetischen Ansatz die Verteilung und Persistenz genetischer Resistenzmarker in landwirtschaftlichen Abwässern.

In einem zweistufigen *screening*-Programm mit Substrat- und Gärrestproben fünfzehn deutscher Biogasanlagen sowie der eingehenden Betrachtung dreier Anlagen über einen Jahresgang mit fünf Probezeitpunkten wird das Risiko der Ausbringung unbehandelten Abwassers auf Ackerland und das hygienisierende bzw. rückhaltende Potential der biotechnischen Barriere erfasst.

4.1 CHEMISCH-ANALYTISCHE CHARAKTERISIERUNG LANDWIRTSCHAFTLICHER ABWÄSSER IN DEUTSCHLAND

Neben der Verbreitung mikrobiologischer Verunreinigungen birgt die moderne Tierproduktion als Quelle fester, flüssiger und gasförmiger Emission auch chemische Risiken für die Umwelt. Landwirtschaftliche Abwässer tragen überschüssige Mengen der Pflanzennährstoffe Stickstoff und Phosphor in Boden, Grund- und Oberflächenwasser ein und verursachen eine Eutrophierung dieser Umweltkompartimente sowie den Eintrag in Trinkwasseraufbereitungssysteme (Hartung et al. 2001). Aber auch Schwermetalle wie Kupfer und Zink werden, in Dosen weit über ihrer physiologischen Notwendigkeit, aufgrund ihrer mikrobioziden und leistungsfördernden Wirkung als Futtermittelzusätze appliziert (Hartung et al. 2001). Dies führt zu hohen Konzentrationen sowohl in Abwasser als auch Boden und Gewässer und der Promotion resistenter Bakterien (Yazdankhah, Rudi, and Bernhoft 2014). Die Stoffeinträge durch landwirtschaftliche Aktivitäten werden weder auf EU-Ebene noch in Deutschland im Bodenschutzrecht geregelt und auch nur bedingt im Wasserhaushaltsgesetz reguliert (Maurer and Maissen 2009; Wasserhaushaltsgesetz 2009).

4.1.1 Chemische Charakterisierung von 15 Biogasanlagen

Die pH-Werte Eingangsproben des *screenings* liegen zwischen 7 und 7,8 und in Ausgangsproben stärker im alkalischen Bereich zwischen 7,8 und 8,9. Diese Werte entsprechen Literaturwerten mesophiler Anlagen. Ein basischerer pH in den thermophilen Anlagen BGA11 und BGA12 kann jedoch abweichend nicht bestätigt werden (Adolph, Beck, and Jungbluth 2004; Mähnert 2007). Im Jahresgang kann dieser Zusammenhang nur für BGA15 festgestellt werden. BGA1 und BGA8 zeigen zum Teil übersäuerte Gärrestproben. Mähnert kann 2007 in einer Studie mit kontinuierlichen realen Anlagen eine Übersäuerung des Fermenterinhalt zwischen der 30. und 40. Woche mesophiler Vergärung von Maissilage und Rindergülle feststellen. Mit Gesamtverweilzeiten von 380 bzw. 270 Tagen liegen BGA1 und BGA8 in diesem Bereich während, BGA15 mit 130 Tagen deutlich niedriger liegt.

Da Eingangsproben der vorliegenden Studie nur tierische Abwässer mit geringen Anteilen Einstreu und Futtermittel enthalten, die Ausgangsproben jedoch dem Fermenter bzw. Nachgärer inklusive NaWaRo entnommen wurden ist mit Unstimmigkeiten zwischen Trockensubstanzen und organischer Trockensubstanz der Anlagen zu rechnen. Ein Abbau der Trockensubstanz durch die Umwandlung in Biogas bis zu 80 % kann sowohl in *batch*-Versuchen, als auch realen Anlagen erreicht werden (Puchas 2006; Wolters et al. 2016; Fernández, Porrier, and Chamy 2001). Eine voll-

ständige Umwandlung des oTS kann jedoch aufgrund schwer abbaubarer Anteile, wie Lignin sowie der Neubildung mikrobiologischer Biomasse während der Fermentation nicht erwartet werden (Weißbach 2008). Mähnert (2007) beschreibt einen Zusammenhang von abnehmendem oTS-Abbau bei höherer Raumbelastung, niedrigerer Temperatur und geringerem Anteil, von NaWaRo im Gärsubstrat. Tatsächlich zeigen Anlagen mit sehr hohem NaWaRo-Anteil wie BGA11 mit 98 % und BGA13 mit 97 %, sowie Anlagen mit thermophilen Prozessbedingungen keine auffallenden oTS-Werte in Ausgangsproben. Bei der Betrachtung der Trockensubstanzen wird jedoch deutlich, dass große Anteile von Mist insbesondere Geflügelmist in BGA12 zu erhöhten Werten in Eingangsproben führen. Auch eine Bilanzierung des gelösten organischen Kohlenstoffs und des chemischen Sauerstoffbedarfs ist aufgrund des unbekannten Eintrags durch NaWaRo nicht möglich. Beide Summenparameter zeigen jedoch erhöhte Werte in Eingangsproben mit Mistanteil und lassen eine deutliche Reduktion organischen Verbindungen über den Prozessverlauf vermuten, da auch teilweise erhöhte Werte in Ausgangsproben nicht dem Eintrag der NaWaRo entsprechen, der zwischen 50 % und 97 % der Raumbelastung ausmacht.

Die Anreicherung von Stickstoff in Ausgangsproben entsteht da N_{ges} nicht über die Gasproduktion der Biomasse entzogen wird, sondern im Reaktor verbleibt. Ein hoher spezifischer Gasertrag des Substrats geht mit einem Verlust von Kohlen- und Wasserstoff einher und verschiebt das Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis im Gärrest. Eine geringere Gasausbeute von Gülle und Mist führt demnach zu einer geringeren N_{ges} – Anreicherung als die Vergärung von NaWaRo (Mähnert 2007). Aber auch der Ursprung des tierischen Substrats kann einen großen Einfluss auf N_{ges} in Eingangsproben haben. Übermäßige Proteingehalte und mangelnde Qualität des Proteinangebots in Futtermitteln der Viehwirtschaft, insbesondere der Schweinemast führt zu vermehrter Ausscheidung von Nahrungsprotein (Hartung et al. 2001). Weder der proteinreiche Abfluss aus Mastbetrieben insbesondere Schweinemast in BGA1 – BGA3, BGA6 und BGA13, noch Anlagen mit hohem NaWaRo-Anteil wie BGA11 und BGA13 zeigen auffällige N_{ges} -Werte in Ausgangsproben. Es zeichnet sich jedoch ein Zusammenhang zwischen einem hohen spezifischen Gasertrag der Anlagen, wie in Abbildung A1 im Anhang ersichtlich, und der Akkumulation von N_{ges} in Ausgangsproben ab.

Phosphat ist ein essentieller Nährstoff für Vieh und Mikroorganismen, kann jedoch in hohen Konzentration toxisch wirken (Mähnert 2007). Ähnlich wie bei Stickstoff resultieren hohe Phosphat-Emissionen aus der Tierhaltung aus einem Phosphat-Surplus der Futtermittel von 70 %, der ausgeschieden wird und sich in Gülle und Mist anreichert (Hartung et al. 2001). Literaturangaben beschreiben einen Rückgang von über 50 % der Phosphat-Werte über den Prozessverlauf mit Konzentration in Abflussproben von 2 – 6 g/ kg TS (Mähnert 2007). Ein derartiger Zusammenhang kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht reproduziert werden, da der Eintrag von sowohl Phosphat als auch N_{ges} über die NaWaRo nicht erfasst wird.

Sowohl die vorliegenden Ergebnisse als auch Literaturangaben zur chemischen und physikalischen Beschaffenheit von Substrat und Gärresten schwanken stark aufgrund der Vielfalt variabler Parameter, wie die Substratzusammensetzung, die physikalische Beschaffenheit der Anlagen und die Prozessbedingungen, jedoch kann eine Steigerung der Umweltverträglichkeit landwirtschaftlicher Abwässer nicht ausgeschlossen werden (Mähnert 2007; Weiland 2010; Weiland 2003).

4.1.2 Bewertung der Kupfer- und Zink- Belastung von Umwelt und Acker durch Abwässer aus Biogasanlagen

Schwermetalle wie Zink, Kupfer, Cadmium, Chrom und Nickel werden in der Viehwirtschaft als Nährstoffe für Vieh und Mikroorganismen aber auch als Umweltschadstoffe betrachtet (Mudhoo and Kumar 2013; Monteiro, Lofts, and Boxall 2010; Yazdankhah, Rudi, and Bernhoft 2014; Hartung et al. 2001). Sie sind essentielle Spurenelemente, die wichtige Strukturkomponenten o-

der regulatorische Co-Faktoren einer breiten Palette an Enzymen in verschiedenen Stoffwechselwegen in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen darstellen (Yazdankhah, Rudi, and Bernhoft 2014). Zu hohe extrazelluläre Konzentrationen haben jedoch eine toxische Wirkung (Moghaddam and Jahanian 2009). Insbesondere Kupfer und Zink werden im Überfluss mit fünfzig- bis hundertfacher Dosis der physiologischen Notwendigkeit in Futtermittelzusätzen und therapeutischen Komponenten eingesetzt um ihren antibiotischen Effekt prophylaktisch zur Kotstabilisierung und Leistungsförderung zu nutzen (Hartung et al. 2001; Mudhoo and Kumar 2013).

Kupfer und Zink können in Konzentrationen von 16 – 101 mg/kgTS (Cu) und 49 - 593 mg/ kg TS (Zn) in Eingangs- und Ausgangsproben detektiert werden und entsprechen den Literaturangaben (Larney et al. 2014; Mähnert 2007). Eine Anreicherung von Metallen im Fermenter findet aufgrund des kontinuierlichen Systems nicht statt.

Auffällig hohe Werte im Bereich 167 mg/ kg TS Kupfer und 1.169 mg/ kg TS Zink treten ausschließlich im Feststoff der Eingangsprobe von BGA6 auf und lassen sich nicht im wässrigen Eluat oder der Ausgangsprobe dieser Anlage wiederfinden. Dies deutet, im Gegensatz zu einer regelmäßigen Futterzusetzung, auf ein Einzelereignis im Sinne von Klauenbehandlung oder pharmazeutischer Anwendung von Präparaten mit hohem Kupfer- und Zinkgehalten hin. Eine Prozesshemmende Wirkung der hohen Metallgehalten wie sie von Mähnert (2007) unterstellt wird kann nicht bestätigt werden.

Der Eintrag von Schwermetallen in die Biogasanlagen über NaWaRo kann nicht ausgeschlossen werden. Zwar zeigt die untersuchte Einzelprobe von Maissilage der BGA15 nur geringe Metallgehalte, jedoch bleibt die Belastung von Kofermentern anderer Anlagen unklar. Peralta-Videa et al. (2009) beschreiben die Akkumulation von Metallverbindungen insbesondere Arsen, Cadmium, Chrom und Blei in Nahrungs- und wildwachsenden Pflanzen.

Die wässrige Verfügbarkeit und resultierende Bioverfügbarkeit von Kupfer liegt bei 10 % und ist in Ausgangsproben leicht erhöht; Zink hingegen zeigt nur eine geringe Löslichkeit. Ausschließlich in BGA12E und BGA13A tritt Zink im wässrigen Eluat auf. Beide Anlagen zeichnen sich durch ihr Substrat tierischer Herkunft aus, da die Abwässer aus der Geflügel- und Schweinemast nicht durch andere weniger belastete Abwässer aus Milchviehhaltung oder Rindermast verdünnt werden. Auffälligkeiten des pH-Werts können nicht als Erklärung hoher Löslichkeiten in Betracht gezogen werden. Ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten Nachweis im wässrigen Eluat und der Kupferkonzentration im gesamten Probenmaterial kann jedoch festgestellt werden.

Der durchschnittliche Transfer von Kupfer und Zink auf landwirtschaftliche Flächen durch Schweinegülle liegt bei durchschnittlich 0,4 kg Kupfer und 0,8 kg Zink pro Hektar im Jahr, was die Eliminierung durch Feldfrüchte um den Faktor 20 bzw. 4 übersteigt (Hartung et al. 2001). Die geringe Löslichkeit der Metalle, wie sie auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden führen zu einer Akkumulation in Ackerboden.

Trotz übermäßiger Fütterung mit Metallverbindungen liegen die Werte in Proben der vorliegenden Studie deutlich unter den angegebenen Grenzwerten zur Schlammapplikation auf landwirtschaftliche Flächen (AbfklärV 1992). Neben einer weiteren Begrenzung der zugelassenen Konzentrationen für Kupfer- und Zinkverbindungen bei der Fütterung in Mastbetrieben kann die Passage der Biogasanlage durch Erhöhung der wässrigen Verfügbarkeit die Akkumulation von Schwermetallen in Nutzböden reduzieren.

4.2 ERFASSUNG DES MIKROBIELLEN SPEKTRUMS IN SUBSTRAT UND GÄRREST DEUTSCHER BIOGAS-ANLAGEN ÜBER KULTIVIERUNGSABHÄNGIGE POPULATIONSUNTERSUCHUNGEN

Eine Gegenüberstellung von Substrat und Gärrest fünfzehn deutscher Biogasanlagen ermöglicht die Bewertung des Rückhaltungs- bzw. Eliminationspotentials der biotechnologischen Barriere in Bezug auf die Prävalenz medizinisch relevanter Schlüsselorgansimen aus landwirtschaftlichen Abwässern. Kolonie-bildende Einheiten (KBE) auf diversen Komplex- und Selektivmedien sowie eine stichprobenhaft erstellte Isolatbibliothek ermöglichen eine genaue Charakterisierung des kultivierbaren Artenspektrums sowie eine Bewertung der genutzten Wachstumsmedien für diese komplexen Probenmatrizes.

4.2.1 Mikrobielle Diversität des kultivierbaren bakteriellen Spektrums in Substrat und Gärrest von Biogasanlagen.

Die Gesamtzahl Kolonie-bildender Einheiten sowohl mesophiler oligotropher (kultiviert auf R2A) als auch anspruchsvoller Bakterien (kultiviert auf CASO) liegt in Ausgangsproben der Biogasanlagen im *screening* 2012 zwischen ein bis zwei Zehnerpotenzen unter dem Nachweis der Substrate. Die einjährige Begleitung der BGA8 in 2013 zeigte ebenfalls einen reduktiven Trend in Gesamtzahlen der KBE. Die Reduktion kultivierbarer Bakterien sowie eine Verschiebung der bakteriellen Gemeinschaft über die Passage der Biogasanlagen durch thermische und anaerobe Prozesse ist mehrfach beschrieben (Sahlström 2003b; Watcharasukarn et al. 2009; Fliegerová et al. 2012; Eikmeyer et al. 2013). Fliegerová et al. (2012) zeigen mit kultivierungsunabhängigen Methoden (Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese und *realtime* PCR) qualitative und quantitative Veränderungen der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft in zwei mesophilen Biogasanlagen, die mit Schweinegülle bzw. Schweinegülle und Maissilage beladen werden. Die Diversität des bakteriellen Spektrums erweist sich größer in Substratproben beider Anlagen, während die Anlage mit Zugabe von NaWaRo ein generell niedrigeres Diversitätsspektrum aufweist als die Kontrollanlage. Neben dem Rückgang Kolonie-bildender Einheiten in allen Anlagen treten Unterschiede zwischen den fünfzehn Biogasanlagen auf. BGA6 sticht mit dem maximalen bakteriellen Wachstum auf CASO als auch auf R2A heraus. Als Substrat dient eine Mischung aus Schweinegülle, Milchviehgülle und -mist sowie der hauptsächliche Kofermentern Maissilage (Tabelle A1). Die mesophile Anlage liegt mit einer maximalen Verweilzeit von 240 Tagen, einer installierten Leistung von 350kW und einem Hauptfermentervolumen von 2000 m³, im mittleren Bereich der betrachteten Biogasanlagen. BGA8 und BGA10 zeigen ebenfalls erhöhte KBE auf beiden Medien trotz sehr unterschiedlicher Bedingungen in sowohl Substrat als auch Verweilzeit und Leistung der Anlagen. BGA14 zeigt als einzige Anlage eine erhöhte KBE in Ausgangsproben auf dem Medium CASO auf, die jedoch nicht auf R2A zu finden ist.

Sowohl die thermophilen und leistungsstärksten Anlagen BGA11 und BGA12 als auch BGA9, die leistungsschwächste Anlage, betrieben mit ökologischer Milchviehgülle und keinem Zusatz von Energiepflanzen, zeigen kein erhöhtes Wachstum mesophiler anspruchsvoller bzw. oligotropher Bakterien. Einzig BGA7 lässt mit einer generell geringen KBE einen direkten Rückschluss auf das eingesetzte Substrat aus Lebensmittelabfällen mit einem verschwindenden Anteil von Milchviehgülle zu (Tabelle A1). Abweichungen zwischen Substrat und Gärrest können auf die fehlende Kontinuität der stichprobenhaft genommenen Eingangs- und Ausgangsproben im *screening* zurückzuführen sein. Eine Verdünnung des Probenmaterials von Eingangsproben (Gülle und Mist) zu Ausgangsproben, die den Fermenter- bzw. Nachgärerinhalt inklusive NaWaRo repräsentieren, ist aufgrund des Biomasseverlusts durch Gasproduktion als vernachlässigbar einzustufen. Trotz teilweise hoher Beigaben nachwachsender Rohstoffe tritt eine Reduktion der KBE in Anlagen mit geringer bzw. keiner Zugabe von NaWaRo gleichermaßen auf. Jedoch haben sowohl Witterungsbedingungen, jahreszeitliche Schwankungen wie, unter anderem Futtermittelverfügbarkeit als auch

Lagerungsbedingungen und -zeiten, der NaWaRo einen Einfluss auf die Beschaffenheit der bakteriellen Gemeinschaft in Substrat und Gärrestproben gezeigt (Cook et al. 2010).

Anaerobe Sporenbildner (kultiviert anaerob, nach Pasteurisierung auf ColSb, 37°C) können in elf Anlagen vermehrt in Ausgangsproben mit einem durchschnittlichen Anstieg von einer Größenordnung erfasst werden. BGA5, BGA11, BGA13 und BGA15 zeigen eine geringere KBE in Ausgangsproben, die ebenfalls einer durchschnittlichen Reduktion von einer Größenordnung gleichkommt. Die Ergebnisse der mehrfach-Beprobung von BGA8 in 2013 zeigen eine Organismenzahl von 10^4 bis 10^5 KBE/g TS in Eingangs- und Ausgangsproben mit einer Einzelspitze bei 10^7 KBE/g TS im Eingang 13.2. Zusammensetzung, Lagerbedingungen und -dauer siliierter NaWaRo resultieren in veränderbaren Ladungen anaerober Sporenbildner in Kofermentern und somit zu einem komplexen und fließenden Einfluss auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in Gärrestproben. Die Stichprobe frischer Maissilage aus BGA15 (NaWaRo) weist anaerober Sporenbildner von 10^7 KBE/kg TS auf. Vissers et al. (2007) zeigen ebenfalls Sporen von Buttersäurebakterien in verschiedenen Silagen, Einstreumaterial und Fäkalien jedoch mit einer durchschnittlich dreimal höheren Sporenzahl in Fäkal- als Silageproben. BGA11 und BGA12 haben die höchsten Einsätze von Maissilage, mit 36 und 25 t TS/d, jedoch ein niedriges bis mediales Wachstum anaerober Sporenbildner. Die Ergebnisse ermöglichen keinen abschließenden Nachweis der Wirkung großer Mengen Silage als Kofermenter auf die KBE anaerober Sporenbildner, trotz dessen Silage als eine bedeutende Quelle der Verunreinigung von Milch- und anderen tierischen Produkten mit Sporen und sporenbildenden Bakterien betrachtet wird (te Giffel et al. 2002). Sporenbildende Bakterien (zum Beispiel *Bacillus spp.* und *Clostridium spp.*) können jedoch Pasteurisierung und Fermentation überleben und nehmen aktiv an der Biogasproduktion (Bagge et al. 2010) teil, was eine stabile bis steigende Anzahl anaerober Sporenbildner in den untersuchten Proben erklärt. Während Cook et al. (2010) in einer anaeroben Schweinegüllelagune im Laufe eines Jahres saisonale Fluktuationen diverser Arten anaerober Sporenbildner zeigen kann, bleiben einige *Clostridien* unbeeinflusst vom Zeitpunkt der Probenahme. Dies unterstützt die Ergebnisse des einjährigen Probenahmezyklus von BGA8, die außer einem zufälligen Maximum in der Eingangsprobe 13.3, über die restlichen Probenahmen konstant bleibt. Eine Reihe von Gründen, wie Änderungen in der Futterqualität durch Lagerung, unsachgemäße Anwendung und kontaminiertes Futtermittel, sowie Infektionen des Tierbestands können zur Erklärung herangezogen werden.

Enterobacteriaceae werden auf den Selektivmedien für *Salmonella* und *Shigella* (*Salmonella-Shigella*) sowie auf den EMB und MC kultiviert. Dreizehn Anlagen zeigen im Ausgang eine um durchschnittlich zwei Größenordnungen reduzierte KBE. Zwei Anlagen (BGA3 und 4) zeigen jedoch eine erhöhte Organismendichte im Ausgang. Eine Abnahme der Enterobacteriaceae ist in Ausgangsproben zu beobachten. Eine erhöhte Dichte um drei Größenordnungen wird im Ausgang der Lebensmittel-fermentierenden Anlage BGA7 beobachtet. Obwohl sie als fakultativ anaerobe, mesophile Organismen an die Bedingungen des Fermentationsprozesses angepasst sind, konnte in den verschiedenen Gärresten eine um ein bis zwei Zehnerpotenzen geringere KBE als in den Substraten ermittelt werden. Die hygienisierende Wirkung von Wärmebehandlung und Fermentation landwirtschaftlicher Abwässer, insbesondere auf gramnegative Organismen wurde zuvor beschrieben. Watcharasukarn et al. (2009) zeigen, in frischer Kuhgülle über einen Zeitraum von 15 Tage bei 37 °C, eine signifikante Reduktion von *E. coli* von 10^5 KBE/ml bis zur Nachweisgrenze. Schauss et al. (2015) entwickelten ein selektives Voranreicherungs-Verfahren, das die Anwesenheit von ESBL-produzierenden *E. coli* in Ausgangsproben der hier untersuchten Biogasanlagen zeigt. Dies lässt ableiten, dass die Ladung kultivierbarer Enterobacteriaceae und somit klinisch

relevanter Schlüsselorganismen durch die Prozessbedingungen reduziert, jedoch nicht eliminiert werden. Die Reduktion (Sahlström 2003b)

Enterococcaceae wurden auf zwei selektiven Medien (Slanetz & Bartley und Galle Esculin Azid, 37 ° C) kultiviert und treten mit einer um durchschnittlich 2,1 Größenordnungen reduzierten KBE in Ausgangsproben auf. Auch Kolonie-bildende Einheiten auf dem Antibiotika-angereicherten CHROMagar VRE Medium sind in Ausgangsproben durchschnittlich um zwei Zehnerpotenzen vermindert. Eine Studie von Watcharasukarn et. al. (2008) zeigt eine signifikante Reduktion von *Enterococcus faecalis* in frischem Kuhdung der 37 ° C für 15 Tage, 55 ° C für 48 h und 70 ° C für 24 h inkubiert wurde. Trotzdem wird *E. faecalis* aufgrund seiner Wärmebeständigkeit als Indikator Organismus zur Evaluation der Pathogen-reduzierenden Wirkung meso- und thermophiler Biogasanlagen genutzt.

Auf Selektivmedien für Staphylococcaceae (Mannit-Salz-Agar) ist eine generelle Reduktion der KBE zu verzeichnen. Nur vier Anlagen zeigen höhere Zahlen an kultivierbarer Bakterien in Ausgangsproben von bis zu zwei Größenordnungen in BGA7. Auf CHROMagar MRSA zeigen sechs Anlagen zeigten eine geringe Zunahme der Bakterienlast unterhalb einer Größenordnung während neun eine Reduktion von bis zu zwei Größenordnungen in Ausgangsproben aufweisen. BGA6, 8, 11, 12 und 15A zeigen kein Wachstum.

Die reduzierende Wirkung der Prozessbedingungen realer Biogasanlagen auf potentiell pathogene Schlüsselorganismen der Enterobacteriaceae, Enterococcaceae und Staphylococcaceae werden von anderen Studien bestätigt (Sahlström 2003b; Juliana Alves Resende et al. 2014; Iwasaki et al. 2011). Iwasaki et al. (2011) untersuchten thermophile und mesophile Biogasanlagen über einen Zeitraum von 90 Tagen. Nachweisbare Zahlen coliformer Bakterien und *Enterococcus*-Spezies können in Ausgangsproben thermophiler Anlagen nicht, in beiden mesophilen Anlagen jedoch in verminderter Anzahl nachgewiesen werden. Beneragama et al. (2013) können die Eliminierung verschiedener multiresistenter Bakterien durch die anaerobe Vergärung landwirtschaftlicher Abwässer bei 55 ° C und eine Reduktion von 90 % bei mesophilen Temperaturen zeigen.

Resende et al. (2014a) zeigen durch die selektive Anreicherung von Enterobakterien, nicht-fermentierenden gramnegativen Stäbchen und grampositive Kokken eine unvollständige Eliminierung aller Bakterien nach 60 Tagen mesophiler anaerober Fermentation von Rindergülle. Der qualitative Nachweis multiresistenter Bakterien erfolgt hier jedoch sowohl in Zu- und Ablaufproben.

Aufgrund unspezifischen Wachstums sowohl auf Komplexmedien als auch Selektivmedien und CHROMagar ist eine abschließende Bewertung der eliminierenden bzw. reduzierenden Wirkung der betrachteten Prozessbedingungen auf das generelle bakterielle Spektrum und insbesondere auf klinisch relevante Schlüsselorganismen nur eingeschränkt möglich. Auch Unterschiede der Hygienisierungseffizienz thermophiler und mesophiler Anlagen lassen sich in der vorliegenden Studie auf der Basis der Gesamtkoloniezahlen nicht erfassen. Kolonie-bildender Einheiten üzeigen jedoch eine reduktive Tendenz sowie eine Verschiebung der Populationszusammensetzung sowohl des gesamten kultivierbaren Spektrums als auch relevanter Schlüsselorganismen.

Bakterielle Diversität der häufigsten Isolate

Annähernd 2000 Bakterien wurden stichprobenhaft von allen verwendeten Medien aus Eingangs- und Ausgangsproben isoliert. Sie können den vier bakteriellen Phyla Actinobacteria, Bacterioidetes, Firmicutes und Proteobacteria mit insgesamt 34 Familien und 71 Gattungen zugeordnet werden. Die Diversität von Familien und Gattungen ist um durchschnittlich 30 % höher in Eingangsproben aller Anlagen. Veränderungen im Spektrum der kultivierbaren Isolate erfolgte in allen Bi-

ogasanlagen während der Fermentation. Einige Bakterienarten werden reduziert oder vollständige eliminiert, während andere vermehrt in Gärrestproben auftreten. Thermischer und oxidativer Stress des Fermentationsprozesses hat eine eliminierende Wirkung auf einige Bakteriengruppen wie coliforme Bakterien und stellt jedoch günstige Bedingungen für Organismen bereit, die Zellulose und seine Abbauprodukte anaerob verwerten können (Fliegerová et al. 2012; Kröber et al. 2009c). Bisherige Studien zeigen eine Zusammensetzung des mikrobiellen Spektrums in Biogasanlagen von ca. 80% Eubakterien, 10% Archaea und 10% unbekannter Organismen (Wirth et al. 2012; Stolze et al. 2015; Fliegerová et al. 2012; Schlüter et al. 2008).

Wirth et al. (2012) skizzieren das mikrobiologische Spektrum einer Biogasanlage mit Hilfe von *short-read next generation DNA sequencing* und zeigen Eubacteria vornehmlich vertreten durch Bacterioidetes und Firmicutes (Clostridium und Bacillus). Während Firmicutes auch in der vorliegenden Studie den Großteil von 64 % der bakteriellen Gemeinschaft ausmacht werden Bacterioidetes durch kultivierungsabhängige Verfahren nur zu 3 % isoliert und sind somit das isolatschwächste Phylum. Auch Fliegerová et al. (2012) beschreiben eine deutliche Zunahme des Phylums während der Fermentation die in der vorliegenden Studie nicht bestätigt wird. Gram-negative Bakterien des Stammes Bacterioidetes wie Bacterioidaceae, Sphingobacteriaceae und Flavobacteriaceae stammen aus verschiedenen Umweltkompartimenten wie Boden und Oberflächenwasser sowie dem tierischen Gastrointestinaltrakt (F. Thomas et al. 2011b). Die eingeschränkten Möglichkeiten der angewendeten Kulturmedien können die geringe Erfassung des Phylums in der vorliegenden Studie erklären.

Bisherige Studien haben anhand kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Analysen gezeigt, dass Vertreter der Firmicutes das mikrobielle Spektrum in Biogasanlagen dominieren, da sie für den anaeroben Abbau von Biomasse von Bedeutung sind (Wirth et al. 2012; Fliegerová et al. 2012; Cook et al. 2010; Schlüter et al. 2008). Aufgrund ihrer Fähigkeit Cellulose zu hydrolysieren besiedeln Firmicutes häufig abbaubares organischen Material wie NaWaRo für die Biogasproduktion und stellen in Kombination mit Bacterioidetes den überwiegende Anteil der bakteriellen gastrointestinalen Flora in Säugetieren dar (Fliegerová et al. 2012; Wirth et al. 2012; F. Thomas et al. 2011a). Bacillaceae, Enterococcaceae und Streptococcaceae tragen wesentlich zur Vergärung organischer Biomasse bei. Neben der Hydrolyse von Polysacchariden, setzen sie auch monomeren Zucker zu organischen Säuren um, die als Substrate für acetogene Bakterien und Archaea dienen (Wirth et al. 2012). *Bacillus* ist die Gattung mit der höchsten Isolationsrate von 17 % aller Isolate in Eingangs- und 50 % in Ausgangsproben und kann in vierzehn der Eingangsproben und allen Ausgangsproben nachgewiesen werden. Eine Populationsverschiebung zu Bacillaceae des kultivierbaren Aspekt der Bakteriengemeinschaft auf oligotrophen Medien ist nicht überraschend, da Organismen der Familie an der Vergärung organischer Biomasse teilhaben und unter den Bedingungen mesophiler Biogasanlagen gedeihen (Wirth et al. 2012; Cardinali-Rezende et al. 2012). Enterococcaceae treten trotz der vorherrschenden Spezies *E. faecalis* und *E. faecium* in allen Proben, erneut mit höherer Diversität der Isolate in Eingangsproben auf mit Funden von *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. durans* und *E. gallinarium* auf, die in Ausgangsproben nicht zu finden sind. Dies unterstreicht die zuvor beobachtete Beständigkeit von *E. faecalis* unter schwierigen Bedingungen, vornehmlich Hitzestress (Watcharasukarn et al. 2009; Iwasaki et al. 2011). Enterococcaceae sind gastrointestinale assoziierte Kommensale wie auch potentielle Pathogene, deren ubiquitäre Besiedelung von landwirtschaftlichen Abwässern mehrfach beschrieben ist (Juliana Alves Resende et al. 2014; Iwasaki et al. 2011; Hammerum 2012). Ein eliminierender Effekt thermophiler Biogasanlagen wie von Iwasaki et al. (2011) vorgestellt kann mit dieser Studie nicht bestätigt werden. Auch die thermophilen Anlagen BGA11 und BGA12 lassen die Isolation von *Enterococcus spp.* in

Gärrestproben zu. Die Gattung *Clostridium* konnte in fünf der Untersuchten Anlagen isoliert werden. Isolatzahlen dieser Anlagen bleiben in Eingangs- und Ausgangsproben weitgehend unverändert. Bisherige Studien zeigen Clostridiaceae als ubiquitäre Kommensalen von sowohl tierischen Exkrementen als auch Silage und Gärrest (Bagge, Persson, and Johansson 2010; Li et al. 2015; Stolze et al. 2015; Wirth et al. 2012). Vertreter der Clostridiaceae partizipieren am anaeroben Abbau von Lignocellulose sowie der H₂-Bildung, die wiederum methanogenen Archaea als Substrat für die Methanproduktion dient (Lynd et al. 2002a; Li et al. 2015). Einige pathogene Vertreter der Gattung umfassen *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. difficile* und *C. tetani* von denen jedoch ausschließlich *C. perfringens* in dieser Studie nachgewiesen werden konnte. Wie zuvor beschrieben kann eine Prävalenz oder Anreicherung pathogener Spezies dieser Familie über Biogasfermentation nicht bestätigt werden (Dohrmann et al. 2011). Paenibacillaceae treten vermehrt in Gärrestproben auf und werden dort in acht der Anlagen und mit über 50 % höheren Funden isoliert. Basierend auf den Fähigkeiten der Stickstofffixierung und Abbau pflanzlicher Biomasse, werden NaWaRo als Haupteintragsquelle der Rhizosphären-Kommensalen Paenibacillaceae in Biogasanlagen betrachtet (Jin, Lv, and Chen 2011). *Staphylococcus spp.* konnte in dreizehn der Eingangsproben jedoch nur in 5 Ausgangsproben nachgewiesen werden mit einer Reduktion der Isolate um 90 %. Auch bei spezifischer Kultivierung auf Antibiotika-angereichertem CHROMagar MRSA wurden keine pathogenen *S. aureus* gefunden. Geringe Vorkommen von Staphylococcaceae in anaeroben Fermentern konnte bereits von Wirth et al. (2012) beschrieben werden.

Proteobacteria werden mit 30 % aller Isolate als zweitstärkstes Phylum isoliert. Wirth et al. (2012) beschreiben mit Hilfe eines metagenomischen Ansatzes den Anteil der Proteobacteria an der taxonomischen Verteilung einer Biogas-Gemeinschaft als gering mit nur 6% und einer Überlagerung der häufigsten Klasse Gammaproteobacteria. Während Gammaproteobacteria ebenfalls die vorherrschenden Isolate des Phylums in dieser Studie sind zeigte die kulturabhängige Analyse einen erheblich größeren Anteil der Isolate von 30 % Proteobacteria.

Gastrointestinal assoziierte Gattungen der Enterobacteriaceae wie *Escherichia* / *Shigella* sind in Ausgangsproben weitgehend reduziert. Neben einem Rückgang gramnegativer Bakterien über den Prozess der Fermentation ist auch die spezifische Reduktion von *E. coli* durch den Einfluss von Wärmebehandlung und Fermentation beschrieben (Watcharasukarn et al. 2009; Sahlström et al. 2008b). Abweichend kann eine vollständige Eliminierung von *E. coli* mit der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Schauss et al. (2015) beschreibt eine deutliche Reduktion von *E. coli* insbesondere ESBL im selben Probenmaterial kann durch spezifische Anreicherung eine Elimination jedoch ausschließen. Trotz gezielter Kultivierung auf *Salmonella*/*Shigella* Medium konnte kein Isolat dieser Gattungen gewonnen werden.

Actinobacteria kommen als artenreiches Phylum vor Bacterioidetes machen jedoch nur 6 % der gesamten Isolate aus. Eine wesentlich niedrigere Isolatzahl in Ausgangsproben aller Anlagen deutet auf eine Reduktion der Organismen durch anaerobe Fermentation hin. Wie bereits beschrieben ist der Großteil dieses Phylums aerob und tritt in großen Zahlen auf pflanzlicher Biomasse auf wo sie an der Degradation von Lignin und Zellulose beteiligt sind (Lynd et al. 2002b; Ventura et al. 2007).

Die Geringe Diversität der Isolate sowie eine Zunahme der Diversität in der Ausgangsprobe der BGA7 lässt sich auf die einmalige Substratzusammensetzung aus überwiegend Lebensmittelabfällen, mit einer erheblich geringeren mikrobiologischen Ladung als landwirtschaftliche Abwässer zurückführen. Die größte Diversität ist in BGA4E, BGA13E-BGA15E mit 21-24 verschiedenen Gattungen zu finden. Unterschiede in der Diversität hängen stark von der Gesamtzahl der isolierten Bakterien einer Anlage sowie der zufälligen Isolation ab, jedoch beeinflusst auch die Zusammensetzung des Substrats die bakterielle Vielfalt. Stolze et al. (2015) zeigen jedoch im Vergleich, über

eine extensive Metagenom-Sequenzierung, der Bakteriengemeinschaft zweier Biogasanlagen mit einem Substrat aus Gülle bzw. Mist ähnliche taxonomische Profile weitgehend unabhängig von Substratzusammensetzung, Prozessbedingungen und Anlagenanatomie und leiten daraus eine bakterielle Kernpopulation mit funktioneller Notwendigkeit innerhalb der Biomassezersetzung und Methanbildung ab.

Zusammenfassend werden weniger kultivierbare Bakterien in Ausgangsproben der Biogasanlagen gefunden insbesondere eine Reduktion klinisch relevanter Organismen wie Enterobacteriaceae, Enterococcaceae und Staphylococcaceae kann festgestellt werden. Dementsprechend ist das potenzielle Risiko der Kontamination von Nahrungspflanzen, Boden, Wasser und anderer Umweltkompartimente mit Krankheitserregern durch die Anwendung von Gärrest auf Agrarkulturland eingedämmt im Gegensatz zur Verwendung unbehandelter landwirtschaftlicher Abwässer.

4.2.2 Bewertung der Selektionseffizienz diagnostischer Wachstumsmedien zur Charakterisierung komplexen Probenmaterials

In dieser Studie genutzte Wachstumsmedien wurden für die Selektion pathogener Schlüsselbakterien in der klinischen Diagnostik konfiguriert. Sie zeigen variierende Eignung für die Anwendung bei dem organismenreichen, komplexen Probenmaterial landwirtschaftlicher Abwässer. Auf allen Medien sind Isolate der Firmicutes in Ausgangsproben vermehrt nachzuweisen. Dies wird bestätigt durch diverse kulturunabhängige Studien deren Metagenom-Analyse der bakteriellen Gemeinschaft in Biogasanlagen ebenfalls die Abundanz des Phylum aufzeigen (Wirth et al. 2012; Wolters et al. 2016; Kröber et al. 2009; Fliegerová et al. 2012; Eikmeyer et al. 2013). Die Medien GEA/SB zur Kultivierung von Enterococcaceae, EMB/MC für die Isolation von Enterobacteriaceae, SS zur Kultivierung von Enterobacteriaceae insbesondere *Salmonella* und MSA zur Isolation von *Staphylococcus spp.*, eignen sich mit abnehmender Selektionseffizienz zur Kultivierung der Zielorganismen aus Substrat- und Gärrestproben. GEA und SB erwiesen sich als die selektivsten Medien mit einer Wiederfindung von *Enterococcus spp.* zwischen 70 -90 % der Isolate aus Eingangs- und 65 -80 % aus Ausgangsproben. Das Restspektrum der Isolate konnte fast ausschließlich den Firmicutes zugeordnet werden was eine erfolgreiche Hemmung gramnegativer Bakterien aufzeigt. EMB und MC wurden zur Isolation und Differenzierung von Enterobacteriaceae eingesetzt. Sowohl Eingangs-als auch Ausgangsproben zeigen eine Prävalenz von Proteobakterien mit deutlicher Abnahme im Gärrest. Noch 20 % der Isolate in Eingangsproben können den Enterobacteriaceae zugeordnet werden, Ausgangsproben hingegen zeigen mit 26 %- 40 % überwiegend *Bacillus*. Da eine Verschiebung der bakteriellen Gemeinschaft von gastrointestinal assoziierten Bakterien wie Enterobacteriaceae zu Firmicutes insbesondere Bacilli in Biogasanlagen bereits beschrieben ist spiegelt die Isolatzusammensetzung auf den Medien die unterschiedlichen Zusammensetzungen von Eingangs- und Ausgangsproben wieder (Wirth et al. 2012). SS-Agar erbrachte auch nach Voranreicherung in spezifischer Selenit-Bouillon (Marck, Darmstadt) keine Funde von *Salmonella spp.*. Die Verordnung EG 2160/2003 sowie Salmonellose Verordnungen für Rinder-, Geflügel-, und Schweinehaltung in Deutschland schreiben eine Impfpflicht gegen *S. enteritidis* in Aufzucht- und Mastbetrieben mit mehr als 250 Tieren vor und erklären die Abwesenheit von Salmonellen in den Untersuchten Proben (EG2160/2003 2003; GfLSalmoV 2009; SchwSalmoV 2007; RindSalmV 2014). MSA-Medium generierte in Eingangsproben gleichermaßen spezifische Isolate von *Staphylococcus spp.* und unspezifischen *Bacillus spp.* während Isolate der Ausgangsproben zu 90 % von *Bacillus* geprägt, keine Funde der Staphylococcaceae ermöglichten. *Staphylococcus spp.* konnten über Mannitol-Salz-Agar aus Substrat und Gärrest isoliert werden. Die Supplementierung

von 7,5 % Natriumchlorid im Medium soll nach Angaben des Herstellers den Bewuchs durch unspezifische Bakterien hemmen. Halotoleranz und -phili gegen moderate bis hohe Salzgehalte einiger *Bacillus*-Spezies sind jedoch zuvor beschrieben worden (Arahal and Ventosa 2016). Die Kultivierung antibiotikaresistenter klinisch relevanter Bakterien auf CHROMagar lieferte nur für ESBL-produzierende Enterobacteriaceae in Eingangsproben positive Ergebnisse. Schauss et al. (2015) beschreiben eine sensitivere Nachweismethode ESBL-produzierender *E. coli* durch spezifische Anreicherung, die eine Detektion in Ausgangsproben ermöglicht und somit die Reduktion und keine Eliminierung der Organismen unterstreicht. Unspezifisches Wachstum auf dem Medium wurde überwiegend durch *Stenotrophomonas* spp., *Pseudomonas* spp. und anderen Gram-negativen Bakterien gestellt, deren Multiresistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika bereits beschrieben ist (Leclercq et al. 2013). Sowohl MRS als auch VRE werden von der Begleitflora der komplexen Proben überwachsen und lassen sich wie Schauss et al. (2015) und Glaeser et al. (2016) beschreiben nur über spezifische Anreicherungsverfahren in dem selben Probenmaterial nachweisen. *Staphylococcus aureus* und dementsprechend MRSA werden jedoch auch nach Anreicherung nicht isoliert. Isolationsraten von 100 % für MRS(A) aus klinischem Probenmaterial sind umfassen beschrieben können jedoch nicht auf Umweltproben übertragen werden (Diederer et al. 2006; Hedin and Fang 2005).

4.3 ABUNDANZ UND DIVERSITÄT VON RESISTENTEN SCHLÜSELBAKTERIEN UND RESISTENZGENEN IN LANDWIRTSCHAFTLICHEN ABWÄSSERN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DES RÜCKHALTUNGSPOTENTIALS DURCH EINE BIOTECHNOLOGISCHE BARRIERE

Der starke Einsatz antibiotisch-wirksamer Substanzen in der Landwirtschaft fördert Bildung und Persistenz resistenter bzw. Resistenzgen-tragender Organismen in landwirtschaftlichen Abwässern.

Die funktionelle Zuordnung einer Resistenz über die Bestimmung der Minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) und eines Resistenzgens zum Trägerorganismus ist nötig um die klinische Relevanz der zuvor akkumulierten Schlüsselorganismen zu ermitteln. Doch nicht nur bekannte Pathogene, sondern auch Kommensale und Umweltorganismen können Resistenzen tragen und diese über Mechanismen des horizontalen Gentransfers weiterverbreiten.

Die Kontamination landwirtschaftlicher Abwässer durch resistente und Resistenzgen-tragende Bakterien, sowie der eliminierenden bzw. rückhaltenden Einfluss von Biogasanlagen auf diese Kontaminanten wurde in der vorliegenden Studie untersucht.

4.3.1 Verteilung der Minimalen-Hemmstoff-Konzentration veterinärmedizinisch relevanter Antibiotika in Biogasanlagen

Der Einsatz von Antibiotika und antibiotisch wirksamen Metallverbindungen in der Viehwirtschaft bewirkt die Entwicklung und Anreicherung antibiotikaresistenter Bakterien in landwirtschaftlichen Abwässern und ermöglicht den Eintrag in Boden, Grund- und Oberflächenwasser (Holger Heuer, Schmitt, and Smalla 2011).

Isolate der Familien Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Staphylococcaceae, Actinobacteriaceae, Xanthomonadaceae, Bacillaceae und Clostridiaceae wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber acht veterinärmedizinisch relevanten Antibiotika wie β -Lactam-Antibiotika [Amoxicillin AMX, Oxacillin OXA], Fluorchinolone [Enrofloxacin ENR], Tetracycline [Tetracyclin TET], Makrolide [Tylosin TLS], Fenicol [Florfenicol FLL] und Sulfonamide [Trimethoprim mit Sulfamethoxazol T/S, Sulfamethoxazol SMO] getestet.

Die Verteilung der MHK zeigt ein gleichförmiges Bild für Enterobacteriaceae aus Eingangs- und Ausgangsproben mit einer tendenziellen Abnahme von 3-10 % resistenter Isolate bei sechs Antibiotika in Ausgangsproben. Ein deutlicher Rückgang von 50 % der Enterobacteriaceae-Isolationen in Ausgangsproben bei gleichbleibendem Resistogramm lässt eine erhöhte Persistenz resistenter Enterobacteriaceae bzw. eine Verbreitung der Resistenz während der Passage der Biogasanlagen vermuten.

Dies trifft auch auf die Resistenz gegen TET zu, da der Anteil empfindlicher Isolate aus Eingangs- und Ausgangsproben stabil bei 50 %-55 % liegt. Ein Großteil der *tet*-ARG wird mobilen genetischen Elementen zugeordnet und kann somit intra- und interspezifisch weit verbreitet werden und ist vor allem bei Gram- negativen Bakterien allgegenwärtig (Chopra and Roberts 2001). Aber auch intrinsisch resistente Vertreter der Enterobacteriaceae wie *Proteus spp.*, *Providencia spp.* und *Morganella spp.* lassen sich aus beiden Probenotypen isolieren (Leclercq et al. 2013; Ibekwe, Murinda, and Graves 2011; Spielmeyer et al. 2014) zeigt anhand einer massenspektrometrischen Untersuchung Tetrazyklinrückstände in zehn der 15 Biogasanlagen mit einer deutlichen Reduktion bis hin zur vollständigen Eliminierung in Ausgangsproben. Dieser Zusammenhang lässt sich durch das Resistogramm nicht aufzeigen. Resistenzen und resistente Schlüsselorgansimen erweisen sich als beständige und unabhängig von der Konzentration antibiotischer Rückstände.

Die 2014 festgelegte MHK für SMO liegt außerhalb des betrachteten Konzentrationsbereichs dieser Studie und lässt die Bestimmung resistenter Isolate nicht zu (CLSI 2014). Empfindliche Isolate stellen jedoch in Eingangs- und Ausgangsproben 20 % des gesamten Spektrums dar. Zahlreiche Studien beschreiben den fortwährenden Anstieg resistenter Bakterien, insbesondere pathogener Enterobacteriaceae seit Einführung des Antibiotikums in 1932 (EU 1999; Huovinen 1997; Allen et al. 2010; Wellington et al. 2013). Trotz einer genetischen Verknüpfung der Resistenzgene für Trimethoprim und Sulfonamid, die der Verwendung des Kombinations-Präparats wenig Nutzen zuschreibt, ist das Resistenzniveau sowohl in Literatur als auch der vorliegenden Studie deutlich geringer als bei dem alleinigen Einsatz des Sulfonamids (EU 1999).

Engen seiner nachgewiesenen Wirkung auf gramnegative Bakterien, insbesondere Enterobacteriaceae und dem Einsatz viehwirtschaftlichen Sektor finden sich nur 10 % und 6 % resistente Isolate in Eingangs- und Ausgangsproben. Pourcher et al. (2014) zeigen in einer Studie mit Applikation ENR- und Ciprofloxacin-resistenter Bakterien angereichertem Hühnermist auf Ackerland Zeitbeständigkeit initial eingesetzter resistenter Enterobacteriaceae über drei Monate, jedoch keine Verbreitung der Resistenzgene auf Umweltorganismen.

Hohe Anteile unempfindlicher Isolate gegenüber OXA und TLS treten auf. Da für beide Substanzen keine *breakpoints* festgelegt sind kann eine Resistenz nicht unmittelbar definiert werden. Beiden Substanzen wird jedoch eine limitierte Wirkung auf Gram-negative Organismen zugeschrieben (Kardos and Demain 2011; Knothe 1977). Auch für FLL sind keine spezifischen *breakpoints* bekannt obwohl es zur Behandlung von Enterobacteriaceae-Infektionen in der Landwirtschaft zum Einsatz kommt (Schwarz et al. 2004).

Das Auftreten resistenter Isolate bei den Enterococcaceae zeigt ebenfalls wenig Schwankungen zwischen Eingangs- und Ausgangsproben. Der Hauptteil der Isolate, zwischen 95 % und 87 %, ist sensibel gegenüber den Substanzen AMX und ENR. Beide Antibiotika kommen zum Einsatz in der Behandlung von *Enterococcus*-Infektionen im humanmedizinischen Bereich, haben jedoch nur wenig Anwendung in der Veterinärmedizin (GERMAP 2012).

Tetrazyklin- und Trimethoprim/Sulfonamid- Resistenzen sind in der Familie am stärksten ausgeprägt. Tetrazyklinresistente Enterococcaceae machen zwischen 28 % und 21 % der Isolate aus. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien, die eine große Verbreitung dieser mobilen Re-

sistenzen beschreiben (Teuber 2001). Weitere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen hohen Kupfer- und Zinkkonzentrationen und der Vermehrung und Persistenz tetrazyklinresistenter Bakterien, insbesondere Enterocci (Yazdankhah, Rudi, and Bernhoft 2014). Silveira et al. (2014) demonstrieren anhand einer PCR-basierten Studie die Kupfer-induzierte Persistenzförderung multiresistenter Bakterien und die genetische Assoziation von Kupfertoleranz- und Antibiotikaresistenzmarkern in *Enterococcus*. 77%-95 % der Isolate sind resistent gegenüber den T/S und SMO. Sowohl SMO- als auch Trimethoprimresistenzen können über genetische Elemente erworben werden, während einige Spezies wie *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* inhärent resistent gegenüber SMO sind (Leclercq et al. 2013; Panpan Gao et al. 2012; J. Xu, Gallert, and Winter 2007). Das Kombinationspräparat T/S hemmt zwei aufeinanderfolgende Schritte in der Folat-Synthese und wirken bakterizid auf ein breites Spektrum von Bakterienspezies. Enterokokken sind jedoch in der Lage Folsäure aus der Umgebung, insbesondere Komplexmedien, aufzunehmen und somit die Wirkung von T/S zu umgehen (Hollenbeck and Rice 2012). Eine Aussage zur Resistenz gegenüber OXA, TLS und FLL kann aufgrund mangelnder Grenzwerte nicht erbracht werden. Festzuhalten ist jedoch wiederum eine gleichbleibende Verteilung in Eingangs- und Ausgangsproben.

Bisweilen deutliche Schwankungen zwischen Eingangs- und Ausgangswerten bei der Betrachtung der Staphylococcaceae im Antibiogramm werden durch die stark erniedrigte Isolatzahl (n=3) in Ausgangsproben verursacht. Sensible Isolate dominieren die Eingangsproben von 100 % gegenüber TET und 95 % gegen ENR bis hin zu 60 % gegenüber OXA. OXA ist ein Schmalspektrumantibiotikum, das aufgrund seiner Penicillinase-Festigkeit vornehmlich zur Behandlung von *Staphylococcus*-Infektionen eingesetzt wird (McDougal et al. 2003; Lee 2003). 77 % der Isolate sind sensibel für die Wirkung von T/S während der Umbruchspunkt für SMO wiederum außerhalb des Konzentrationsspektrum liegt. Diverse Studien empfehlen T/S zur alternativen Behandlung multi- und methicillinresistenter *Staphylococcus spp.* im klinischen Bereich (Lee 2003; Grim et al. 2005; Rubin, Ball, and Chirino-Trejo 2011). Ein Resistenzvorkommen von 30 % für OXA und 23 % für SMO in Proben landwirtschaftlicher Abwässer bildet jedoch riskantes Reservoir dieser Resistenzfunktionen.

221 Isolate der Bacillaceae mit 56 Isolaten aus Eingangsproben und 165 Isolaten aus Ausgangsproben wurden betrachtet. Die häufigsten Gattungen sind *Bacillus*, *Lysinibacillus* und *Oceanobacillus*. Das Antibiogramm der Bacillaceae zeigt ein gleichmäßiges Bild mit minimalen Schwankungen zwischen Eingangs- und Ausgangsproben. Isolate mit Wachstum im „resistenten“ Bereich der Antibiotikakonzentration stellen für jedes Antibiotikum den geringsten Anteil mit Werten zwischen 6 % und 22 % dar. Trotz einer natürlichen Unempfindlichkeit gegenüber Sulfonamiden und Tetrazyklinen zeigen diverse Studien den Nachweis von Resistenzgenen sowohl in *B. anthracis* als auch *B. subtilis* (Valderas, Bourne, and Barrow 2007; Panpan Gao et al. 2012; Slock et al. 1990).

Ein ähnliches Bild geringen Wachstums auf hohen Antibiotikakonzentrationen ergibt sich für Clostridiaceae und Actinobacteriaceae. Jedoch zeigen Isolate der Clostridiaceae eine deutlich höhere Konzentrationstoleranz für T/S und SMO als jedes andere Antibiotikum. Xanthomonadaceae und Pseudomonadaceae hingegen zeigen sehr unterschiedliche Toleranzen für verschiedene antibiotische Substanzen. Der häufigste Vertreter der Xanthomonadaceae *Stenotrophomonas maltophilia* zeigt Unempfindlichkeiten für die Antibiotika AMX, OXA TLS und SMO. Diverse Studien zeigen, dass der nosokomiale Erreger diverse intrinsische und erworbene Resistenzen aufweisen kann (Tsiodras et al. 2000; Alonso and Martínez 1997; Crossman et al. 2008; Hu et al. 2011).

Zwar kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine vollständige Inaktivierung oder Eliminierung resistenter Bakterien durch die komplexen Prozessbedingungen in Biogasanlagen nicht bewiesen, die Anreicherung resistenter bzw. pathogener Organismen jedoch ausgeschlossen werden. Aminov & Mackie (2001) zeigen über den Nachweis von Tetrazyklin-Resistenzgenen in Rinderfäzes die nicht mit Tetrazyklin belastet sind die Möglichkeit der Kreuzselektion durch andere Antibiotika aufgrund assoziierter genetischer Lokalisation von Resistenzgenen auf mobilen Elementen. Den selben kreuzselektierenden Effekt können Schwermetallresistenzen ausüben (Silveira et al. 2014; Yazdankhah, Rudi, and Bernhofs 2014). Diverse Studien zeigen, dass sowohl intrinsische als auch erworbene Resistenzgene auch ohne antibiotischen Druck überdauern, ohne Fitnessverluste zu verursachen bzw. in Einzelfällen die Fitness des Organismus zu erhöhen (Salysers and Amabile-Cuevas 1997; Luo et al. 2005; Enne et al. 2005).

4.3.2 Vorkommen und Verbleib von Antibiotikaresistenzgenen

Tetrazykline und Sulfonamide finden in der deutschen Landwirtschaft den größten Einsatz. Rückstände der Substanzen lassen sich in zehn der untersuchten Anlagen finden und ihre Resistenzen und Resistenzgene lassen sich sowohl in landwirtschaftlichen Abwässern als auch nachgelagerten Umweltkompartimenten nachweisen (Spielmeyer, Ahlborn, and Hamscher 2014; Thiele-Bruhn and Beck 2005; Kyselková, Kotrbová, et al. 2015; M. S. Smith et al. 2004; Panpan Gao et al. 2012; GERMAP 2012).

Zur Klärung der Verbreitung und des Prozesseinflusses wurden zwölf Tetrazyklin- und drei Sulfonamidresistenzgene qualitativ in Gesamt-DNA-Extrakten von Substrat- und Gärrestproben der fünfzehn BGA aus dem *screening* 2012 und zu fünf Probenahme-Zeitpunkten der BGA1, BGA8 und BGA15 nachgewiesen.

Der Vergleich der Anlagen zeigt neben ähnlichem Aufkommen von Resistenzgenanzahlen Unterschiede im Spektrum der ARG. Substrat- und Gärrest unterscheiden sich jedoch weder spektrisch noch im Aufkommen von ARG in den einzelnen Biogasanlagen. Ein Anlagen-spezifisches Spektrum von ARG kann auf die Anwesenheit von Antibiotikarückständen, aber hauptsächlich auf die Substratzusammensetzung zurückzuführen sein. Aminov & Mackie (2001) und Chee-Sanford et al. (2001) beschreiben ein vermehrtes Aufkommen von *tetW* und *tetO* in Schweine- und Rindergülle während *tetM* überwiegend in Schweine- und *tetQ* in Rindergülle detektiert wird.

In der vorliegenden Studie sind *tetW* und *tetM* ubiquitär sowohl in Anlage mit Mischsubstrat als auch reiner Rinder-, Milchviehgülle (BGA9, BGA11) und reiner Schweinegülle (BGA13) nachweisbar. *tetQ* allerdings ist weniger verbreitet und kommt in BGA13 (Schweingülle) sowie BGA12 (Geflügelmast, Legehennen) nicht vor. Eine erhöhte Diversität der ARG in Proben mit Schweinemist-Anteil, wie von Yu et al. (2005) beschrieben kann nicht bestätigt werden. Unterschiede im Spektrum der ARG in Eingangs- und Ausgangsproben einzelner Anlagen treten deutlich stärker in den disjunkten Proben des *screenings* 2012 als denen des Jahresgangs, der Verweilzeiten in den Anlagen berücksichtigt und einen direkten Bezug zwischen Substrat und Gärrest ermöglicht, auf. Aber auch der Eintrag von ARG durch NaWaRo in die Gärrestproben ist denkbar. Der Nachweis zusätzlicher ARG in den Gärresten wie sie sowohl im *screening* 2012 als auch vereinzelt in Proben des Jahresgangs auftritt kann durch den Eintrag der NaWaRo erfolgen. Aminov & Mackie (2001) zeigen in einer Analyse unterschiedlicher Kompartimente eines Schweinemastbetriebs, dass auch Einstreu und Futtermittel wie Maissilage und Soja Tetrazyklinresistenzgene tragen, die in ihrem Spektrum von denen der Fäzesproben abweichen. Diverse Studien zeigen, dass auch in Lebensmitteln kommensale Bakterien und Enterococci mit ARG, insbesondere Tetrazyklinresistenzgenen vorkommen (Wang et al. 2006; Wilcks et al. 2005; Huys et al. 2004). Dies erklärt sowohl den

Eintrag als auch das abweichende Spektrum der ARG in BGA7, deren Substrat zu weniger als 1 % aus tierischen Abwässern oder NaWaRo zusammengesetzt ist.

Chopra & Roberts (2001) und Roberts (2005) beschreiben Assoziationen zwischen Trägerbakterien und ARG, die jedoch aufgrund Mechanismen des horizontalen Gentransfers und selektiven Drucks nicht stagnant sind und sich langfristig weiter ausbreiten. Deutlich wird jedoch, dass ARG wie *otrA* und *tetX*, die ein sehr enges Trägerspektrum im grampositiven Bereich aufweisen besonders selten bzw. nicht detektiert werden. Abweichend davon wird *tetT* sowohl in der vorliegenden als auch weiteren Studien ubiquitär isoliert und scheint nicht wie von Roberts (2005) beschrieben auf den Trägerorganismus *Streptococcus spp.* begrenzt zu sein (Stine et al. 2007; Wu et al. 2010). Wie am Beispiel *tetW* mit der Zuordnung von zwei Trägerorganismen in 2001 und 19 in 2005 kann ein ARG sich aufgrund seiner genetischen Lokalisation sehr schnell und interspezifisch verbreiten (Chopra and Roberts 2001; M. C. Roberts 2005). Die ARG *tetA*, *tetG*, *tetO* und *tetC*, werden gemäß ihrem moderaten Trägerspektrum in den Anlagen detektiert. Auch ein leicht erhöhter Nachweis in Eingangsproben lässt sich durch ihr Gram-negatives Spektrum an Trägerorganismen erklären, ebenfalls überwiegend aus Substratproben isoliert wurden (Chopra and Roberts 2001; M. C. Roberts 2005). Im Gegensatz zu den Sulfonamidresistenzgenen *sul1* und *sul2*, die aufgrund ihrer Lokalisation auf transponablen genetischen Elementen und mobilen Plasmiden mit einem weiten Trägerspektrum verknüpft sind und in allen Anlagen, mit Ausnahme von BGA 7E, gefunden wurden, konnte *sul3* mit einer eingeschränkten Verbreitung, in keiner Anlage gefunden werden (H Heuer et al. 2004; Byrne-Bailey et al. 2009).

Die qualitative Analyse von ARG zeigt weder einen Einfluss nachgewiesener Antibiotikarückstände wie in BGA1, BGA3 und BGA15, noch eine deutliche Divergenz zwischen Anlagen mesophiler oder thermophiler Betriebsform. Selbst BGA7 und BGA9, mit den Substraten Lebensmittelabfall und ökologisch erwirtschafteter Milchviehgülle stechen weder durch Anzahl noch ihr Spektrum an ARG aus dem Muster der restlichen Anlagen heraus. Tetrazyklin- und Sulfonamidresistenzgene kommen ubiquitär in landwirtschaftlichen Abwässern vor und verbleiben auch ohne spezifischen Selektionsdruck weitgehend unverändert. Kyselková et al. (2015) zeigten in einem Mikrokosmos-Experiment unter Verwendung von drei Grünlandböden verschiedener Herkunft, die mit Abwässern konventionellen Milchviehs sowie unterschiedlichen Dosen Chlortetrazyklin inkubiert wurden, dass die Beschaffenheit des Bodens nicht aber die antibiotische Dosis die Persistenz des Resistenzgens maßgeblich beeinflusst. Die Gene verursachen keine Fitnessseinbußen für Trägerorganismen und können wie bereit beschrieben durch ihre genetische Lokalisation mit anderen fitnesssteigernden Faktoren wie weiteren Antibiotikaresistenzgenen und Schwermetallresistenzgenen assoziativ verbreitet werden (Silveira et al. 2014; Yazdankhah, Rudi, and Bernhoft 2014; Salyers and Amábile-Cuevas 1997; Luo et al. 2005; Enne et al. 2005).

Screening nach Tetrazyklin- und Sulfonamide-Resistenzgenen ausgewählter Isolate aus landwirtschaftlichen Abwässern

Enterobacteriaceae- und Enterococcaceae-Isolate, sowohl des *screenings* 2012 aus BGA8-BGA11 als auch der Fermenterstudie mit Substrat der BGA14 und BGA15, wurden auf zwölf Tetrazyklin- und drei Sulfonamidresistenzgene getestet um zu erfassen welchen Anteil potentiell pathogene Bakterien dieser Familien an dem ubiquitären Resistenzgen-Vorkommen der Kultivierungsunabhängigen Untersuchungen haben.

Isolate der Enterococcaceae die aus dem *screening* 2012 gewonnen wurden zeigen keins der untersuchten Sulfonamidresistenzgene. Wie bereits beschrieben resultiert ihre Unempfindlichkeit gegenüber Sulfonamiden aus einem intrinsischen Mechanismus die Folsäuresynthese zu umgehen (Leclercq et al. 2013). Dennoch finden Byrne-Bailey et al. (2009) in resistenten *Enterococcus spp.*-Isolaten aus Schweinegülle und -schlachtabfällen die Gene *sul2* und *sul3* genau wie Isolate

aus der Fermenterstudie mit Substrat der BGA14 und BGA15. Wu et al. (2010) erklären das Auftreten der Resistenzgene durch ihre genetische Assoziation mit Genen die Unempfindlichkeit gegen andere Antibiotika wie Tetrazyklin und Ampicillin vermitteln.

Es finden sich sowohl Enterococcaceae mit nachweisbarer Tetrazyklinresistenz ohne Resistenzgene wie auch sensible Isolate, die genetische Resistenzmarker tragen unter den Isolaten. Schon 2005 beschrieb Roberts 38, Lin et al. (2015) 44 charakterisierte Tetrazyklinresistenzgene von denen nur eine Auswahl von 12 in dieser Studie betrachtet werden, so dass eine vollständige Abdeckung der Resistenzgenmarker nicht möglich ist. Doch auch der genetische Nachweis eines Resistenzmarkers lässt noch keine Aussage über Vollständigkeit oder Funktionalität des Resistenzgens zu.

Für *Enterococcus* spp. waren in 2005 die ARG *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* und *tetU* bekannt während eine aktualisierte Form des Reviews zusätzlich *tetT* aufzählt (I. Chopra & Roberts 2001; Roberts 2005). Die vorliegende Studie konnte zusätzlich auch die Gene *tetA*, *tetB*, *tetG*, *tetX* und *tetW* detektieren, die für Enterococcaceae bisher noch nicht beschrieben wurden. Obwohl eine Prävalenz von *E. faecalis* und *E. faecium* als Trägerorganismen der Tetrazyklinresistenzgene mehrfach beschrieben ist zeigt die vorliegende Studie ARG ebenfalls in *E. pseudoavium*, *E. hirae* und *E. asini* (R I Aminov and Mackie 2001; Ramos et al. 2012).

Eine Resistenz der Enterobacteriaceae-Isolate gegen SMO ist nicht für jedes Isolat auszuschließen, da der *breakpoints* außerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs liegt. Dennoch trugen nur 11 der Isolate im intermediären Bereich Sulfonamidresistenzgene. *M. morganii*, in der Literatur mehrfach als intrinsisch resistent beschrieben zeigt sich sowohl für SMO als auch T/S und TET sensibel trotz der Resistenzmarker *tetA* und *tetT* (Leclercq et al. 2013). Die Verbreitung von Sulfonamid- und Tetrazyklinresistenzgenen in Enterobacteriaceae wird von diversen Studien beschrieben (Srinivasan et al. 2008; Ibekwe, Murinda, and Graves 2011; Carattoli 2009). Chopra & Roberts (2001), Roberts (2005) und Lin et al. (2015) beschreiben einen immer ansteigenden *pool* von Tetrazyklinresistenzgenen für gramnegative Organismen. Die vorliegende Studie konnte zusätzlich zu den bereits bekannten Genen *tetG*, *tetS* und *tetT* in *Serratia* spp., sowie *tetA*, *tetB*, *tetX* und *tetT* in *Rahnella* spp. detektieren. Wie bereits beschrieben lässt sich die große Verbreitung von Tetrazyklinresistenzgenen durch ihre Codierung auf Plasmiden, Transposons und Integrans zurückführen (Chopra and Roberts 2001; Salyers and Amábile-Cuevas 1997). Dies erklärt ebenfalls den Nachweis von Resistenzgenen in Bakterien die in der Literatur als intrinsisch resistent beschrieben werden wie *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. heimbachae* und *M. morganii* (Leclercq et al. 2013; Rubin 2013). Wie bei der Analyse der Enterococcaceae treten erneut Isolate auf die trotz positiver Ergebnisse für Tetrazyklinresistenzgene keine phänotypische Resistenz ausbilden somit kann die molekulargenetische Methode zwar einen Überblick verschaffen, jedoch nicht als hinreichender Beweis für funktionelle Resistenz dienen.

Sowohl Isolate der Enterobacteriaceae als auch Enterococcaceae zeigen eine andere Verteilung des Spektrums an Tetrazyklinresistenzgenen als die kultivierungsunabhängige Analyse. Besonders deutlich wird dies in Isolaten der Fermenterstudie, die durchschnittliche 0,8 ARG trugen. Noch deutlicher wird die Divergenz zwischen Isolaten der Schlüsselbakterien und des Gesamtspektrums für die Sulfonamidresistenzgene, da die ubiquitären Gene *sul1* und *sul2* kaum wiedergefunden werden. Auch ein Rückgang der Resistenzgene in Ausgangsproben lässt sich nur auf Ebene der Isolate festhalten. Trotz eines großen Reservoirs an Sulfonamid- und Tetrazyklinresistenzgenen in landwirtschaftlichen Abwässern zeigen die Ergebnisse eine geringe Prävalenz dieser spezifischen Gene in klinisch relevanten Bakterien und zudem einen reduzierenden Einfluss der Prozessbedingungen der Biogasanlagen.

4.4 ERMITTLUNG DES EINFLUSSES BIOTECHNOLOGISCHER VERFAHREN AUF VORKOMMEN UND DIE PERSISTENZ VON ANTIBIOTIKARESISTENZGENEN IN LANDWIRTSCHAFTLICHEN ABWÄSSERN

Die Tetrazyklinresistenzgene *tetA*, *tetM*, *tetO* und das Sulfonamidresistenzgen *sul2* finden weite Verbreitung im landwirtschaftlichen Sektor und lassen sich in klinisch relevanten Bakterien wie Enterobacteriaceae und Enterococcaceae detektieren (M. C. Roberts 2005; Travis et al. 2006; Poeta et al. 2007; A. P. Roberts and Mullany 2009). Die Auswahl der ARG erfolgte auf Grundlage ihres ubiquitären Vorkommens in qualitativen Untersuchungen der vorliegenden Studie und zur Einbezugnahme der prävalenten Tetrazyklinresistenz-vermittelnden Mechanismen, Efflux-Pumpe und RPP, sowie eines Sulfonamidresistenz-vermittelnden Gens. Die quantitative Bestimmung dieser Gene in Substrat und Gärrest der 15 Biogasanlagen, sowie in einer Fermenterstudie ermöglicht sensible Veränderungen, verursacht durch Prozessbedingungen der Anlagen und antibiotisch wirksame Rückstände wie Antibiotika und Schwermetalle, darzustellen.

4.4.1 Grundlegender Status von Verteilung und Persistenz von Antibiotikaresistenzgenen in landwirtschaftlichen Abwässern

Das stichprobenhafte *screening* von Substrat und Gärrest 15 deutscher BGA sowie die Betrachtung des Jahresgangs der BGA1, BGA8 und BGA15 zeigt die Belastung der Abwässer unterschiedlicher landwirtschaftlicher Betriebssysteme mit einer Reihe relevanter Antibiotikaresistenzgene. Proben der Biogasanlagen 1 bis 15 wurden quantitativ auf die ARG *sul2*, *tetA*, *tetM* und *tetO* untersucht.

Sul2 wird mit der höchsten mittleren Kopienzahl in allen Anlagen quantifiziert. Wie zuvor erwähnt sind sowohl *sul2* als auch *sul1* aufgrund ihrer Lokalisation auf Plasmiden und mobilen genetischen Elementen mit einem weiten Trägerspektrum verknüpft (H Heuer et al. 2004; Byrne-Bailey et al. 2009; Sköld 2000). Wolters et al. (2016) zeigen erhöhte Werte von *sul2* und *tetM* in Gülle durch die Bestimmung der relativen Häufigkeit von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen in Gemeinschafts-DNA aus Gülle, Fermentern und Gärresten von acht realen Biogasanlagen mittels *realtime* PCR. Heuer et al. (2009) demonstrieren anhand der Sulfadiazin-Behandlung zweier landwirtschaftlicher Böden neben der drastischen Zunahme von *sul2*-Kopien in Gesamt-DNA auch ihre genetische Affiliation zu selbst-transferierenden *replicons* die aus *E. coli* isoliert werden können. Eine gesteigerte Kopienzahl von *sul2* durch den Einfluss von Sulfonamidantibiotika kann auch in der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen werden. BGA15 weist neben den größten Mengen Sulfamethazin auch die höchsten Kopienzahlen des Gens auf (Spielmeyer, Ahlborn, and Hamscher 2014). Entgegen dieser These zeigen BGA2 und BGA3 trotz quantifizierbarer Sulfonamidkonzentrationen jedoch keinen Effekt im Niveau des Resistenzgens (Spielmeyer, Ahlborn, and Hamscher 2014). Trotz unterschiedlicher Trägerorganismenspektren werden *tetM* und *tetA* durchschnittlich im gleichen Bereich quantifiziert. Chopra & Roberts (2001) und Roberts (2005) weisen *tetA* ein Spektrum ausschließlich im gramnegativen Bereich, inklusive Vertretern der Enterobacteriaceae zu, während *tetM* zusätzlich durch eine Reihe grampositiver Bakterien wie *Bacillus spp.* und *Clostridium spp.* Verbreitung finden kann. Das kopien-schwächste ARG *tetO* wird sowohl mit gramnegativen als auch -positiven Organismen assoziiert, jedoch nicht in abundanten Familien wie Bacillaceae und Clostridiaceae gefunden. Die Förderung von Tetrazyklinresistenzgenen durch Antibiotikagaben kann erneut nur in BGA15 positiv bewertet werden. BGA1 und BGA3 weisen deutlich höhere Konzentrationen von Chlortetrazyklin und Tetrazyklin auf während die Kopienzahlen der Resistenzgene im oberen Mittel liegen und sich nur wenig von denen nicht Antibiotika-belasteter Analgen unterscheiden (Spielmeyer, Ahlborn, and Hamscher 2014). Auch BGA9, die einem ökologisch arbeitenden Milchviehbetrieb untersteht und

12 Jahre vor der Probenahme in 2012 den letzten Antibiotikaeinsatz belegen kann zeigt ein Resistenzgenlevel, das, dem konventioneller Anlagen nicht nachsteht. Besonders deutlich wird dies für *tetM*, dessen Funde mit denen der Anlagen BGA3 und BGA5 vergleichbar sind. Spielmeyer et al. (2014) weisen sowohl in BGA3 als auch BGA5 Rückstände von Chlortetrazyklin und Tetrazyklin in teilweise quantifizierbaren Konzentrationen nach. BGA7 weist neben BGA12 im Gegensatz zu den restlichen Anlagen deutlich weniger ARG-Kopienzahlen auf. Begründet liegt dies im Substrat der Anlage die abgesehen von weniger als 1 % Rindergülle ausschließlich mit Lebensmittelabfällen beschickt wird. Abriouel et al. (2008) zeigen anhand einer vergleichenden Studie von *Enterococcus* spp. -Isolaten aus Gemüse und Obst, Wasser und Boden sowie klinischen Proben in Spanien eine sehr geringe und deutlich abweichende Belastung der Lebensmittel durch Resistenzgene. Demnach ist davon auszugehen, dass Lebensmittelreste eine erheblich geringere und deutlich unterschiedliche mikrobiologische Belastung tragen als tierische Abwässer. Auch BGA12 zeigt eine außergewöhnliche Substratbeschaffenheit aus Geflügelmist und einem großen Anteil Maissilage, ohne den Zusatz weiterer tierischer Abfälle. Der Einfluss hoher Kupfer -und Zinkkonzentrationen kann nicht abschließend geklärt werden. Zwar zeigt BGA15 mit den durchweg höchsten Kopienzahlen ebenfalls erhöhte Metallkonzentrationen. BGA2 und besonders BGA6 zeigen jedoch trotz mitunter höherer Metallgehalte keine auffällig erhöhten Resistenzgenvorkommen. BGA12 hingegen weist deutlich höhere wässrige Verfügbarkeit als jede andere Anlage auf, zeigt jedoch sehr geringe Kopienzahlen, die denen der BGA7 gleichkommen und sie mitunter unterschreiten. Ein verzögerter Anstieg der Resistenzgenzahlen aufgrund eines punktuellen Aufkommens hoher Metallkonzentrationen wie in BGA6 im Gegensatz zu gleichbleibenden Kopienzahlen in Anlagen dauerhaft moderater Metallwerte aufgrund von Co-Selektion ist jedoch denkbar (Yazdankhah, Rudi, and Bernhoft 2014; Silveira et al. 2013). Hölzel et al. (2012); Tuckfield & McArthur (2008) und Stepanauskas et al. (2005) weisen auf abnehmende Antibiotikaresistenz in Anhängigkeit von steigenden Schwermetallkonzentrationen hin.

Zwar zeigen diverse Studien eine direkte Korrelation steigender und abfallender Kopienzahlen von ARG in landwirtschaftlichen Abwässern mit hohen Antibiotikakonzentrationen sowie dem nachlassenden Selektionsdruck nach Eliminierung der Antibiotika so werden diese Zusammenhänge nicht von der vorliegenden Studie unterstützt (Pin Gao, Munir, and Xagorarakis 2012; Pei et al. 2006; Andersson 2006). Vielmehr zeigen sich ARG ubiquitär auf hohem Niveau weitgehend unabhängig von selektiven Faktoren wie Antibiotika und Schwermetalle (Kyselková, Kotrbová, et al. 2015; H Heuer et al. 2004; Byrne-Bailey et al. 2009). Einen deutlicheren Einfluss scheinen die komplexen Parameter der Substratzusammensetzungen und -lagerung und damit einhergehende Unterschiede und Fluktuationen in der bakteriellen Population zu haben (Klocke et al. 2007; Weiss et al. 2008; J. K. Nicholson, Holmes, and Wilson 2005; Levén, Eriksson, and Schnürer 2007).

4.4.2 Beurteilung des Rückhaltungspotentials von Biogasanlagen für Antibiotikaresistenzgene in landwirtschaftlichen Abwässern

Die quantitative Bestimmung von ARG in Substrat und Gärresten fünfzehn realer Biogasanlagen im *screening* 2012 und drei Anlagen über den Jahresgang 2013 ermöglicht die Aufklärung des hygienisierenden Potentials von Biogasanlagen als biotechnologische Barriere für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen in Agrarland und Umwelt.

Im Durchschnitt werden alle der betrachteten ARG in einer niedrigeren Kopiedichte und anderen Verteilung in Ausgangsproben nachgewiesen. Diverse Studien bestätigen den reduzierenden Effekt der anaeroben Fermentation auf ARG (Juliana Alves Resende et al. 2014; J. Chen et al. 2010b). Jedoch zeigen nicht alle der untersuchten Resistenzgene das gleiche Reduktionspotential. Anders als in Eingansproben tritt *tetM* mit der höchsten Kopienzahl auf, während *su12* nur an

zweiter Stelle kommt. Beide ARG unterlaufen einer durchschnittlichen Reduktion über alle Anlagen von 80 %. *TetA* kommt in niedrigeren Kopienzahlen vor und wird auch deutlich weniger reduziert mit einer Frequenz von durchschnittlich 65 %. Das kopienschwächste ARG *tetO* erfährt auch die geringste Reduktion von 30 %. In einer vergleichenden Studie zur Reduktionseffizienz in 2010 zeigen Chen, Frederick C. Michel, et al. neben variablen Grundleveln von ARG auch Unterschiede in den Empfindlichkeiten der ARG gegenüber verschiedener Abwasserbehandlungssysteme. Während Erythromycinresistenz-vermittelnde Gene wie *ermX* schnell reduziert werden persistiert insbesondere das einzige Tetrazyklingen in der Studie, *tetG*, deutlich widerstandsfähiger. Auf Fallebene betrachtet zeigen 27 Ausgangsproben eine geringere Kopienzahl und 33 Ausgangsproben eine höhere Kopienzahl als die entsprechenden Eingangsproben. Während *sul2* nur in fünf Anlagen keine Reduktion erfährt werden die anderen Gene in neun bis 10 Anlagen unvermindert in Ausgangsproben gefunden. Ein ähnliches Ergebnis finden Hölzel et al. (2010) in einer Analyse von Antibiotika und Tetrazyklinresistenzgenen in Schweinegülle. Die ARG *tetM* und *tetO* zeigten eine dynamischere Beziehung zu Antibiotikakonzentrationen als andere im Konzentrationslevel stabilere Tetrazyklingene. Derart unterschiedliche Reaktionen bestimmter ARG sowohl zu Selektionsfaktoren als auch Abwasserbehandlungsmethoden kann auf ihre genetische Lokalisierung zurückzuführen sein. ARG können auf chromosomalen genetischen Elementen, wie Transposons, Intergons und diversen Plasmidtypen etc. codiert sein, die durch spezifische Mobilität und Trägerorganismen eine sehr variable Verbreitung generieren (Holger Heuer, Schmitt, and Smalla 2011; Garcia-Vallvé, Romeu, and Palau 2000; C. T. T. Binh et al. 2008; Witte 2000). Jahreszeitliche Einflüsse auf die Reduktionseffizienz der ARG wie sie durch Temperaturveränderung, Antibiotikaanwendung, Veränderungen in Futtermittel, NaWaRo und Bakterienpopulation auftreten können nicht bestätigt werden. Die untersuchten Biogasanlagen unterscheiden sich mitunter deutlich in der Reduktionseffizienz der ARG. Die vier Anlagen BGA1 und BGA13-BGA15 zeigen eine deutliche Reduktion der Kopienzahlen für jedes untersuchte ARG. Für alle dieser Anlagen außer BGA15, deren maximale Reduktion bei *tetA* zu sehen ist, erfolgt die stärkste Reduktion bei *sul2*. BGA2-BGA4, BGA9 und BGA11 zeigen nur für ein bis drei ARG eine Reduktion während andere ARG stabil bleiben oder vermehrt auftreten. BGA5-8 und BGA12 zeigen für keins der ARG eine Reduktion in Ausgangsproben. In diesen Anlagen sind alle ARG verstärkt im Ausgang amplifiziert worden, besonders deutlich wird dies in BGA7 mit einer Zunahme der ARG zwischen ein bis zwei Größenordnungen. In Ausgangsproben lässt sich jedoch in allen Anlagen eine geringere Abweichung insbesondere für *tetA* und *sul2* vom Mittelwert erkennen. Insbesondere mit Hinblick auf die Daten der ökologischen Anlage BGA9 liegt die Vermutung nahe, dass ein Grundlevel an ARG in der mikrobiellen Population stabil bleibt. Die mikrobiologische Zusammensetzung einer Fermentergemeinschaft mit 36 % Clostridia, 11 % Bacilli und 10 % Archaea beschreiben Wirth et al. (2012). Trotz einer natürlichen Unempfindlichkeit gegenüber Sulfonamiden und Tetrazyklinen zeigen diverse Studien den Nachweis von Resistenzgenen sowohl in *Bacillus* spp. als auch *Clostridium* spp. (Valderas, Bourne, and Barrow 2007; Panpan Gao et al. 2012; Slock et al. 1990; Chopra and Roberts 2001; M. C. Roberts 2005). Garcia-Vallvé et al. (2000) zeigen, dass auch ein Gentransfer der ARG von Bakterien zu Archaea möglich ist trotz einer intrinsischen Unempfindlichkeit der Archaea für die meisten Antibiotika, darunter auch Sulfonamide und Tetrazykline (Allers and Mevarech 2005). Auch Kazimierczak et al. (2009) können durch eine metagenomische Analyse im Darm ökologisch produzierter Schweine Tetrazyklinresistenzgene nachweisen und formulieren die Hypothese, dass ihre Assoziation zu putativ mobilen genetischen Elementen die Überdauerung in antibiotikafreiem Milieu, gepaart mit geringen oder eliminierten Fitnessseinbußen für Trägerbakterien ermöglicht. Doch die Persistenz stabiler Kopienzahlen lässt sich auch durch den Ein-

fluss sehr geringer Antibiotikakonzentrationen erklären. Jutkina et al. (2016) gelingt es über einen Kultur-basierten Ansatz, mit der bakteriellen Gemeinschaft aus behandelten Abwässern als Spender Resistenz-vermittelndem genetischen Materials und *E. coli* als Empfänger, die minimale Konzentration des Stressors Tetrazyklin, die zur Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen veranlasst aufzudecken. Sehr niedrige Konzentrationen des Antibiotikums, deutlich unter der MHK des empfangenden Bakteriums führen zur horizontalen Übertragung von ARG, während höhere hingegen tetrazyklinresistente Phänotypen begünstigen und mit einem Rückgang der genetischen Übertragungsereignisse einhergehen. Stark variable Ergebnisse von Eingangs- und Ausgangsproben der gleichen Anlage sind unter anderem auf den stichprobenhaften Charakter der Probenahme in 2012, ohne direkte Korrelation zwischen den Probensets zurückzuführen. Im Jahresgang unter Berücksichtigung einer mittleren Verweilzeit von ca. 60 Tagen ergibt sich für alle drei Anlagen ein anderes Bild mit einer Reduktion der ARG in 80 % der Fälle. Ein Zusammenhang zwischen Prozessbedingungen und der spezifischen Reduktionseffizienz der Anlagen lässt sich für das *screening* nicht eindeutig formulieren. Im Jahresgang allerdings stellt sich ein Zusammenhang zwischen Antibiotikafunden und erhöhten Resistenzgenlevel mit einem Maximum in BGA15 heraus (Spielmeyer, Ahlborn, and Hamscher 2014). BGA1, in der ebenfalls AB nachgewiesen wurden zeigt höhere Kopienzahlen als BGA8, die antibiotikafrei ist (Spielmeyer, Ahlborn, and Hamscher 2014). Weiterhin fällt auf, dass Anlagen mit hohen Kopienzahlen auch eine stärkere Reduktion der ARG über den Prozessdurchlauf erfahren. Während die Reduktion bei BGA15 noch 90 % beträgt werden ARG in BGA1 um 80 % und BGA8 nur noch um 60 % reduziert.

Auch Diehl & LaPara (2010) zeigen in einer Laborfermenterstudie mit Feststoffen humaner Abwässer statistisch signifikante Verringerungen unter anderem von *tetA* und *tetO* in anaeroben Reaktoren bei 37 °C, 46 °C und 55 °C, wobei die Entfernungsraten als Funktion der Temperatur zunehmen. Eine stärkere Reduktion in den thermophilen Anlagen BGA11 und, BGA12 kann durch die Stichprobenahme in 2012 jedoch nicht bestätigt werden. Im Gegenteil verzeichnet BGA12 deutlich höhere Kopienzahlen für *tetA*, *tetM* und *sul2* in der Ausgangsprobe. Die variable Verbreitung aufgrund abweichender genetischer Lokalisation der Resistenzgene erklärt ebenfalls das Auftreten unterschiedlicher Empfindlichkeiten gegenüber den Prozessbedingungen und anderer selektiver Parameter in den verschiedenen Biogasanlagen. Doch auch losgelöst von spezifischen Anlagenparametern und selektiven Faktoren wie Antibiotika und Schwermetalle verändert sich der mikrobielle Zustand von Gülle und Mist permanent, da anaerobe Gattungen wie *Clostridium* sich im anaeroben Medium weiter verbreiten (Leung und Topp 2001) und andere Bakterien wie Enterobacteriaceae und Enterococcaceae abnehmen bis sie über Durchmischung und Zulauf erneut eingetragen werden (C. S. Hölzel et al. 2010; Leung and Topp 2001). Auch Storteboom et al. (2002) zeigen anhand eines Vergleichs Antibiotika-belasteter Gülle eines Mastbetriebs im Gegensatz zu einem Milchviehbetrieb, dass schon minimale Güllebehandlungsmethoden wie Vermengung und Wässerung einen deutlichen Effekt auf Antibiotikakonzentrationen und auch Tetrazyklinresistenzgene haben.

Biogasanlagen eignen sich zur Reduktion ARG in mikrobiologisch stark belasteten Abwässern. Eine Eliminierung der ARG über diese Barrierefunktion zu erreichen ist jedoch aufgrund der evolutionär neutralen Eigenschaften und horizontaler Verbreitungsmechanismen unwahrscheinlich.

4.4.3 Bewertung der Übertragbarkeit von Labormaßstabsversuchen und realen Anlagen

Betrachtet wurde der Einfluss hoher Antibiotikagaben über einen kurzen Zeitraum auf das Vorkommen und die Quantität von Resistenzgenen sowie auf das Wachstum kultivierbarer Schlüsselorganismen mit besonderem Augenmerk auf die Wirkung einer biotechnologischen Barriere zur

Verminderung dieser bakteriellen Kontaminanten sowie die Übertragbarkeit der Vorgänge einer Laborstudie zu realen Anlagen.

Zwei kontinuierliche Durchflussfermenter mit definierter Zugabe von Antibiotika (AB) gegenüber eines Kontrollfermenters wurden über einen Gesamtzeitraum von 60 Tagen untersucht. Die tägliche Substratzugabe der Durchflussfermenter setzte sich zusammen aus einer Mischung von Rindergülle (von BGA15 oder BGA14 bezogen) und Maissilage (Abbildung 19). Betrachtet wurde der Einfluss hoher Antibiotikagaben über einen kurzen Zeitraum auf das Vorkommen und die Quantität von Resistenzgenen sowie auf das Wachstum kultivierbarer Schlüsselorganismen mit besonderem Augenmerk auf die Wirkung einer biotechnologischen Barriere zur Verminderung dieser bakteriellen Kontaminanten sowie die Übertragbarkeit der Vorgänge einer Laborstudie zu realen Anlagen.

Die zwei im Rahmen der Fermenterstudie durchgeführten Versuche unterscheiden sich durch das Substrat, welches aus BGA14 und aus BGA15 des *screenings* bezogen wurde. Wie im *screening* 2012 zeigt auch in der Fermenterstudie das Substrat der BGA14 trotz einseitiger Zusammensetzung (Rindermastgülle, -mist, Pferdemist) eine höhere Dichte der betrachteten Bakteriengruppen als BGA15 (Rinder-, Geflügel- und Pferdemist). Spielmeyer et al. (2014) und (2015) detektierten im *screening* der realen Anlagen 2012 Sulfonamid- und Tetrazyklinrückstände in Proben der BGA15, sowie Werte in Proben der Fermenterstudie, die das Level der Antibiotikadotierung im Rahmen der Studie deutlich überschreiten und somit höher sind als die der BGA14. Zusätzlich zeigt die Fermenterstudie eine Reduktion von Enterobacteriaceae und Enterococcaceae in Fermenter 3, der mit einer Mischung aus Tetrazyklinen dotiert wurde. Eine hemmende Wirkung moderater bis hoher Antibiotikakonzentrationen auf kultivierbare Schlüsselbakterien im Fermenter ist demnach nicht auszuschließen. REFERENZ Wirkung von TET+SMO auf Coli und Kokken im Fermenter. Alle Versuchsansätze zeigen im Mittel ein größeres Wachstum der Schlüsselbakterien im ersten Versuchsteil. Eine Abnahme kultivierbarer Bakterien bei Prozessdurchlauf, insbesondere der Enterobacteriaceae und Enterococcaceae kann bereits in Proben des *screenings* und des Jahresgangs aufgezeigt werden. Die reduzierende Wirkung der Prozessbedingungen realer Biogasanlagen auf potentiell pathogene Schlüsselorganismen wird von diversen Studien bestätigt (Sahlström 2003; Resende et al. 2014; Iwasaki et al. 2011). Iwasaki et al. (2011) untersuchten thermophile und mesophile Biogasanlagen über einen Zeitraum von 90 Tagen. Nachweisbare Zahlen coliformer und Enterococcus-Spezies können in Ausgangsproben thermophiler Anlagen nicht, in beiden mesophilen Anlagen jedoch in verminderter Anzahl erfasst werden. Beneragama et al. (2013) können die Eliminierung verschiedener multiresistenter Bakterien durch die anaerobe Vergärung landwirtschaftlicher Abwässer bei 55 °C und eine Reduktion von 90 % bei mesophilen Temperaturen zeigen. Eine Reduktion anaerober Sporenbildner bis zu einer Größenordnung kann ebenfalls in vier Anlagen des *screenings*, unter anderem auch BGA15 nachgewiesen werden. Sporenbildende Bakterien (zum Beispiel *Bacillus spp.* und *Clostridium spp.*) können jedoch Pasteurisierung und Fermentation unbeeinträchtigt überstehen und sind aktiv an der Biogasproduktion beteiligt (Bagge et al. 2010). Dies stellt sich auch im Versuchsansatz mit Substrat der BGA14 sowie den Ergebnissen der realen Anlage dar. Zeitliche Fluktuationen wie sie im Jahresgang für BGA8 beschrieben werden als auch der Einsatz von NaWaRo, die in beiden Versuchsansätzen von BGA15 bezogen wurden können jedoch auch einen Einfluss auf die Dichte anaerober Sporenbildner haben. Zusammensetzung, Lagerbedingungen und -dauer siliierter NaWaRo resultieren in veränderbaren Ladungen anaerober Sporenbildner in Kofermentern und somit zu einem komplexen und fließenden Einfluss auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in Gärrestpro-

ben (Visser et al. 2007). In kleinvolumigen Laborfermentern tritt jedoch abgesehen davon ebenfalls die Unterbrechung des anaeroben Milieus durch Sauerstoffeintrag über die tägliche Substratzufuhr auf.

Der Qualitative Nachweis von 12 Tetrazyklin- und drei Sulfonamidresistenzgenen zeigt ein ubiquitäres Vorkommen der ARG. Die Fermenter 1-3 weisen in der qualitativen Analyse gleichmäßige ARG-Muster auf. Abweichend von den Ergebnissen des *screenings* 2012 können mit Ausnahme von *sul3* alle ARG im Versuchsablauf amplifiziert werden. Ein unterschiedliches Nachweismuster zeigt sich jedoch nicht zwischen Fermenter 1-3, sondern den beiden Versuchsansätzen mit Substrat aus BGA15 und BGA14. Die Beschickung mit Substrat aus BGA15 ermöglicht den sehr gleichförmigen den Nachweis aller ARG mit Ausnahme von *tetX* und *sul3* in allen Versuchsproben, während der Ansatz mit Substrat der BGA14 den Nachweis aller ARG mit Ausschluss von *sul3* ermöglicht, jedoch ein ungleichmäßigeres Muster im Verlauf des Versuchs zeigt. Auffällig ist, dass auch ARG mit einem sehr begrenztem Spektrum an Trägerorganismen wie *otrA* und *tetX* häufig detektiert werden (Chopra and Roberts 2001; M. C. Roberts 2005). Ein homogeneres Auftreten der ARG-Funde in Proben der Fermenterstudie im Gegensatz zu *screening* oder Jahresgang ergibt sich da die Fermenter jeweils aus einer einmalig bezogenen Substratprobe gefüttert wurden. Wie in diversen Studien beschrieben deutet dies wiederum darauf hin, dass ARG die selten, in *screening* oder Jahresgang wohlmöglich gar nicht, nachgewiesen werden unterhalb der der Nachweishgrenze persistieren (Kyselková, Jirout, et al. 2015; Salyers and Amábile-Cuevas 1997; Enne et al. 2005).

Eine Zunahme der ARG-Kopien über den Versuchsverlauf kann in jedem der Fermenter festgestellt werden. Durchschnittlich sind die Kopien in der zweiten Versuchshälfte um den Faktor 2,5 (F1) bis 3,2 (F2) erhöht. Der Anstieg von ARG über den Versuchsverlauf insbesondere in Hinblick auf sinkende Antibiotikakonzentrationen kann diverse Gründe haben (Spielmeyer et al. 2015). Wie auch in der Studie realer Anlagen schon vermutet kann eine subtherapeutische Konzentration von Antibiotika den horizontalen Transfer von ARG promovieren während er bei höheren Konzentrationen stark zurückgeht und resistente Phänotypen begünstigt werden (Jutkina et al. 2016). Storteboom et al. (2002) zeigen anhand des Vergleichs Antibiotika-belasteter Gülle eines Mastbetriebs im Gegensatz zu einem weniger belasteten Milchviehbetrieb, dass Tetrazyklinresistenzgene auch mit sinkenden Antibiotikakonzentrationen ansteigen und ein Betrachtungszeitraum von mindestens vier Monaten nötig ist um stabile Kopienzahlen zu erreichen. Sowohl die Persistenz antibiotisch aktiver Degradationsprodukte der AB als auch mangelnde metabolische Kosten durch ARG für den Trägerorganismus können als Erklärung in Betracht gezogen werden (H. N. Storteboom et al. 2002; Kazimierczak et al. 2009; Luo et al. 2005; Enne et al. 2005).

Dennoch ist eine positive Korrelation von Antibiotikakonzentrationen und ARG ableitbar. Sowohl die höchsten Kopienzahlen als auch die stärkste Belastung durch Tetrazyklinantibiotika tritt in beiden Versuchsansätzen in Fermenter 3 auf, Während der Kontrollfermenter die niedrigsten Kopienzahlen aufweist. Auch der Vergleich der unterschiedlich vorbelasteten Substrate bestätigt den Zusammenhang. Spielmeyer et al. ermitteln sowohl im *screening* 2014 als auch in der Fermenterstudie 2015 Sulfonamid- und Tetrazyklinrückstände in BGA15 nicht aber BGA14. Mit Ausnahme der Ergebnisse von *tetO* liegen die Kopienzahlen aller Gene in den Fermentern, dotiert mit Substrat der BGA15, deutlich höher als die der BGA14. Am deutlichsten wird dies bei *sul2*, das durchschnittlich um den Faktor 11,2 mehr in Versuchsproben von BGA15 amplifiziert wird. Weniger deutlich ist diese Divergenz mit den Faktoren 2,5 für *tetA* und 2,8 für *tetM*.

Sul2 ist das kopienstärkste ARG mit der deutlichsten Zunahme der betrachteten ARG in der zweiten Versuchsphase um den Faktor 4,2 in Fermenter 1, 4,3 in Fermenter 2 und 3,0 in Fermenter 3.

Das ARG *tetM* zeigt eine Zunahme in der zweiten Versuchsphase um den Faktor 1,8 in Fermenter 1 bis 3,4 in Fermenter 2. Die höchsten Kopienzahlen von *tetO* werden in Fermenter 2 in der zweiten Versuchsphase erreicht. Die niedrigsten Kopienzahlen sowohl vor als auch nach dem Phasenwechsel sowie auch die deutlichste Zunahme der Kopienzahlen ist in Fermenter 1 mit einer Zunahme um den Faktor 3,5 zu sehen. Das kopienschwächste ARG *tetA* zeigt maximale Kopienzahlen in der zweiten Versuchsphase der Fermenter 2 und 3 mit der deutlichsten Zunahme um den Faktor 2,5 in Fermenter 2.

Die Stabilität eines ARG kann erheblich durch die genetische Lokalisation, beeinflusst werden. ARG die auf Transposons codiert sind treten häufig mit erhöhter Transferfrequenz und Stabilität auf als Plasmid-gebundene Resistenzgene (Ainsa 2002; M. C. Roberts 2005). Die spezifische Lokalisation eines ARG in den betrachteten Proben kann jedoch nicht ohne weitere Untersuchungen eindeutig bestimmt werden. Außerdem ist die Abhängig von Populationszusammensetzung und dem Spektrum sowie der Persistenz der Trägerorganismen ursächlich für die Prävalenz eines ARG (Chopra and Roberts 2001; M. C. Roberts 2005). Auch Liu et al. (2011) können einen Selektionsvorteil resistenter Bakterien für Tetrazyklinkonzentrationen weit unter der minimalen Hemmkonzentration nachweisen.

Der Einsatz kleinskaliger Fermenterstudien zur Klärung mikrobiologischer Vorgänge in realen Anlagen ist nur bedingt empfehlenswert. Zwar zeigen einige der betrachteten Parameter ähnliche Trends wie die Kopienverteilung der unterschiedlichen ARG und das Wachstum einiger Schlüssellorganismen, jedoch sollte auf eine Verifizierung derart gewonnener Erkenntnisse über die Betrachtung realer Anlagen nicht verzichtet werden (H. N. Storteboom et al. 2002).

V. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Schlussfolgerung

Seit dem Verbot zum prophylaktischen und leistungsfördernden Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft in 2006 hat sich der jährliche Absatz von Veterinärantibiotika bis 2012 mehr als verdoppelt und die Applikation metallhaltiger Futtermitteladditive aufgrund ihrer antibiotischen Wirkung stark zugenommen (GERMAP 2012; Casewell et al. 2003; EU 2006; Zethner 2007; GfK 2005). Schwermetalle werden unverändert, Antibiotika größtenteils unverändert ausgeschieden und gelangen über den Einsatz landwirtschaftlicher Wirtschaftsdünger in terrestrische wie aquatische Ökosysteme. In landwirtschaftlichen Abwässern und Umwelt fördern sie das Wachstum resistenter Bakterien, sowie die Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen (Fernando Baquero, Martínez, and Cantón 2008; Martinez 2009; Seiler and Berendonk 2012; Xiong et al. 2015).

Doch auch Reduktion und Verzicht des Einsatzes antibiotisch wirksamer Substanzen ist als Mittel zur Eliminierung und auch Eingrenzung von Antibiotikaresistenz im landwirtschaftlichen Sektor ungenügend. Diverse Studien zeigen, dass Resistenzgene auch ohne antibiotischen Druck überdauern da sie keine Fitnessverluste verursachen bzw. in Einzelfällen die Fitness des Organismus erhöhen (Salyers and Amábile-Cuevas; Luo et al.; Enne et al.). Zwar beschreiben einige Studien eine direkte Korrelation steigender und abfallender Kopienzahlen von ARG in landwirtschaftlichen Abwässern mit hohen Antibiotikakonzentrationen sowie dem nachlassenden Selektionsdruck nach Eliminierung der Antibiotika jedoch werden diese Zusammenhänge nicht von der vorliegenden Studie unterstützt (Pin Gao et al. 2012; Pei et al. 2006; Andersson 2006). ARG liegen im Bereich von 10^8 bis 10^{14} K/ g TS sowohl in Gülle und Mist unbelasteter als auch nachweislich Antibiotika- und Schwermetall-belasteter Betriebe. Demnach treten ARG ubiquitär auf stabilem Niveau, weitgehend unabhängig von selektiven Faktoren wie Antibiotika und Schwermetalle auf (Kyselková, Kotrbová, et al. 2015; Heuer et al. 2004; Byrne-Bailey et al. 2009). Die genetische Betrachtung von Isolaten der Enterobacteriaceae und Enterococcaceae zeigt jedoch neben einer anderen Verteilung des Spektrums an Resistenzgenen auch ein geringes Vorkommen als die kultivierungsunabhängige Analyse. Besonders deutlich wird die Divergenz zwischen Isolaten der Schlüsselbakterien und des Gesamtspektrums für die Sulfonamidresistenzgene, da die ubiquitären Gene *sul1* und *sul2* kaum wiedergefunden werden. Demnach ist das Reservoir an Sulfonamid- und Tetrazyklinresistenzgenen in landwirtschaftlichen Abwässern nicht in klinisch relevanten Bakterien zu finden. Sowohl die quantitative Erfassung von ARG als auch die Analyse von Isolaten bestätigt den reduzierenden Einfluss der Prozessbedingungen von Biogasanlagen wie er in diversen Studien unterstellt wird (HN Storteboom and Kim 2007; J.A. Resende et al. 2014). Eine Eliminierung der ARG über diese Barrierefunktion zur Erreichen ist jedoch aufgrund der evolutionär neutralen Eigenschaften und horizontaler Verbreitungsmechanismen unwahrscheinlich (H Heuer et al. 2004; C. Binh and Heuer 2010). Diverse Studien unterstreichen das Gefahrenpotential von Gülle, Mist und auch dem Ablauf mesophiler Biogasanlagen durch eine schwere Belastung pathogener und resistenter Bakterien (Sahlström 2003b; Juliana Alves Resende et al. 2014; da Costa, Loureiro, and Matos 2013). Und obwohl potentiell pathogene Bakterien wie Enterobacteriaceae, Enterococcaceae und auch anaerobe Sporenbildner sowohl aus Substrat als auch Gärrest isoliert werden konnten dominieren sie in Proben der vorliegenden Studie nicht und nehmen mit fortschreitendem Prozessdurchlauf weiterhin ab. Demnach kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine Reduktion pathogener Schlüsselorganismen bestätigt die Inaktivierung oder Eliminierung resistenter Bakterien durch die komplexen Prozessbedingungen in Biogasanlagen jedoch

nicht nachhaltig bewiesen, die Akkumulation resistenter bzw. pathogener Organismen jedoch ausgeschlossen werden. Der Einsatz von Zink und Kupfer in einem Überschuss der fünfzig- bis hundertfachen Dosis der physiologischen Notwendigkeit in Futtermittelzusätzen und therapeutischen Komponenten aufgrund ihrer kotstabilisierenden und leistungsfördernden Eigenschaften schlägt sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Studie nieder (Hartung et al. 2001; Mudhoo & Kumar 2013). Trotz der geringen Löslichkeit der Metalle zwischen 0 % und 10 % kommt es neben einer Akkumulation in Ackerboden auch zu einer Anreicherung in Nutzpflanzen sowie Grund- und Oberflächengewässern (Arora et al. 2008; Peralta-Videa et al. 2009; Seiler and Berendonk 2012; Bednorz et al. 2013; Monteiro, Lofts, and Boxall 2010). Im kontinuierlichen Verlauf der Biogasanlagen bleiben Schwermetallkonzentrationen im Feststoff weitgehend stabil, zeigen jedoch eine tendenzielle Zunahme der wässrigen Verfügbarkeit in Gärrestproben. Neben einer weiteren Begrenzung der zugelassenen Konzentrationen für Kupfer- und Zinkverbindungen bei der Fütterung in Mastbetrieben (Zethner 2007) kann die Passage der Biogasanlage durch Erhöhung der wässrigen Verfügbarkeit in Kombination mit mikrobiellen Metall-*leaching* Verfahren zur Eingrenzung der Umweltbelastung beitragen (Comas et al. 2014).

Trotz einer hygienisierenden Wirkung der Abwasserbehandlung mittels Biogasfermentation kann jedoch nicht von einer Eliminierung der pharmakologischen und mikrobiologischen Schadstoffe wie Antibiotika, pathogene, resistente Bakterien und Resistenzgene ausgegangen werden und weitere umfassende biotechnologische Barrieren sowie eine wirkungsvolle Veränderung und Kontrolle der landwirtschaftlichen Praxen ist nötig um ökologische und umweltmedizinische Gefahren aus dem landwirtschaftlichen Sektor effektiv einzudämmen.

Ausblick

Neben Veränderungen der gesetzlichen Bestimmungen zum Einsatz von Tierarzneimitteln und Futtermittelzusätzen, die eine drastische Umstellung von Tierhaltungs- und Managementsystemen nach sich ziehen, sind auch biotechnologische Verfahren und Barrieren insbesondere zur Emissionsminderung pathogener Mikroorganismen einzusetzen. Vor Ausbringung von Antibiotika- und mikrobiologisch kontaminierter Abwässer auf Agrarflächen sind effiziente Eliminierungsstrategien im Rahmen der Behandlung von Wirtschaftsdüngern zu realisieren. Sowohl Schwermetalle als auch bestimmte Antibiotika und vor allem Resistenzgene zeigen hohe Persistenz und träge Eliminierungsreaktion unter Abwesenheit selektiver Faktoren. Insofern sind Tetrazykline, Sulfonamide, pathogene und resistente Bakterien sowie Kupfer und Zink auch in Zukunft als problematische Rückstände mit umweltrelevanten Eigenschaften in Wirtschaftsdünger anzusehen

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Studie untersucht die Verteilung und Persistenz von Antibiotikaresistenzgenen (ARG), resistenter und potentiell pathogener Mikroorganismen und antibiotisch wirksamer Schwermetalle in landwirtschaftlichen Abwässern zur Erfassung des Risikos der Ausbringung auf Ackerland und das hygienisierende bzw. rückhaltende Potential von Biogasanlagen.

15 Biogasanlagen wurden deutschlandweit in einem *screening* 2012 stichprobenhaft untersucht und drei dieser Anlagen über den Jahresgang 2013 zu fünf Probenahmezeitpunkten weiter betrachtet. Kontinuierliche Durchflussfermenter wurden unter definierter Zugabe von Antibiotika (AB) in der ersten Versuchshälfte gegenüber eines Kontrollfermenters über einen Gesamtzeitraum von 60 Tagen untersucht. Die kultivierbare bakterielle Population und Prävalenz medizinisch relevanter Schlüsselorganismen wurde durch die Bestimmung Kolonie-bildender Einheiten (KBE) auf drei Komplex-, sechs Selektivmedien und drei Antibiotika-angereicherten CHROMagar-Medien bestimmt. Eine stichprobenhaft erstellte Isolatbibliothek ermöglichte darüber hinaus eine genauere Charakterisierung des Populationsspektrums sowie eine Bewertung der genutzten Wachstumsmedien für die vorliegenden Probenkomplexe. Isolate wurden im Resistogramm gegen β -Lactam-Antibiotika (Amoxicillin AMX, Oxacillin OXA), Fluorchinolon (Enrofloxacin ENR), Tetrazyklin (Tetrazyklin TET), Makrolid (Tylosin TLS), Fenicol (Florfenicol FLL) und Sulfonamide (Trimethoprim mit Sulfamethoxazol T/S, Sulfamethoxazol SMO) getestet. Zusätzlich erfolgte der qualitative Nachweis, mittels konservativer PCR, eines Spektrums von 12 Tetrazyklinresistenzgenen und drei Sulfonamidresistenzgenen in Isolaten und Gesamt-DNA. Die ARG *tetA*, *tetM* und *tetO* und *sul2* wurden zusätzlich über *realtime* PCR anhand absoluter Plasmidstandards quantitativ erfasst. Die Konzentrationsbestimmung von Schwermetallen, insbesondere Kupfer und Zink erfolgte im Feststoff nach Königswasseraufschluss und im wässrigen Eluat massenspektrometrisch mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS).

- Die chemisch-physikalische Charakterisierung verdeutlicht Veränderungen in der Probenmatrix durch den Prozessdurchlauf der Biogasanlagen.
Während gesenkte Werte des chemischen Sauerstoffbedarfs, löslichen organischen Kohlenstoffs sowie den Trockensubstanzen, die die Umsetzung organischer Verbindungen in Biogas signalisieren, werden Nährstoffe wie Phosphat und Stickstoff im Gärresten angereichert.
- Metalle werden in Feststoffproben jeder Anlage mit einer deutlichen Prävalenz von Kupfer und Zink bestimmt. Während Kupfer zu 30 % und Barium zu 25% im überwiegenden Teil der Proben im wässrigen Eluat nachweisbar sind zeigen außerdem nur noch Zink und Nickel vereinzelt wässrige Verfügbarkeit.
- Insgesamt konnte eine Reduktion sowohl der gesamten KBE als auch der Enterobacteriaceae und Enterococcaceae festgestellt werden. Einzig anaerobe Sporenbildner zeigen eine ansteigende Tendenz in Ausgangsproben.
- Die Betrachtung der Isolatsammlung zeigt eine höhere Diversität auf Gattungs- und Familienebene in Eingangsproben, eine Reduzierung gramnegativer Bakterien in Ausgangsproben und eine generelle Prävalenz der Gattung *Bacillus* mit größter Ausprägung im Gärrest.
- Die Analyse der Medienfunktionalität anhand isolierter Bakterien zeigt eine abnehmende Diversität in Ausgangsproben aller Medien mit zunehmender Prävalenz von Bacillaceae. Ein Großteil, insbesondere Komplexmedien wird von Isolaten des Phylums Firmicutes dominiert, die in Ausgangsproben zunehmen und die Frequenz spezifischer Isolation von Selektiv-

medien erniedrigen. Die Isolation von Enterococcaceae ist sowohl in Eingangs- als auch Ausgangsproben mit Hilfe der Selektivmedien erfolgreich während Enterobacteriaceae und vor allem Staphylococcaceae in Ausgangsproben von unspezifischen Bakterien überlagert werden. CHROMagar sind nur bedingt zum Einsatz an dem komplexen Probenmaterial geeignet, da spezifische Isolationen nur von CHROMagar ESBL erfolgten.

- Der Großteil der Isolate aus den vorliegenden Umweltproben ist empfindlich gegenüber den getesteten Antibiotika mit einer tendenziellen Abnahme in Ausgangsproben. Auch Schlüsselbakterien wie Enterobacteriaceae und Enterococcaceae zeigen überwiegend sensible Isolate und eine geringe Belastung mit Tetrazyklin- und Sulfonamidresistenzgenen.
- Die qualitative Erfassung von ARG zeigt ein ubiquitäres Vorkommen in allen Anlagen weitgehend unabhängig von Betriebsbedingungen und saisonalen Schwankungen.
- Die quantitative Analyse verdeutlicht jedoch sowohl anlagenspezifisches Niveau und Reduktionseffizienzen für ARG zwischen 80 % und 30 %. Mit abnehmender Häufigkeit und einer entsprechend verminderten Reduktion treten *sul2*, *tetM*, *tetA* und das kopienschwächste *tetO* in allen Anlagen auf.
- Der Einsatz kleinskaliger Fermenterstudien zur Klärung mikrobiologischer Vorgänge in realen Anlagen ist nur bedingt empfehlenswert. Zwar zeigen einige der betrachteten Parameter ähnliche Trends wie die Kopienverteilung der unterschiedlichen ARG und das Wachstum einiger Schlüsselorganismen, jedoch sollte auf eine Verifizierung derart gewonnener Erkenntnisse über die Betrachtung realer Anlagen nicht verzichtet werden.
- Der Prozess der Biogasproduktion zeigt einen hygienisierenden Effekt auf landwirtschaftliche Abwässer durch Minderung der kultivierbaren mikrobiologischen Ladung und einer Populationsverschiebung zum grampositiven Spektrum, die mit der Reduktion klinisch relevanter Organismen einhergeht, sowie einer Reduktion resistenter Bakterien und Resistenzgene im Gärrest.
- Eine Eliminierung der pharmakologischen und mikrobiologischen Schadstoffe erfolgt jedoch nicht und weitere umfassende biotechnologische Barrieren sowie eine wirkungsvolle Veränderung und Kontrolle der landwirtschaftlichen Praxen ist nötig um ökologische und medizinische Gefahren aus dem landwirtschaftlichen Sektor effektiv einzudämmen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 11465:1993, ISO. 1993. *Soil Quality -- Determination of Dry Matter and Water Content on a Mass Basis* -- *Gravimetric Method*.
http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=20886.
- 12879:2001-02, DIN EN. 2001. *Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung Des Glühverlustes Der Trockenmasse*. <https://www.beuth.de/en/standard/din-en-12879/36017972>.
- Aaij, C., and P. Borst. 1972. "The Gel Electrophoresis of DNA." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 269 (2): 192–200. doi:10.1016/0005-2787(72)90426-1.
- AbfKlärV. 1992. "Klärschlammverordnung." Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit.
- Abriouel, Hikmate, Nabil Ben Omar, Antonio Cobo Molinos, Rosario Lucas López, Maria José Grande, Pilar Martínez-Viedma, Elena Ortega, Magdalena Martínez Cañamero, and Antonio Galvez. 2008. "Comparative Analysis of Genetic Diversity and Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococcal Populations from Raw Fruit and Vegetable Foods, Water and Soil, and Clinical Samples." *International Journal of Food Microbiology* 123 (1–2): 38–49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.067.
- Adolph, Jan, Jürgen Beck, and Thomas Jungbluth. 2004. "Monofermentation von Nahrungsmittelabfällen in Biogasanlagen - Pilotbiogasanlage." *Agrartechnische Forschung* 10 (2).
- Ainsa, J. A. 2002. "Stuart B. Levy: The Antibiotic Paradox. How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers, 2nd Edn." *International Microbiology* 5 (3): 155–56. doi:10.1007/s10123-002-0082-z.
- Alexy, Radka, Tina Kümpel, and Klaus Kümmerer. 2004. "Assessment of Degradation of 18 Antibiotics in the Closed Bottle Test." *Chemosphere* 57 (6): 505–12. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.06.024.
- Allen, Heather K, Justin Donato, Helena Huimi Wang, Karen a Cloud-Hansen, Julian Davies, and Jo Handelsman. 2010. "Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments." *Nature Reviews. Microbiology* 8 (4). Nature Publishing Group: 251–59. doi:10.1038/nrmicro2312.
- Allers, Thorsten, and Moshe Mevarech. 2005. "Archaeal Genetics - the Third Way." *Nature Reviews. Genetics* 6 (January): 58–73. doi:10.1038/nrg1504.
- Alonso, A, and J L Martínez. 1997. "Multiple Antibiotic Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (5). American Society for Microbiology: 1140–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9145884>.
- Altschul, S F, T L Madden, A A Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, and D J Lipman. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs." *Nucleic Acids Research* 25 (17). Oxford University Press: 3389–3402. doi:10.1093/NAR/25.17.3389.
- Amann, R I, W Ludwig, and K H Schleifer. 1995. "Phylogenetic Identification and in Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation." *Microbiological Reviews* 59 (1). American

- Society for Microbiology: 143–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535888>.
- Aminov, R I, and R I Mackie. 2001. "Molecular Ecology of Tetracycline Resistance : Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins Molecular Ecology of Tetracycline Resistance : Development and Validation of Primers." *Applied and Environmental Microbiology* 67: 22–23. doi:10.1128/AEM.67.1.22.
- Aminov, RI, and RI Mackie. 2007. "Evolution and Ecology of Antibiotic Resistance Genes." *FEMS Microbiology Letters*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x/full>.
- Aminov, Rustam I. 2011. "Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota." *Frontiers in Microbiology* 2. Frontiers: 158. doi:10.3389/fmicb.2011.00158.
- Aminov, Rustam I, and Roderick I Mackie. 2007. "Evolution and Ecology of Antibiotic Resistance Genes." *FEMS Microbiology Letters* 271 (2): 147–61. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x.
- Andersson, Dan I. 2006. "The Biological Cost of Mutational Antibiotic Resistance: Any Practical Conclusions?" *Current Opinion in Microbiology* 9: 461–65. doi:10.1016/j.mib.2006.07.002.
- Arahal, David R., and Antonio Ventosa. 2016. "Moderately Halophilic and Halotolerant Species of *Bacillus* and Related Genera." In *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*, 83–99. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. Accessed August 9. doi:10.1002/9780470696743.ch7.
- Arias, Cesar A., and Barbara E. Murray. 2009. "Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge." *New England Journal of Medicine* 360 (5). Massachusetts Medical Society : 439–43. doi:10.1056/NEJMp0804651.
- Arora, Monu, Bala Kiran, Shweta Rani, Anchal Rani, Barinder Kaur, and Neeraj Mittal. 2008. "Heavy Metal Accumulation in Vegetables Irrigated with Water from Different Sources." *Food Chemistry* 111 (4): 811–15. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.049.
- Baborowski, M, O Büttner, P Morgenstern, T Jancke, and B Westrich. 2012. "Spatial Variability of Metal Pollution in Groyne Fields of the Middle Elbe--Implications for Sediment Monitoring." *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 167 (August): 115–23. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.046.
- Bagge, E, M Persson, and K-E Johansson. 2010. "Diversity of Spore-Forming Bacteria in Cattle Manure, Slaughterhouse Waste and Samples from Biogas Plants." *Journal of Applied Microbiology* 109 (5): 1549–65. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04790.x.
- Bailey, Caroline, Astrid Spielmeyer, Roy M. Frings, Gerd Hamscher, and Holger Schüttrumpf. 2015. "From Agricultural Fields to Surface Water Systems: The Overland Transport of Veterinary Antibiotics." *Journal of Soils and Sediments* 15 (7): 1630–34. doi:10.1007/s11368-015-1140-4.
- Baker-Austin, Craig, Meredith S Wright, Ramunas Stepanauskas, J V McArthur, T.A. Krulwich, et al., A.O. Summers, et al. 2006. "Co-Selection of Antibiotic and Metal Resistance." *Trends in Microbiology* 14 (4). Elsevier: 176–82. doi:10.1016/j.tim.2006.02.006.
- Bal, A.M., G.W. Coombs, M.T.G. Holden, J.A. Lindsay, G.R. Nimmo, P. Tattevin, and R.L. Skov. 2016. "Genomic Insights into the Emergence and Spread of International Clones of Healthcare-, Community- and Livestock-Associated Meticillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: Blurring of the Traditional Definitions." *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 6: 95–101.

- doi:10.1016/j.jgar.2016.04.004.
- Baquero, F., C. Alvarez-Ortega, and J. L. Martinez. 2009. "Ecology and Evolution of Antibiotic Resistance." *Environmental Microbiology Reports* 1 (6). Blackwell Publishing Ltd: 469–76. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00053.x.
- Baquero, Fernando, José Luis Martínez, and Rafael Cantón. 2008. "Antibiotics and Antibiotic Resistance in Water Environments." *Current Opinion in Biotechnology* 19: 260–65. doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006.
- Barlow, Miriam. 2009. "What Antimicrobial Resistance Has Taught Us About Horizontal Gene Transfer." In , 397–411. doi:10.1007/978-1-60327-853-9_23.
- Barra Caracciolo, Anna, Edward Topp, and Paola Grenni. 2015. "Pharmaceuticals in the Environment: Biodegradation and Effects on Natural Microbial Communities. A Review." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 106: 25–36. doi:10.1016/j.jpba.2014.11.040.
- Bartl, Barbara, Wilfried Hartl, and Othmar Horak. 2002. "Long-Term Application of Biowaste Compost versus Mineral Fertilization: Effects on the Nutrient and Heavy Metal Contents of Soil and Plants." *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165 (2). WILEY-VCH Verlag GmbH: 161. doi:10.1002/1522-2624(200204)165:2<161::AID-JPLN161>3.0.CO;2-P.
- Beausse, J. 2004. "Selected Drugs in Solid Matrices: A Review of Environmental Determination, Occurrence and Properties of Principal Substances." *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993604030341>.
- Bednorz, Carmen, Kathrin Oelgeschläger, Bianca Kinnemann, Susanne Hartmann, Konrad Neumann, Robert Pieper, Astrid Bethe, et al. 2013. "The Broader Context of Antibiotic Resistance: Zinc Feed Supplementation of Piglets Increases the Proportion of Multi-Resistant *Escherichia Coli* in Vivo." *International Journal of Medical Microbiology* 303 (6): 396–403. doi:10.1016/j.ijmm.2013.06.004.
- Beneragama, Nilmini, Masahiro Iwasaki, Suraju A Lateef, Takaki Yamashiro, Ikko Ihara, and Kazutaka Umetsu. 2013. "Survival of Multidrug-Resistant Bacteria in Thermophilic and Mesophilic Anaerobic Co-Digestion of Dairy Manure and Waste Milk." *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho* 84 (5): 426–33. doi:10.1111/asj.12017.
- Benson, Linda M, Allison P Null, and David C Muddiman. 2003. "Advantages of *Thermococcus Kodakaraensis* (KOD) DNA Polymerase for PCR-Mass Spectrometry Based Analyses." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14 (6): 601–4. doi:10.1016/S1044-0305(03)00148-X.
- Bergkvist, Petra, Nicholas Jarvis, Dan Berggren, and Käll Carlgren. 2003. "Long-Term Effects of Sewage Sludge Applications on Soil Properties, Cadmium Availability and Distribution in Arable Soil." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 97 (1): 167–79. doi:10.1016/S0167-8809(03)00121-X.
- Bertani, Giuseppe. 1951. "The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli* 1." *Journal of Bacteriology* 62 (3): 293–300.
- Binh, Chu Thi Thanh, Holger Heuer, Martin Kaupenjohann, and Kornelia Smalla. 2008. "Piggery Manure Used for Soil Fertilization Is a Reservoir for Transferable Antibiotic Resistance Plasmids." *FEMS Microbiology Ecology* 66 (1). The Oxford University Press: 25–37. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00526.x.

- Binh, CTT, and H Heuer. 2010. "Similar Bacterial Community Structure and High Abundance of Sulfonamide Resistance Genes in Field-Scale Manures." *Manure: Management* http://www.researchgate.net/profile/Binh_Chu/publication/210196534_Similar_bacterial_community_structure_and_high_abundance_of_sulfonamide_resistance_genes_in_field-scale_manures/links/0c9605220ba993d88c000000.pdf.
- Blume, Hans-Peter, Gerhard W. Brümmer, Rainer Horn, Ellen Kandeler, Ingrid Kögel-Knabner, Ruben Kretzschmar, Karl Stahr, Berndt-Michael Wilke, Sören Thiele-Bruhn, and Gerhard Welp. 2010. "Gefährdung Der Bodenfunktionen." In *Lehrbuch Der Bodenkunde*, 449–519. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. doi:10.1007/978-3-8274-2251-4_10.
- Boerlin, P, A Wissing, F M Aarestrup, J Frey, and J Nicolet. 2001. "Antimicrobial Growth Promoter Ban and Resistance to Macrolides and Vancomycin in Enterococci from Pigs." *Journal of Clinical Microbiology* 39 (11). American Society for Microbiology: 4193–95. doi:10.1128/JCM.39.11.4193-4195.2001.
- Boone, David R., William B. Whitman, and Pierre Rouvière. 1993. "Diversity and Taxonomy of Methanogens." In *Methanogenesis*, 35–80. Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4615-2391-8_2.
- Boxall, A.B.A., L.A. Fogg, D.J. Baird, C. Lewis, T.C. Telfer, D. Kolpin, and A. Gravell. 2005. "Targeted Monitoring Study for Veterinary Medicines in the UK Environment."
- Boxall, ABA, P Johnson, and EJ Smith. 2006. "Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants." *Journal of Agricultural*. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf053041t>.
- Boxall, Alistair B. A. 2010. "Veterinary Medicines and the Environment." In , 291–314. Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-10324-7_12.
- Braga, Teresa M., Constança Pomba, and M. Fátima Silva Lopes. 2013. "High-Level Vancomycin Resistant Enterococcus Faecium Related to Humans and Pigs Found in Dust from Pig Breeding Facilities." *Veterinary Microbiology*. Vol. 161. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.034.
- Burkhardt, M, C Stamm, and C Waul. 2005. "Surface Runoff and Transport of Sulfonamide Antibiotics and Tracers on Manured Grassland." *Journal of*. <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/34/4/1363>.
- Butaye, P, L A Devriese, H Goossens, M Ieven, and F Haesebrouck. 1999. "Enterococci with Acquired Vancomycin Resistance in Pigs and Chickens of Different Age Groups." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (2). American Society for Microbiology: 365–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925534>.
- Byrne-Bailey, K. G., W. H. Gaze, P. Kay, A. B. A. Boxall, P. M. Hawkey, and E. M. H. Wellington. 2009. "Prevalence of Sulfonamide Resistance Genes in Bacterial Isolates from Manured Agricultural Soils and Pig Slurry in the United Kingdom." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (2). American Society for Microbiology: 696–702. doi:10.1128/AAC.00652-07.
- Cafaro, Matías J, and Cameron R Currie. 2005. "Phylogenetic Analysis of Mutualistic Filamentous Bacteria Associated with Fungus-Growing Ants." *Canadian Journal of Microbiology* 51 (6). NRC Research Press Ottawa, Canada : 441–46. doi:10.1139/w05-023.
- Calabrese, E J, and L A Baldwin. 2002. "Defining Hormesis." *Human & Experimental Toxicology* 21 (2): 91–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102503>.

- Carattoli, A. 2009. "Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (6). American Society for Microbiology: 2227–38. doi:10.1128/AAC.01707-08.
- Cardinali-Rezende, Juliana, Luís F D B Colturato, Thiago D B Colturato, Edmar Chartone-Souza, Andréa M A Nascimento, and José L Sanz. 2012. "Prokaryotic Diversity and Dynamics in a Full-Scale Municipal Solid Waste Anaerobic Reactor from Start-up to Steady-State Conditions." *Bioresource Technology* 119 (September): 373–83. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.136.
- Carroll, Ian M, Young-Hyo Chang, Jiwon Park, R Balfour Sartor, and Yehuda Ringel. 2010. "Luminal and Mucosal-Associated Intestinal Microbiota in Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome." *Gut Pathogens* 2 (1): 19. doi:10.1186/1757-4749-2-19.
- Casewell, M., Christian Friis, Enric Marco, Paul McMullin, and Ian Phillips. 2003. "The European Ban on Growth-Promoting Antibiotics and Emerging Consequences for Human and Animal Health." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (2). Oxford University Press: 159–61. doi:10.1093/jac/dkg313.
- Chang, Qiuzhi, Weike Wang, Gili Regev-Yochay, Marc Lipsitch, and William P Hanage. 2015. "Antibiotics in Agriculture and the Risk to Human Health: How Worried Should We Be?" *Evolutionary Applications* 8 (3): 240–47. doi:10.1111/eva.12185.
- Chapman, G H. 1945. "The Significance of Sodium Chloride in Studies of Staphylococci." *Journal of Bacteriology* 50 (2). American Society for Microbiology (ASM): 201–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16560988>.
- Chee-Sanford, Jc C, R I Amniov, Ij J Krapac, N Garrigues-Jeanjean, Ri I Mackie, and Ri Aminov. 2001. "Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (4): 1494–1502. doi:10.1128/AEM.67.4.1494.
- Chee-Sanford, JC, and RI Mackie. 2009. "Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes Following Land Application of Manure Waste." *Journal of ...* <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/38/3/1086>.
- Chee-Sanford, Joanne C, Roderick I Mackie, Satoshi Koike, Ivan G Krapac, Yu-Feng Lin, Anthony C Yannarell, Scott Maxwell, and Rustam I Aminov. 2009. "Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes Following Land Application of Manure Waste." *Journal of Environmental Quality* 38: 1086–1108. doi:10.2134/jeq2008.0128.
- Chen, H, S-H Yan, Z-L Ye, H-J Meng, and Y-G Zhu. 2012. "Utilization of Urban Sewage Sludge: Chinese Perspectives." *Environmental Science and Pollution Research International* 19 (5): 1454–63. doi:10.1007/s11356-012-0760-0.
- Chen, Inês, Peter J. Christie, and David Dubnau. 2005. "The Ins and Outs of DNA Transfer in Bacteria." *Science* 310 (5753).
- Chen, Jing, Frederick C. Michel, Srinand Sreevatsan, Mark Morrison, and Zhongtang Yu. 2010a. "Occurrence and Persistence of Erythromycin Resistance Genes (Erm) and Tetracycline Resistance Genes (Tet) in Waste Treatment Systems on Swine Farms." *Microbial Ecology* 60 (3). Springer-Verlag: 479–86. doi:10.1007/s00248-010-9634-5.
- Chen, Jing, Frederick C Michel, Srinand Sreevatsan, Mark Morrison, and Zhongtang Yu. 2010b.

- "Occurrence and Persistence of Erythromycin Resistance Genes (Erm) and Tetracycline Resistance Genes (Tet) in Waste Treatment Systems on Swine Farms." *Microbial Ecology* 60 (3): 479–86. doi:10.1007/s00248-010-9634-5.
- Chopra, Ian, and Marilyn Roberts. 2001. "Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (2): 232–60. doi:10.1128/MMBR.65.2.232.
- Christian, Thorsten, Rudolf J. Schneider, Harald a. Färber, Dirk Skutlarek, Michael T. Meyer, and Heiner E. Goldbach. 2003. "Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters." *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 31 (May 2002): 36–44. doi:10.1002/ahch.200390014.
- CLSI. 2014. "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement."
- Comas, Jordi, Carmen Domínguez, Dora I Salas-Vázquez, Juan Parera, Sergi Díez, and Josep M Bayona. 2014. "Input and Leaching Potential of Copper, Zinc, and Selenium in Agricultural Soil from Swine Slurry." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 66 (2): 277–86. doi:10.1007/s00244-013-9982-5.
- Cook, Kimberly L, Michael J Rothrock, Nanh Lovanh, John K Sorrell, and John H Loughrin. 2010. "Spatial and Temporal Changes in the Microbial Community in an Anaerobic Swine Waste Treatment Lagoon." *Anaerobe* 16 (2): 74–82. doi:10.1016/j.anaerobe.2009.06.003.
- Crane, Mark, Alistair B. A. Boxall, and Katie Barrett. 2008. *Veterinary Medicines in the Environment*. CRC Press. <https://books.google.com/books?id=zX1gAl1256YC&pgis=1>.
- Cromwell, GL. 2002. "Why and How Antibiotics Are Used in Swine Production." *Animal Biotechnology*. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/ABIO-120005767>.
- Crossman, Lisa C, Virginia C Gould, J Maxwell Dow, Georgios S Vernikos, Aki Okazaki, Mohammed Sebahia, David Saunders, et al. 2008. "The Complete Genome, Comparative and Functional Analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* Reveals an Organism Heavily Shielded by Drug Resistance Determinants." *Genome Biology* 9 (4). BioMed Central: R74. doi:10.1186/gb-2008-9-4-r74.
- Currie, Cameron R., James A. Scott, Richard C. Summerbell, and David Malloch. 1999. "Fungus-Growing Ants Use Antibiotic-Producing Bacteria to Control Garden Parasites." *Nature* 398 (6729). Nature Publishing Group: 701–4. doi:10.1038/19519.
- da Costa, Paulo Martins, Luís Loureiro, and Augusto J F Matos. 2013. "Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria between Intermingled Ecological Niches: The Interface between Humans, Animals and the Environment." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 278–94. doi:10.3390/ijerph10010278.
- Daughton, CG, and TA Ternes. 1999. "Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?" *Environmental Health Perspectives*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1566206/>.
- Davies, Julian, and Katherine S. Ryan. 2012. "Introducing the Parvome: Bioactive Compounds in the Microbial World." *ACS Chemical Biology* 7 (2). American Chemical Society: 252–59. doi:10.1021/cb200337h.

- Davies, Julian, George B Spiegelman, and Grace Yim. 2006. "The World of Subinhibitory Antibiotic Concentrations." *Current Opinion in Microbiology* 9 (5): 445–53. doi:10.1016/j.mib.2006.08.006.
- Dean, Rebecca J., Tracy M. Shimmield, and Kenneth D. Black. 2007. "Copper, Zinc and Cadmium in Marine Cage Fish Farm Sediments: An Extensive Survey." *Environmental Pollution* 145 (1): 84–95. doi:10.1016/j.envpol.2006.03.050.
- Demain, Arnold L, Michael Newcomb, and J H David Wu. 2005. "Cellulase, Clostridia, and Ethanol." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 69 (1). American Society for Microbiology: 124–54. doi:10.1128/MMBR.69.1.124-154.2005.
- Diederer, Bram M W, Marie-Louise van Leest, Inge van Duijn, Piet Willemse, Peter H J van Keulen, and Jan A J W Kluytmans. 2006. "Performance of MRSA ID, a New Chromogenic Medium for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus." *Journal of Clinical Microbiology* 44 (2). American Society for Microbiology (ASM): 586–88. doi:10.1128/JCM.44.2.586-588.2006.
- Diehl, David L., and Timothy M. LaPara. 2010. "Effect of Temperature on the Fate of Genes Encoding Tetracycline Resistance and the Integrase of Class 1 Integrons within Anaerobic and Aerobic Digesters Treating Municipal Wastewater Solids." *Environmental Science & Technology* 44 (23). American Chemical Society: 9128–33. doi:10.1021/es102765a.
- Dierikx, Cindy M, Paul D Hengeveld, Kees T Veldman, Angela de Haan, Sanne van der Voorde, Petra Y Dop, Thijs Bosch, and Engeline van Duijken. 2016. "Ten Years Later: Still a High Prevalence of MRSA in Slaughter Pigs despite a Significant Reduction in Antimicrobial Usage in Pigs the Netherlands." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (9). Oxford University Press: 2414–18. doi:10.1093/jac/dkw190.
- DIN-EN-13346:2001-04. n.d. "Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung von Spurenelementen Und Phosphor - Extraktionsverfahren Mit Königswasser."
- Dohrmann, Anja B., Susann Baumert, Lars Klingebiel, Peter Weiland, and Christoph C. Tebbe. 2011. "Bacterial Community Structure in Experimental Methanogenic Bioreactors and Search for Pathogenic Clostridia as Community Members." *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (6). Springer-Verlag: 1991–2004. doi:10.1007/s00253-010-2955-y.
- Doi, AM, and MK Stoskopf. 2000. "The Kinetics of Oxytetracycline Degradation in Deionized Water under Varying Temperature, pH, Light, Substrate, and Organic Matter." *Journal of Aquatic Animal Health*. [http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8667\(2000\)012%253C0246%253ATKOODI%253E2.0.CO%253B2](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8667(2000)012%253C0246%253ATKOODI%253E2.0.CO%253B2).
- Dolliver, H, K Kumar, and S Gupta. 2007. "Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil." *Journal of Environmental*. <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/36/4/1224>.
- Dott, Wolfgang., and Nihal. Ahmad. 2002. *Lehrbuch Der Umweltmedizin: Grundlagen, Untersuchungsmethoden, Krankheitsbilder, Prävention; Mit 221 Tabellen*. WVG, Wiss. Verl.-Ges.
- Duo, Miao, Shuyu Hou, and Dacheng Ren. 2008. "Identifying Escherichia Coli Genes Involved in Intrinsic Multidrug Resistance." *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (4). Springer-Verlag: 731–41. doi:10.1007/s00253-008-1709-6.
- EEG. 2014. *Gesetz Für Den Ausbau Erneuerbarer Energien*. Bundesministerium der Justiz und für

Verbraucherschutz.

- EG2160/2003. 2003. *VERORDNUNG (EG) Nr. 2160/2003 Zur Bekämpfung von Salmonellen Und Bestimmten Anderen Durch Lebensmittel Übertragbaren Zoonoseerregern*. DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION.
- Eikmeyer, Felix G, Antje Rademacher, Angelika Hanreich, Magdalena Hennig, Sebastian Jaenicke, Irena Maus, Daniel Wibberg, et al. 2013. "Detailed Analysis of Metagenome Datasets Obtained from Biogas-Producing Microbial Communities Residing in Biogas Reactors Does Not Indicate the Presence of Putative Pathogenic Microorganisms." *Biotechnology for Biofuels* 6 (1). BioMed Central: 49. doi:10.1186/1754-6834-6-49.
- Enne, V I, A A Delsol, G R Davis, S L Hayward, J M Roe, and P M Bennett. 2005. "Assessment of the Fitness Impacts on Escherichia Coli of Acquisition of Antibiotic Resistance Genes Encoded by Different Types of Genetic Element." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (3): 544–51. doi:10.1093/jac/dki255.
- Erhart, Eva, Wilfried Hartl, and Berta Putz. 2008. "Total Soil Heavy-Metal Concentrations and Mobile Fractions after 10 Years of Biowaste-Compost Fertilization." *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171 (3). WILEY-VCH Verlag: 378–83. doi:10.1002/jpln.200700141.
- Essen-Zandbergen, A van, H Smith, and K Veldman. 2009. "In Vivo Transfer of an incFIB Plasmid Harboring a Class 1 Integron with Gene Cassettes dfrA1-aadA1." *Veterinary*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509000790>.
- EU. 1999. "Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products."
- . 2006. "Verbot von Antibiotika Als Wachstumsförderer in Futtermitteln." http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_de.htm?locale=fr.
- Fernández, B., P. Porrier, and R. Chamy. 2001. "Effect of Inoculum-Substrate Ratio on the Start-up of Solid Waste Anaerobic Digesters." *Water Science and Technology* 44 (4). IWA Publishing: 103–8.
- Fliegerová, K, J Mrázek, M Kajan, S M Podmirseg, and H Insam. 2012. "The Effect of Maize Silage as Co-Substrate for Swine Manure on the Bacterial Community Structure in Biogas Plants." *Folia Microbiologica* 57 (4): 281–84. doi:10.1007/s12223-012-0125-6.
- FNR. 2014. "Basisdaten Bioenergie Deutschland 2014."
- Forsberg, Kevin J, Alejandro Reyes, Bin Wang, Elizabeth M Selleck, Morten O A Sommer, and Gautam Dantas. 2012. "The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens." *Science (New York, N.Y.)* 337 (6098): 1107–11. doi:10.1126/science.1220761.
- Gao, Panpan, Daqing Mao, Yi Luo, Limei Wang, Bingjie Xu, and Lin Xu. 2012. "Occurrence of Sulfonamide and Tetracycline-Resistant Bacteria and Resistance Genes in Aquaculture Environment." *Water Research* 46 (7): 2355–64. doi:10.1016/j.watres.2012.02.004.
- Gao, Pin, Mariya Munir, and Irene Xagorarakis. 2012. "Correlation of Tetracycline and Sulfonamide Antibiotics with Corresponding Resistance Genes and Resistant Bacteria in a Conventional Municipal Wastewater Treatment Plant." *The Science of the Total Environment* 421–422 (April). Elsevier B.V.: 173–83. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.01.061.
- Garcia-Vallvé, S, a Romeu, and J Palau. 2000. "Horizontal Gene Transfer in Bacterial and Archaeal

- Complete Genomes." *Genome Research* 10: 1719–25. doi:10.1101/gr.130000.particular.
- Gartiser, Stefan, Elke Urich, Radka Alexy, and Klaus Kümmerer. 2007a. "Anaerobic Inhibition and Biodegradation of Antibiotics in ISO Test Schemes." *Chemosphere* 66 (10): 1839–48. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.08.040.
- . 2007b. "Ultimate Biodegradation and Elimination of Antibiotics in Inherent Tests." *Chemosphere* 67 (3): 604–13. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.08.038.
- GERMAP. 2012. "Germap 2012."
- GfK. 2005. "Veterinärpanel Der Gesellschaft Für Konsumforschung." Gesellschaft für Konsumforschung.
- GfLSalmoV. 2009. *Verordnung Zum Schutz Gegen Bestimmte Salmonelleninfektionen Beim Haushuhn Und Bei Puten (Geflügel-Salmonellen-Verordnung GfLSalmoV)*. Germany: Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.
- Ghosh, Dhritiman, Krishnakali Roy, Kurt E Williamson, David C White, K Eric Wommack, Kerry L Sublette, and Mark Radosevich. 2008. "Prevalence of Lysogeny among Soil Bacteria and Presence of 16S rRNA and trzN Genes in Viral-Community DNA." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2). American Society for Microbiology: 495–502. doi:10.1128/AEM.01435-07.
- Glaeser, S.P., Schauss, T., Brunner, J.S., Sowinsky, O., Breves, G., Kämpfer, P. 2016. "Pilot Study for the Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Carrying Escherichia Coli, Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) and Methicillin Resistant Staphylococci (MRS) in Input and Output Samples of German Biogas Plants." *Berliner Munchener Tierarztl. Wochenschr.*
- Glupczynski, Youri, Catherine Berhin, Caroline Bauraing, and Pierre Bogaerts. 2007. "Evaluation of a New Selective Chromogenic Agar Medium for Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae." *Journal of Clinical Microbiology* 45 (2): 501–5. doi:10.1128/JCM.02221-06.
- Golet, E M, A C Alder, A Hartmann, T A Ternes, and W Giger. 2001. "Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection." *Analytical Chemistry* 73 (15): 3632–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11510827>.
- Green, MR, and Joseph Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rded. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Grim, Shellee A., Robert P. Rapp, Craig A. Martin, and Martin E. Evans. 2005. "Trimethoprim-Sulfamethoxazole as a Viable Treatment Option for Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*." *Pharmacotherapy* 25 (2). Blackwell Publishing Ltd: 253–64. doi:10.1592/phco.25.2.253.56956.
- Grøntvedt, Carl Andreas, Petter Elstrøm, Marc Stegger, Robert Leo Skov, Paal Skytt Andersen, Kjersti Wik Larssen, Anne Margrete Urdahl, et al. 2016. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* CC398 in Humans and Pigs in Norway: A 'One Health' Perspective on Introduction and Transmission." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 63 (11). Oxford University Press: 1431–38. doi:10.1093/cid/ciw552.

- Guiral, S., Vincent Hénard, Chantal Granadel, Bernard Martin, and Jean-Pierre Claverys. 2006. "Inhibition of Competence Development in *Streptococcus Pneumoniae* by Increased Basal-Level Expression of the ComDE Two-Component Regulatory System." *Microbiology* 152 (2). Microbiology Society: 323–31. doi:10.1099/mic.0.28425-0.
- Hammerum, A M. 2012. "Enterococci of Animal Origin and Their Significance for Public Health." *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (7): 619–25. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03829.x.
- Hamscher, G, HT Pawelzick, and H Höper. 2005. "Different Behavior of Tetracyclines and Sulfonamides in Sandy Soils after Repeated Fertilization with Liquid Manure." *Environmental*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/04-182R.1/full>.
- Hamscher, G, S Sczesny, H Höper, and H Nau. 2002. "Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem." *Analytical Chemistry*. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac015588m>.
- Hamscher, Gerd, Heike Theresia Pawelzick, Heinrich Höper, and Heinz Nau. 2005. "Different Behavior of Tetracyclines and Sulfonamides in Sandy Soils after Repeated Fertilization with Liquid Manure." *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 24 (4): 861–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15839560>.
- Hartung, Jörg., Christopher M. Wathes, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (Germany), and Tierärztliche Hochschule Hannover. 2001. *Livestock Farming and the Environment: Proceedings of Workshop 4 on Sustainable Animal Production, Held at Hannover, September 28, 2000*. FAL, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft.
- Hedin, G., and H. Fang. 2005. "Evaluation of Two New Chromogenic Media, CHROMagar MRSA and S. Aureus ID, for Identifying *Staphylococcus Aureus* and Screening Methicillin-Resistant S. Aureus." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (8). American Society for Microbiology: 4242–44. doi:10.1128/JCM.43.8.4242-4244.2005.
- Hermanovská, Lýdia, Jan Bardoň, and Pavel Čermák. 2016. "[Vancomycin-Resistant Enterococci - the Nature of Resistance and Risk of Transmission from Animals to Humans]." *Klinická Mikrobiologie a Infekcni Lekarstvi* 22 (2): 54–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27450523>.
- Heuer, H, H Schmitt, and K Smalla. 2011. "Antibiotic Resistance Gene Spread due to Manure Application on Agricultural Fields." *Current Opinion in Microbiology*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527411000579>.
- Heuer, H, and K Smalla. 2007. "Manure and Sulfadiazine Synergistically Increased Bacterial Antibiotic Resistance in Soil over at Least Two Months." *Environmental Microbiology*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x/full>.
- Heuer, H, R Szczepanowski, S Schneiker, A Pühler, E M Top, and A Schlüter. 2004. "The Complete Sequences of Plasmids pB2 and pB3 Provide Evidence for a Recent Ancestor of the IncP-1beta Group without Any Accessory Genes." *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 11): 3591–99. doi:10.1099/mic.0.27304-0.
- Heuer, Holger, Christoph Kopmann, Chu T T Binh, Eva M Top, and Kornelia Smalla. 2009. "Spreading Antibiotic Resistance through Spread Manure: Characteristics of a Novel Plasmid Type with Low %G+C Content." *Environmental Microbiology* 11 (4): 937–49.

doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01819.x.

- Heuer, Holger, Heike Schmitt, and Kornelia Smalla. 2011. "Antibiotic Resistance Gene Spread due to Manure Application on Agricultural Fields." *Current Opinion in Microbiology* 14 (3): 236–43. doi:10.1016/j.mib.2011.04.009.
- Hirsch, R, T Ternes, K Haberer, and KL Kratz. 1999. "Occurrence of Antibiotics in the Aquatic Environment." *Science of the Total Environment*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969798003374>.
- Hollenbeck, Brian L, and Louis B Rice. 2012. "Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms in Enterococcus." *Virulence* 3 (5). Landes Bioscience: 421–33. doi:10.4161/viru.21282.
- Holt-Harris, J. E., and O. Teague. 1916. "A New Culture Medium for the Isolation of Bacillus Typhosus from Stools." *Journal of Infectious Diseases* 18: 596–600.
- Holzappel, Bianca, and Lucia Wickert. 2007. "Die Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden Und Anwendungsgebiete." *Biologie in Unserer Zeit* 37 (2): 120–26. doi:10.1002/biuz.200610332.
- Hölzel, C. S., K. S. Harms, H. Küchenhoff, a. Kunz, C. Müller, K. Meyer, K. Schwaiger, and J. Bauer. 2010. "Phenotypic and Genotypic Bacterial Antimicrobial Resistance in Liquid Pig Manure Is Variousy Associated with Contents of Tetracyclines and Sulfonamides." *Journal of Applied Microbiology* 108: 1642–56. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04570.x.
- Hölzel, Christina S., Christa Müller, Katrin S. Harms, Sabine Mikolajewski, Stefanie Schäfer, Karin Schwaiger, and Johann Bauer. 2012. "Heavy Metals in Liquid Pig Manure in Light of Bacterial Antimicrobial Resistance." *Environmental Research* 113: 21–27. doi:10.1016/j.envres.2012.01.002.
- Höper, H., J. Kues, H. Nau, and G. Hamscher. 2002. "Eintrag Und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden" 4: 141–48.
- Horton, R A, L P Randall, E L Snary, H Cockrem, S Lotz, H Wearing, D Duncan, et al. 2011. "Fecal Carriage and Shedding Density of CTX-M Extended-Spectrum {beta}-Lactamase-Producing Escherichia Coli in Cattle, Chickens, and Pigs: Implications for Environmental Contamination and Food Production." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (11): 3715–19. doi:10.1128/AEM.02831-10.
- Houndt, T, and H Ochman. 2000. "Long-Term Shifts in Patterns of Antibiotic Resistance in Enteric Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (12). American Society for Microbiology: 5406–9. doi:10.1128/AEM.66.12.5406-5409.2000.
- Hu, Li-Fen, Xiao Chang, Ying Ye, Zhong-Xin Wang, Yi-Bo Shao, Wei Shi, Xu Li, and Jia-Bin Li. 2011. "Stenotrophomonas Maltophilia Resistance to Trimethoprim/sulfamethoxazole Mediated by Acquisition of Sul and dfrA Genes in a Plasmid-Mediated Class 1 Integron." *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 37. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.10.025.
- Huang, CH, JE Renew, and KL Smeby. 2011. "Assessment of Potential Antibiotic Contaminants in Water and Preliminary Occurrence Analysis." *Water Research and* <http://opensiuc.lib.siu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1155&context=jcwre>.
- Huang, Li-Nan, Hui Zhou, Yue-Qin Chen, Shuo Luo, Chong-Yu Lan, and Liang-Hu Qu. 2002. "Diversity and Structure of the Archaeal Community in the Leachate of a Full-Scale Recirculating Landfill as Examined by Direct 16S rRNA Gene Sequence Retrieval." *FEMS*

Microbiology Letters 214 (2).

- Hughes, Victoria M., and Naomi Datta. 1983. "Conjugative Plasmids in Bacteria of the 'pre-Antibiotic' Era." *Nature* 302 (5910). Nature Publishing Group: 725–26. doi:10.1038/302725a0.
- Huovinen, P. 1997. "Increases in Rates of Resistance to Trimethoprim." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 24 Suppl 1 (January): S63–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994780>.
- Huys, G., K. D'Haene, J.-M. Collard, and J. Swings. 2004. "Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in Enterococcus Isolates from Food." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3). American Society for Microbiology: 1555–62. doi:10.1128/AEM.70.3.1555-1562.2004.
- Ibekwe, A Mark, Shelton E Murinda, and Alexandria K Graves. 2011. "Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of Escherichia Coli from Human and Animal Sources Uncovers Multiple Resistances from Human Sources." *PloS One* 6 (6). Public Library of Science: e20819. doi:10.1371/journal.pone.0020819.
- Iwasaki, Masahiro, Takaki Yamashiro, Nilmini Beneragama, Takehiro Nishida, Katsuya Kida, Ikko Ihara, June-Ichi Takahashi, and Kazutaka Umetsu. 2011. "Effect of Temperature on Survival of Pathogenic Bacteria in Biogas Plants." *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho* 82 (5): 707–12. doi:10.1111/j.1740-0929.2011.00887.x.
- Jaenicke, Sebastian, Christina Ander, Thomas Bekel, Regina Bisdorf, Marcus Dröge, Karl-Heinz Gartemann, Sebastian Jünemann, et al. 2011. "Comparative and Joint Analysis of Two Metagenomic Datasets from a Biogas Fermenter Obtained by 454-Pyrosequencing." Edited by Ramy K. Aziz. *PLoS ONE* 6 (1). Public Library of Science: e14519. doi:10.1371/journal.pone.0014519.
- Jarman, K H, S T Cebula, A J Saenz, C E Petersen, N B Valentine, M T Kingsley, and K L Wahl. 2000. "An Algorithm for Automated Bacterial Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* 72 (6): 1217–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10740862>.
- Jin, Hao-Jie, Jing Lv, and San-Feng Chen. 2011. "Paenibacillus Sophorae Sp. Nov., a Nitrogen-Fixing Species Isolated from the Rhizosphere of Sophora Japonica." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61 (Pt 4): 767–71. doi:10.1099/ijs.0.021709-0.
- Jjemba, Patrick K. 2002. "The Potential Impact of Veterinary and Human Therapeutic Agents in Manure and Biosolids on Plants Grown on Arable Land: A Review." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 93 (1–3): 267–78. doi:10.1016/S0167-8809(01)00350-4.
- Johne, Annette, Britta Kraushaar, Alexandra Beyermann, Clemens Fechner, Juliane Bräunig, and Alexandra Fetsch. 2011. "Optimierung, Entwicklung Und Validierung von Methoden Zum Selektiven Qualitativen Und Quantitativen Nachweis von MRSA in Lebensmitteln."
- Jutkina, Jekaterina, Carolin Rutgersson, Carl-Fredrik Flach, and D.G. Joakim Larsson. 2016. "An Assay for Determining Minimal Concentrations of Antibiotics That Drive Horizontal Transfer of Resistance." *Science of The Total Environment* 548: 131–38. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.044.
- Kardos, Nelson, and Arnold L Demain. 2011. "Penicillin: The Medicine with the Greatest Impact on Therapeutic Outcomes." *Applied Microbiology and Biotechnology* 92 (4): 677–87.

doi:10.1007/s00253-011-3587-6.

- Kay, P, PA Blackwell, and A Boxall. 2004. "Fate of Veterinary Antibiotics in a Macroporous Tile Drained Clay Soil." *Environmental Toxicology and* <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/03-374/full>.
- Kay, Paul, Paul A. Blackwell, and Alistair B.A. Boxall. 2005. "Transport of Veterinary Antibiotics in Overland Flow Following the Application of Slurry to Arable Land." *Chemosphere* 59 (7): 951–59. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.055.
- Kazimierczak, K. A., K. P. Scott, D. Kelly, and R. I. Aminov. 2009. "Tetracycline Resistome of the Organic Pig Gut." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (6). American Society for Microbiology: 1717–22. doi:10.1128/AEM.02206-08.
- Keen, Patricia L., and Mark H. M. M. Montforts. 2012. *Antimicrobial Resistance in the Environment*. John Wiley & Sons. <https://books.google.com/books?id=wD39Dwt1yyC&pgis=1>.
- Kemper, Nicole. 2008. "Veterinary Antibiotics in the Aquatic and Terrestrial Environment." *Ecological Indicators* 8: 1–13. doi:10.1016/j.ecolind.2007.06.002.
- Kim, Yong-Hak, Kyungran Pak, Jairaj V Pothuluri, Carl E Cerniglia, J.V. Pothuluri, M. Nawaz, C.E. Cerniglia, et al. 2004. "Mineralization of Erythromycin A in Aquaculture Sediments." *FEMS Microbiology Letters* 234 (1). The Oxford University Press: 169–75. doi:10.1016/j.femsle.2004.03.027.
- Klocke, Michael, Pia Mähnert, Kerstin Mundt, Khadidja Souidi, and Bernd Linke. 2007. "Microbial Community Analysis of a Biogas-Producing Completely Stirred Tank Reactor Fed Continuously with Fodder Beet Silage as Mono-Substrate." *Systematic and Applied Microbiology* 30 (2): 139–51. doi:10.1016/j.syapm.2006.03.007.
- Klous, Gijs, Anke Huss, Dick J.J. Heederik, and Roel A. Coutinho. 2016. "Human–livestock Contacts and Their Relationship to Transmission of Zoonotic Pathogens, a Systematic Review of Literature." *One Health* 2: 65–76. doi:10.1016/j.onehlt.2016.03.001.
- Knapp, Charles W., Jan Dolfing, Phillip A. I. Ehlert, and David W. Graham. 2010. "Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940." *Environmental Science & Technology* 44 (2). American Chemical Society: 580–87. doi:10.1021/es901221x.
- Knothe, H. 1977. "A Review of the Medical Considerations of the Use of Tylosin and Other Macrolide Antibiotics as Additives in Animal Feeds." *Infection* 5 (3): 183–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/334674>.
- Kobs, Gary. 1995. "pGEM®-T Vector: Cloning of Modified Blunt-Ended DNA Fragments." *Promega Notes* 55: 28–29.
- Kolpin, Dana W., Edward T. Furlong, Michael T. Meyer, E. Michael Thurman, Steven D. Zaugg, Larry B. Barber, and Herbert T. Buxton. 2002. "Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance." *Environmental Science & Technology* 36 (6). American Chemical Society : 1202–11. doi:10.1021/es011055j.
- Kolz, AC, TB Moorman, and SK Ong. 2005. "Degradation and Metabolite Production of Tylosin in Anaerobic and Aerobic Swine-Manure Lagoons." *Water Environment*. <http://www.ingentaconnect.com/content/wef/wer/2005/00000077/00000001/art0000>

7.

- Krapac, I.G., S. Koikeb, M.T. Meyerc, D.D. Snow, S.-F.J. Choua, R.I. Mackieb, W.R. Roya, and J.C. CheeSanford. 2005. "Long-Term Monitoring of the Occurrence of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance in Groundwater near Swine Confinement Facilities." *US Geological Survey*.
- Krause, Lutz, Naryttza N. Diaz, Robert a. Edwards, Karl Heinz Gartemann, Holger Krömeke, Heiko Neuweiger, Alfred Pühler, et al. 2008. "Taxonomic Composition and Gene Content of a Methane-Producing Microbial Community Isolated from a Biogas Reactor." *Journal of Biotechnology* 136: 91–101. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.06.003.
- Kröber, Magdalena, Thomas Bekel, Naryttza N. Diaz, Alexander Goesmann, Sebastian Jaenicke, Lutz Krause, Dimitri Miller, et al. 2009a. "Phylogenetic Characterization of a Biogas Plant Microbial Community Integrating Clone Library 16S-rDNA Sequences and Metagenome Sequence Data Obtained by 454-Pyrosequencing." *Journal of Biotechnology* 142 (1): 38–49. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.02.010.
- . 2009b. "Phylogenetic Characterization of a Biogas Plant Microbial Community Integrating Clone Library 16S-rDNA Sequences and Metagenome Sequence Data Obtained by 454-Pyrosequencing." *Journal of Biotechnology* 142: 38–49. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.02.010.
- Kröber, Magdalena, Thomas Bekel, Naryttza N Diaz, Alexander Goesmann, Sebastian Jaenicke, Lutz Krause, Dimitri Miller, et al. 2009c. "Phylogenetic Characterization of a Biogas Plant Microbial Community Integrating Clone Library 16S-rDNA Sequences and Metagenome Sequence Data Obtained by 454-Pyrosequencing." *Journal of Biotechnology* 142 (1): 38–49. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.02.010.
- Kumar, K, S C Gupta, S K Baidoo, Y Chander, and C J Rosen. 2005. "Antibiotic Uptake by Plants from Soil Fertilized with Animal Manure." *Journal of Environmental Quality* 34: 2082–85. doi:10.2134/jeq2005.0026.
- Kümmerer, K. 2003. "Significance of Antibiotics in the Environment." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <http://jac.oxfordjournals.org/content/52/1/5.short>.
- Kyselková, Martina, Jiří Jirout, Naděžda Vrchotová, Heike Schmitt, and Dana Elhottová. 2015. "Spread of Tetracycline Resistance Genes at a Conventional Dairy Farm." *Frontiers in Microbiology* 6. Frontiers Media SA: 536. doi:10.3389/fmicb.2015.00536.
- Kyselková, Martina, Lucie Kotrbová, Gamonsiri Bhumibhamon, Alica Chroňáková, Jiří Jirout, Naděžda Vrchotová, Heike Schmitt, and Dana Elhottová. 2015. "Tetracycline Resistance Genes Persist in Soil Amended with Cattle Feces Independently from Chlortetracycline Selection Pressure." *Soil Biology and Biochemistry* 81 (February): 259–65. doi:10.1016/j.soilbio.2014.11.018.
- Larney, Francis J., Andrew F. Olson, Jim J. Miller, and Bonnie C. Tovell. 2014. "Soluble Salts, Copper, Zinc, and Solids Constituents in Surface Runoff from Cattle Manure Compost Windrows." *Canadian Journal of Soil Science* 94 (4). Agricultural Institute of Canada : 515–27. doi:10.4141/cjss2013-114.
- Le Cloarec, M.-F., P.H. Bonte, L. Lestel, I. Lefèvre, and S. Ayrault. 2011. "Sedimentary Record of Metal Contamination in the Seine River during the Last Century." *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 36 (12): 515–29. doi:10.1016/j.pce.2009.02.003.
- Le Pecq, Jean-Bernard, and Claude Paoletti. 1966. "A New Fluorometric Method for RNA and DNA

- Determination." *Analytical Biochemistry* 17 (1): 100–107. doi:10.1016/0003-2697(66)90012-1.
- Leclercq, R, R Cantón, D F J Brown, C G Giske, P Heisig, A P MacGowan, J W Mouton, et al. 2013. "EUCAST Expert Rules in Antimicrobial Susceptibility Testing." *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19 (2): 141–60. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.
- Ledeboer, N. A., K. Das, M. Eveland, C. Roger-Dalbert, S. Mailler, S. Chatellier, and W. M. Dunne. 2007. "Evaluation of a Novel Chromogenic Agar Medium for Isolation and Differentiation of Vancomycin-Resistant Enterococcus Faecium and Enterococcus Faecalis Isolates." *Journal of Clinical Microbiology* 45 (5). American Society for Microbiology: 1556–60. doi:10.1128/JCM.02116-06.
- Lee, J. H. 2003. "Methicillin (Oxacillin)-Resistant Staphylococcus Aureus Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans." *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11). American Society for Microbiology: 6489–94. doi:10.1128/AEM.69.11.6489-6494.2003.
- Leifson, E. 1936. "New Selenite Enrichment Media for the Isolation of Typhoid and Paratyphoid (Salmonella) Bacilli." *American Journal of Epidemiology*. <http://aje.oxfordjournals.org/content/24/2/423.short>.
- Leifson, Einar. 1935. "New Culture Media Based on Sodium Desoxycholate for the Isolation of Intestinal Pathogens and for the Enumeration of Colon Bacilli in Milk and Water." *The Journal of Pathology and Bacteriology* 40 (3). John Wiley & Sons, Ltd.: 581–99. doi:10.1002/path.1700400315.
- Leung, Kam, and Edward Topp. 2001. "Bacterial Community Dynamics in Liquid Swine Manure during Storage: Molecular Analysis Using DGGE/PCR of 16S rDNA." *FEMS Microbiology Ecology* 38 (2–3). Blackwell Publishing Ltd: 169–77. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00895.x.
- Levén, Lotta, Anders R B Eriksson, and Anna Schnürer. 2007. "Effect of Process Temperature on Bacterial and Archaeal Communities in Two Methanogenic Bioreactors Treating Organic Household Waste." *FEMS Microbiology Ecology* 59: 683–93. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00263.x.
- Levine, M. 1943. "The Effect of Concentration of Dyes on Differentiation of Enteric Bacteria on Eosin-Methylene-Blue Agar." *Journal of Bacteriology* 45 (5). American Society for Microbiology (ASM): 471–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16560656>.
- Li, Ning, Junjie Yang, Changsheng Chai, Sheng Yang, Weihong Jiang, and Yang Gu. 2015. "Complete Genome Sequence of Clostridium Carboxidivorans P7(T), a Syngas-Fermenting Bacterium Capable of Producing Long-Chain Alcohols." *Journal of Biotechnology* 211 (October): 44–45. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.430.
- Lin, Jun, Kunihiro Nishino, Marilyn C. Roberts, Marcelo Tolmasky, Rustam I. Aminov, and Lixin Zhang. 2015. "Mechanisms of Antibiotic Resistance." *Frontiers in Microbiology* 6 (February). Frontiers. doi:10.3389/fmicb.2015.00034.
- Linden, Peter K. 2007. "Optimizing Therapy for Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE)." *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 28 (6): 632–45. doi:10.1055/s-2007-996410.

- Liu, Anne, Amie Fong, Elinne Becket, Jessica Yuan, Cindy Tamae, Leah Medrano, Maria Maiz, et al. 2011. "Selective Advantage of Resistant Strains at Trace Levels of Antibiotics: A Simple and Ultrasensitive Color Test for Detection of Antibiotics and Genotoxic Agents." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (3): 1204–10. doi:10.1128/AAC.01182-10.
- Liu, F H, S B Wang, J S Zhang, J Zhang, X Yan, H K Zhou, G P Zhao, and Z H Zhou. 2009. "The Structure of the Bacterial and Archaeal Community in a Biogas Digester as Revealed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and 16S rDNA Sequencing Analysis." *Journal of Applied Microbiology* 106 (3): 952–66. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04064.x.
- Luo, N., S. Pereira, O. Sahin, J. Lin, S. Huang, L. Michel, and Q. Zhang. 2005. "Enhanced in Vivo Fitness of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Jejuni in the Absence of Antibiotic Selection Pressure." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (3). National Academy of Sciences: 541–46. doi:10.1073/pnas.0408966102.
- Lynd, Lee R, Paul J Weimer, Willem H van Zyl, and Isak S Pretorius. 2002a. "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 66 (3): 506–77, table of contents. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209002>.
- . 2002b. "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 66 (3): 506–77, table of contents. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=120791&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- MacConkey, A. 1905. "Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces." *Journal of Hygiene*. http://journals.cambridge.org/abstract_S002217240000259X.
- Mähnert, Pia. 2007. "Kinetik Der Biogasproduktion Aus Nachwachsenden Rohstoffen Und Gülle." Humboldt-Universität zu Berlin.
- Manara, P., and A. Zabaniotou. 2012. "Towards Sewage Sludge Based Biofuels via Thermochemical Conversion – A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (5): 2566–82. doi:10.1016/j.rser.2012.01.074.
- Manyi-Loh, Christy, Sampson Mamphweli, Edson Meyer, Anthony Okoh, Golden Makaka, and Michael Simon. 2013. "Microbial Anaerobic Digestion (Bio-Digesters) as an Approach to the Decontamination of Animal Wastes in Pollution Control and the Generation of Renewable Energy." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 4390–4417. doi:10.3390/ijerph10094390.
- Marti, Romain, Andrew Scott, Yuan-Ching Tien, Roger Murray, Lyne Sabourin, Yun Zhang, and Edward Topp. 2013. "Impact of Manure Fertilization on the Abundance of Antibiotic-Resistant Bacteria and Frequency of Detection of Antibiotic Resistance Genes in Soil and on Vegetables at Harvest." *Applied and Environmental Microbiology* 79 (18): 5701–9. doi:10.1128/AEM.01682-13.
- Martínez, José L. 2012. "Bottlenecks in the Transferability of Antibiotic Resistance from Natural Ecosystems to Human Bacterial Pathogens." *Frontiers in Microbiology* 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00265.
- Martinez, Jose Luis. 2009. "Environmental Pollution by Antibiotics and by Antibiotic Resistance Determinants." *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 157 (11): 2893–2902. doi:10.1016/j.envpol.2009.05.051.
- Marvin, Laure F, Matthew A Roberts, and Laurent B Fay. 2003. "Matrix-Assisted Laser

- Desorption/ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Chemistry." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 337 (1–2): 11–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568176>.
- Matamoros, Víctor, Loc Xuan Nguyen, Carlos A Arias, Steen Nielsen, Maria Mølmer Laugen, and Hans Brix. 2012. "Musk Fragrances, DEHP and Heavy Metals in a 20 Years Old Sludge Treatment Reed Bed System." *Water Research* 46 (12): 3889–96. doi:10.1016/j.watres.2012.04.027.
- Maurer, Hans, and Victoria Maissen. 2009. "Vergleich Der Umweltbestimmungen Im Landwirtschaftsrecht Der EU Und Ausgewählter Mitgliedstaaten Sowie Der Schweiz."
- McDougal, L. K., C. D. Steward, G. E. Killgore, J. M. Chaitram, S. K. McAllister, and F. C. Tenover. 2003. "Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (11). American Society for Microbiology: 5113–20. doi:10.1128/JCM.41.11.5113-5120.2003.
- McHugh, Sharon, Micheal Carton, Thérèse Mahony, and Vincent O'Flaherty. 2003. "Methanogenic Population Structure in a Variety of Anaerobic Bioreactors." *FEMS Microbiology Letters* 219 (2).
- Mendiguchía, Carolina, Carlos Moreno, Manuel P. Manuel-Vez, and Manuel García-Vargas. 2006. "Preliminary Investigation on the Enrichment of Heavy Metals in Marine Sediments Originated from Intensive Aquaculture Effluents." *Aquaculture* 254 (1): 317–25. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.10.049.
- Meyer, Elisabeth, Petra Gastmeier, Maria Deja, and Frank Schwab. 2013. "Antibiotic Consumption and Resistance: Data from Europe and Germany." *International Journal of Medical Microbiology : IJMM* 303 (6–7): 388–95. doi:10.1016/j.ijmm.2013.04.004.
- Ming, LJ. 2003. "Structure and Function of 'metalloantibiotics.'" *Medicinal Research Reviews*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.10052/full>.
- Mladenovska, Z., S. Dabrowski, and B.K. Ahring. 2003. "Anaerobic Digestion of Manure and Mixture of Manure with Lipids: Biogas Reactor Performance and Microbial Community Analysis." *Water Science and Technology* 48 (6).
- Moghaddam, HN, and R Jahanian. 2009. "Immunological Responses of Broiler Chicks Can Be Modulated by Dietary Supplementation of Zinc-Methionine in Place of Inorganic Zinc Sources." *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* <http://www.ajas.info/upload/pdf/22-53.pdf>.
- Monteiro, Sara C, Steve Lofts, and Alistair B A Boxall. 2010. "Pre-assessment of Environmental Impact of Zinc and Copper Used in Animal Nutrition." *EFSA Supporting Publications* 7 (9). doi:10.2903/SP.EFSA.2010.EN-74.
- Morrissey, D.J, M.M Gibbs, S.E Pickmere, and R.G Cole. 2000. "Predicting Impacts and Recovery of Marine-Farm Sites in Stewart Island, New Zealand, from the Findlay–Watling Model." *Aquaculture* 185 (3): 257–71. doi:10.1016/S0044-8486(99)00360-9.
- Mückter, H. 2006. "Antibiotika-Rückstände Im Trinkwasser." 47. Arbeitstagung Des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, Garmisch-Patenkirchen.
- Mudhoo, A., and S. Kumar. 2013. "Effects of Heavy Metals as Stress Factors on Anaerobic Digestion Processes and Biogas Production from Biomass." *International Journal of Environmental*

- Science and Technology* 10 (6). Springer Berlin Heidelberg: 1383–98. doi:10.1007/s13762-012-0167-y.
- Mullis, K., F A Faloona, S J Scharf, R Saiki, G Horn, and H Erlich. 1992. "Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction." *BIOTECHNOLOGY* ... 51: 263–73.
- NCCLS. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*. Seventh Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7. https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjUqOGI5bDJAhVm_nIKHQOuDWYQFggiMAA&url=http%253A%252F%252Fwww.researchgate.net%252Ffile.PostFileLoader.html%253Fid%253D564ceedf5e9d97daf08b45a2%2526assetKey%253DAS%25253A297254750572544.
- Neeno-Eckwall, Eric C, Linda L Kinkel, and Janet L Schottel. 2001. "Competition and Antibiosis in the Biological Control of Potato Scab." *Canadian Journal of Microbiology* 47 (4): 332–40. doi:10.1139/w01-010.
- Nemecek, Thomas, David Dubois, Olivier Huguenin-Elie, and Gérard Gaillard. 2011. "Life Cycle Assessment of Swiss Farming Systems: I. Integrated and Organic Farming." *Agricultural Systems* 104 (3). Elsevier: 217–32.
- Nettmann, E, I Bergmann, S Pramschüfer, K Mundt, V Plogsties, C Herrmann, and M Klocke. 2010. "Polyphasic Analyses of Methanogenic Archaeal Communities in Agricultural Biogas Plants." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (8): 2540–48. doi:10.1128/AEM.01423-09.
- Nicholson, F A, S R Smith, B J Alloway, C Carlton-Smith, and B J Chambers. 2003. "An Inventory of Heavy Metals Inputs to Agricultural Soils in England and Wales." *The Science of the Total Environment* 311 (1–3): 205–19. doi:10.1016/S0048-9697(03)00139-6.
- Nicholson, Jeremy K, Elaine Holmes, and Ian D Wilson. 2005. "Gut Microorganisms, Mammalian Metabolism and Personalized Health Care." *Nature Reviews Microbiology* 3 (5): 431–38. doi:10.1038/nrmicro1152.
- Nies, D. H. 1999. "Microbial Heavy-Metal Resistance." *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (6). Springer-Verlag: 730–50. doi:10.1007/s002530051457.
- Ouddane, B., N. Mikac, A.B. Cundy, L. Quillet, and J.C. Fischer. 2008. "A Comparative Study of Mercury Distribution and Methylation in Mudflats from Two Macrotidal Estuaries: The Seine (France) and the Medway (United Kingdom)." *Applied Geochemistry* 23 (4): 618–31. doi:10.1016/j.apgeochem.2007.11.001.
- Park, Ji-Hyung, Edu Inam, Mohd Harun Abdullah, Dwi Agustiyani, Lei Duan, Thi Thuong Hoang, Kyoung-Woong Kim, et al. 2011. "Implications of Rainfall Variability for Seasonality and Climate-Induced Risks Concerning Surface Water Quality in East Asia." *Journal of Hydrology* 400 (3): 323–32. doi:10.1016/j.jhydrol.2011.01.050.
- Park, Ji-Hyung, Ji-Ho Lee, Seo-Young Kang, and Sei-Young Kim. 2007. "Hydroclimatic Controls on Dissolved Organic Matter (DOM) Characteristics and Implications for Trace Metal Transport in Hwangryong River Watershed, Korea, during a Summer Monsoon Period." *Hydrological Processes* 21 (22). John Wiley & Sons, Ltd.: 3025–34. doi:10.1002/hyp.6511.
- Pei, Ruoting, Sung-Chul Kim, Kenneth H Carlson, and Amy Pruden. 2006. "Effect of River Landscape on the Sediment Concentrations of Antibiotics and Corresponding Antibiotic

- Resistance Genes (ARG).” *Water Research* 40 (12): 2427–35. doi:10.1016/j.watres.2006.04.017.
- Peralta-Videa, Jose R, Martha Laura Lopez, Mahesh Narayan, Geoffrey Saupe, and Jorge Gardea-Torresdey. 2009. “The Biochemistry of Environmental Heavy Metal Uptake by Plants: Implications for the Food Chain.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (8–9): 1665–77. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.005.
- Perkins, Amy E, and Wayne L Nicholson. 2008. “Uncovering New Metabolic Capabilities of *Bacillus Subtilis* Using Phenotype Profiling of Rifampin-Resistant *rpoB* Mutants.” *Journal of Bacteriology* 190 (3). American Society for Microbiology: 807–14. doi:10.1128/JB.00901-07.
- Perry, John D, Amie Davies, Lynne A Butterworth, Andrew L J Hopley, Audrey Nicholson, and F Kate Gould. 2004. “Development and Evaluation of a Chromogenic Agar Medium for Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*.” *Journal of Clinical Microbiology* 42 (10). American Society for Microbiology (ASM): 4519–23. doi:10.1128/JCM.42.10.4519-4523.2004.
- Perry, Julie A, Marcus B. Jones, Scott N. Peterson, Dennis G. Cvitkovitch, and Céline M. Lévesque. 2009. “Peptide Alarmone Signalling Triggers an Auto-Active Bacteriocin Necessary for Genetic Competence.” *Molecular Microbiology* 72 (4). Blackwell Publishing Ltd: 905–17. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06693.x.
- Perry, Julie A, and Gerard D Wright. 2013. “The Antibiotic Resistance ‘mobilome’: Searching for the Link between Environment and Clinic.” *Frontiers in Microbiology* 4 (January): 138. doi:10.3389/fmicb.2013.00138.
- Pitout, J. D D, Patrice Nordmann, Kevin B. Laupland, and Laurent Poirel. 2005. “Emergence of Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) in the Community.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (May): 52–59. doi:10.1093/jac/dki166.
- Poeta, Patricia, Daniela Costa, Gilberto Igrejas, Jorge Rodrigues, and Carmen Torres. 2007. “Phenotypic and Genotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in Faecal Enterococci from Wild Boars (*Sus Scrofa*).” *Veterinary Microbiology* 125 (3–4): 368–74. doi:10.1016/j.vetmic.2007.06.003.
- Popowska, Magdalena, and Agata Krawczyk-Balska. 2013. “Broad-Host-Range IncP-1 Plasmids and Their Resistance Potential.” *Frontiers in Microbiology* 4. Frontiers: 44. doi:10.3389/fmicb.2013.00044.
- Pourcher, A.-M., A. Jadas-Hécart, P. Cotinet, P. Dabert, C. Ziebal, S. Le Roux, R. Moraru, D. Heddadj, and I. Kempf. 2014. “Effect of Land Application of Manure from Enrofloxacin-Treated Chickens on Ciprofloxacin Resistance of Enterobacteriaceae in Soil.” *Science of The Total Environment* 482: 269–75. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.136.
- Power, M, M.J Attrill, and R.M Thomas. 1999. “Heavy Metal Concentration Trends in the Thames Estuary.” *Water Research* 33 (7): 1672–80. doi:10.1016/S0043-1354(98)00394-7.
- Puchas, K. 2006. “Stand Der Technik Bei Der NAWARO-Vergärung.” energytech.at.
- Quinton, John N., and John A. Catt. 2007. “Enrichment of Heavy Metals in Sediment Resulting from Soil Erosion on Agricultural Fields.” *Environmental Science & Technology* 41 (10). American Chemical Society : 3495–3500. doi:10.1021/es062147h.

- Rahube, T.O., and C.K. Yost. 2012. "Characterization of a Mobile and Multiple Resistance Plasmid Isolated from Swine Manure and Its Detection in Soil after Manure Application." *Journal of Applied Microbiology* 112 (6). Blackwell Publishing Ltd: 1123–33. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05301.x.
- Ramos, Sónia, Gilberto Igrejas, José-Luis Capelo-Martinez, and Patrícia Poeta. 2012. "Antibiotic Resistance and Mechanisms Implicated in Fecal Enterococci Recovered from Pigs, Cattle and Sheep in a Portuguese Slaughterhouse." *Annals of Microbiology* 62 (4). Springer-Verlag: 1485–94. doi:10.1007/s13213-011-0402-7.
- Ramunas Stepanauskas, *,†, ‡,§ Travis C. Glenn, † Charles H. Jagoe, § R. Cary Tuckfield, † and Angela H. Lindell, and JV. McArthur†. 2005. "Elevated Microbial Tolerance to Metals and Antibiotics in Metal-Contaminated Industrial Environments." American Chemical Society . doi:10.1021/ES048468F.
- Ratsak, Christiane, Barbara Guhl, Sebastian Zühlke, Thomas Delschen, B Hanisch, B Abbas, W Kratz, et al. 2013. "Veterinary Antibiotic Residues in Manure and Digestates in Northrhine-Westfalia." *Environmental Sciences Europe* 25 (1). Springer Berlin Heidelberg: 7. doi:10.1186/2190-4715-25-7.
- Reasoner, D J, J C Blannon, and E E Geldreich. 1979. "Rapid Seven-Hour Fecal Coliform Test." *Applied and Environmental Microbiology* 38 (2). American Society for Microbiology: 229–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/42349>.
- Resende, J.A., C.G. Diniz, V.L. Silva, M.H. Otenio, A. Bonnafoos, P.B. Arcuri, and J.-J. Godon. 2014. "Dynamics of Antibiotic Resistance Genes and Presence of Putative Pathogens during Ambient Temperature Anaerobic Digestion." *Journal of Applied Microbiology* 117 (6): 1689–99. doi:10.1111/jam.12653.
- Resende, Juliana Alves, Vânia Lúcia Silva, Tamara Lopes Rocha de Oliveira, Samuel de Oliveira Fortunato, Jailton da Costa Carneiro, Marcelo Henrique Otenio, and Cláudio Galuppo Diniz. 2014. "Prevalence and Persistence of Potentially Pathogenic and Antibiotic Resistant Bacteria during Anaerobic Digestion Treatment of Cattle Manure." *Bioresource Technology* 153 (February): 284–91. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.007.
- RindSalmV. 2014. *Verordnung Zum Schutz Gegen Die Salmonellose Der Rinder (Rinder-Salmonellose-Verordnung)*. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.
- Roberts, Adam P, and Peter Mullany. 2009. "A Modular Master on the Move: The Tn916 Family of Mobile Genetic Elements." *Trends in Microbiology* 17 (6): 251–58. doi:10.1016/j.tim.2009.03.002.
- Roberts, Marilyn C. 2005. "Update on Acquired Tetracycline Resistance Genes." *FEMS Microbiology Letters* 245 (2). The Oxford University Press: 195–203. doi:10.1016/j.femsle.2005.02.034.
- Robredo, B, K V Singh, F Baquero, B E Murray, and C Torres. 2000. "Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Animals and Food." *International Journal of Food Microbiology* 54 (3): 197–204. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777070>.
- Rubin, Joseph E. 2013. "Antimicrobial Susceptibility Testing Methods and Interpretation of Results." In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 11–20. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9781118675014.ch2.
- Rubin, Joseph E, Katherine R Ball, and Manuel Chirino-Trejo. 2011. "Antimicrobial Susceptibility

- of *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcus Pseudintermedius* Isolated from Various Animals." *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne* 52 (2). Canadian Veterinary Medical Association: 153–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21532820>.
- Ryan, R. P., and J. M. Dow. 2008. "Diffusible Signals and Interspecies Communication in Bacteria." *Microbiology* 154 (7). Microbiology Society: 1845–58. doi:10.1099/mic.0.2008/017871-0.
- Sahlström, Leena. 2003a. "A Review of Survival of Pathogenic Bacteria in Organic Waste Used in Biogas Plants." *Bioresource Technology* 87 (2): 161–66. doi:10.1016/S0960-8524(02)00168-2.
- . 2003b. "A Review of Survival of Pathogenic Bacteria in Organic Waste Used in Biogas Plants." *Bioresource Technology* 87 (2): 161–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765355>.
- Sahlström, Leena, Elisabeth Bagge, Eva Emmoth, Annika Holmqvist, Marie-Louise Danielsson-Tham, and Ann Albiñ. 2008a. "A Laboratory Study of Survival of Selected Microorganisms after Heat Treatment of Biowaste Used in Biogas Plants." *Bioresource Technology* 99 (16): 7859–65. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.071.
- . 2008b. "A Laboratory Study of Survival of Selected Microorganisms after Heat Treatment of Biowaste Used in Biogas Plants." *Bioresource Technology* 99 (16): 7859–65. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.071.
- Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, and H. Erlich. 1988. "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase." *Science* 239 (4839): 487–91. doi:10.1126/science.2448875.
- Salys, Abigail A, and Carlos F Amábile-Cuevas. 1997. "Why Are Antibiotic Resistance Genes So Resistant to Elimination ?" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (11): 2321–25.
- Sanger, F, S Nicklen, and A R Coulson. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12). National Academy of Sciences: 5463–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968>.
- Sarmah, Ajit K, Michael T Meyer, and Alistair B A Boxall. 2006. "A Global Perspective on the Use, Sales, Exposure Pathways, Occurrence, Fate and Effects of Veterinary Antibiotics (VAs) in the Environment." *Chemosphere* 65 (5): 725–59. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
- Saviozzi, A., A. Biasci, R. Riffaldi, and R. Levi-Minzi. 1999. "Long-Term Effects of Farmyard Manure and Sewage Sludge on Some Soil Biochemical Characteristics." *Biology and Fertility of Soils* 30 (1–2). Springer-Verlag: 100–106. doi:10.1007/s003740050594.
- Schauss, T, T K Wings, J S Brunner, S P Glaeser, W Dott, and P Kämpfer. 2016. "Bacterial Diversity and Antibiotic Resistances of Abundant Aerobic Culturable Bacteria in Input and Output Samples of 15 German Biogas Plants." *Journal of Applied Microbiology* 121 (6): 1673–84. doi:10.1111/jam.13277.
- Schauss, Thorsten, Stefanie P Glaeser, Alexandra Gütschow, Wolfgang Dott, and Peter Kämpfer. 2015. "Improved Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia Coli* in Input and Output Samples of German Biogas Plants by a Selective Pre-Enrichment Procedure." *PloS One* 10 (3): e0119791. doi:10.1371/journal.pone.0119791.
- Schink, Bernhard. 1997. "Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (2): 262–80.

- Schlüter, Andreas, Thomas Bekel, Naryttza N. Diaz, Michael Dondrup, Rudolf Eichenlaub, Karl Heinz Gartemann, Irene Krahn, et al. 2008. "The Metagenome of a Biogas-Producing Microbial Community of a Production-Scale Biogas Plant Fermenter Analysed by the 454-Pyrosequencing Technology." *Journal of Biotechnology* 136: 77–90. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.05.008.
- Schnappinger, D, and W Hillen. 1996. "Tetracyclines: Antibiotic Action, Uptake, and Resistance Mechanisms." *Archives of Microbiology* 165 (6): 359–69.
- Schüller, S. 1998. "Anwendung Antibiotisch Wirksamer Substanzen Beim Tier Und Beurteilung Der Umweltsicherheit Entsprechender Produkte." 3. *Statuskolloquium Ökotoxikologischer Forschungen in Der Euregio Bodensee*.
- Schultheiss, Ute, Helmut Döhler, Ursula Roth, and Henning Eckel. 2003. "Erfassung von Schwermetallströmen in Landwirtschaftlichen Tierproduktionsbetrieben Und Erarbeitung Einer Konzeption Zur Verringerung Der Schwermetalleinträge Durch Wirtschaftsdünger Tierischer Herkunft in Agrarökosysteme."
- Schulz-Zunkel, Christiane, and Frank Krueger. 2009. "Trace Metal Dynamics in Floodplain Soils of the River Elbe: A Review." *Journal of Environmental Quality* 38 (4): 1349–62. doi:10.2134/jeq2008.0299.
- Schwarz, Stefan, Corinna Kehrenberg, Benoît Doublet, Axel Cloeckaert, W.V. Shaw, R.A. Sams, O.J. Martelo, et al. 2004. "Molecular Basis of Bacterial Resistance to Chloramphenicol and Florfenicol." *FEMS Microbiology Reviews* 28 (5). The Oxford University Press: 519–42. doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001.
- SchwSalmoV. 2007. *Verordnung Zur Verminderung Der Salmonellenverbreitung Durch Schlachtschweine (Schweine-Salmonellen-Verordnung)*. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.
- Seiler, Claudia, and Thomas U Berendonk. 2012. "Heavy Metal Driven Co-Selection of Antibiotic Resistance in Soil and Water Bodies Impacted by Agriculture and Aquaculture." *Frontiers in Microbiology* 3 (January): 399. doi:10.3389/fmicb.2012.00399.
- Silveira, E., A. R. Freitas, P. Antunes, M. Barros, J. Campos, T. M. Coque, L. Peixe, and C. Novais. 2013. "Co-Transfer of Resistance to High Concentrations of Copper and First-Line Antibiotics among Enterococcus from Different Origins (Humans, Animals, the Environment and Foods) and Clonal Lineages." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (4): 899–906. doi:10.1093/jac/dkt479.
- . 2014. "Co-Transfer of Resistance to High Concentrations of Copper and First-Line Antibiotics among Enterococcus from Different Origins (Humans, Animals, the Environment and Foods) and Clonal Lineages." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (4). Oxford University Press: 899–906. doi:10.1093/jac/dkt479.
- Sköld, Ola. 2000. "Sulfonamide Resistance: Mechanisms and Trends." *Drug Resistance Updates* 3 (3): 155–60. doi:10.1054/drup.2000.0146.
- Slanetz, L W, and C H Bartley. 1957. "Numbers of Enterococci in Water, Sewage, and Feces Determined by the Membrane Filter Technique with an Improved Medium." *Journal of Bacteriology* 74 (5). American Society for Microbiology (ASM): 591–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13480997>.
- Slock, J, D P Stahly, C Y Han, E W Six, and I P Crawford. 1990. "An Apparent Bacillus Subtilis Folic

- Acid Biosynthetic Operon Containing Pab, an Amphibolic trpG Gene, a Third Gene Required for Synthesis of Para-Aminobenzoic Acid, and the Dihydropteroate Synthase Gene." *Journal of Bacteriology* 172 (12): 7211–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2123867>.
- Smith, D. H. 1967. "R Factor Infection of Escherichia Coli Lyophilized in 1946." *Journal of Bacteriology* 94 (6). American Society for Microbiology (ASM): 2071–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4864414>.
- Smith, Marilyn S, Richard K Yang, Charles W Knapp, Yafen Niu, Nicholas Peak, Margery M Hanfelt, John C Galland, and David W Graham. 2004. "Quantification of Tetracycline Resistance Genes in Feedlot Lagoons by Real-Time PCR." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (12): 7372–77. doi:10.1128/AEM.70.12.7372-7377.2004.
- Spielmeyer, Astrid, Jenny Ahlborn, and Gerd Hamscher. 2014. "Simultaneous Determination of 14 Sulfonamides and Tetracyclines in Biogas Plants by Liquid-Liquid-Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (11): 2513–24. doi:10.1007/s00216-014-7649-3.
- Spielmeyer, Astrid, Bettina Breier, Kathrin Großmeier, and Gerd Hamscher. 2015. "Elimination Patterns of Worldwide Used Sulfonamides and Tetracyclines during Anaerobic Fermentation." *Bioresource Technology* 193 (June): 307–14. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.081.
- Srinivasan, Velusamy, Hyang-Mi Nam, Ashish A. Sawant, Susan I. Headrick, Lien T. Nguyen, and Stephen P. Oliver. 2008. "Distribution of Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes and Class 1 Integrons in Enterobacteriaceae Isolated from Dairy and Nondairy Farm Soils." *Microbial Ecology* 55 (2). Springer-Verlag: 184–93. doi:10.1007/s00248-007-9266-6.
- Statista. 2015. "Überblick Über Biogas-Branchenzahlen in Deutschland in Den Jahren 2015 Und 2016." Statista.de. <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/167676/umfrage/branchendaten-fuer-biogas-in-deutschland/>.
- Stine, O. Colin, Judith A. Johnson, Ananda Keefer-Norris, Kellie L. Perry, Justine Tigno, Sadaf Qaiyumi, Maryruth S. Stine, and J. Glenn Morris. 2007. "Widespread Distribution of Tetracycline Resistance Genes in a Confined Animal Feeding Facility." *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 29. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.11.015.
- Stolze, Yvonne, Martha Zakrzewski, Irena Maus, Felix Eikmeyer, Sebastian Jaenicke, Nils Rottmann, Clemens Siebner, et al. 2015. "Comparative Metagenomics of Biogas-Producing Microbial Communities from Production-Scale Biogas Plants Operating under Wet or Dry Fermentation Conditions." *Biotechnology for Biofuels* 8 (1). BioMed Central: 14. doi:10.1186/s13068-014-0193-8.
- Storteboom, Heather, Mazdak Arabi, Jessica G. Davis, Barbara Crimi, and Amy Pruden. 2010. "Tracking Antibiotic Resistance Genes in the South Platte River Basin Using Molecular Signatures of Urban, Agricultural, And Pristine Sources." *Environmental Science & Technology* 44 (19). American Chemical Society: 7397–7404. doi:10.1021/es101657s.
- Storteboom, Heather N, Sung-Chul Kim, Kathy C Doesken, Kenneth H Carlson, Jessica G Davis, and Amy Pruden. "Response of Antibiotics and Resistance Genes to High-Intensity and Low-Intensity Manure Management." *Journal of Environmental Quality* 36 (6): 1695–1703. doi:10.2134/jeq2007.0006.
- . 2002. "Response of Antibiotics and Resistance Genes to High-Intensity and Low-Intensity

- Manure Management." *Journal of Environmental Quality* 36: 1695–1703. doi:10.2134/jeq2007.0006.
- Storteboom, HN, and SC Kim. 2007. "Response of Antibiotics and Resistance Genes to High-Intensity and Low-Intensity Manure Management." *Journal of* <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/36/6/1695>.
- Swan, A. 1954. "The Use of a Bile-Aesculin Medium and of Maxted's Technique of Lancefield Grouping in the Identification of Enterococci (Group D Streptococci)." *Journal of Clinical Pathology* 7 (2). BMJ Group: 160–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13163202>.
- Tamae, Cindy, Anne Liu, Katherine Kim, Daniel Sitz, Jeeyoon Hong, Elinne Becket, Ann Bui, et al. 2008. "Determination of Antibiotic Hypersensitivity among 4,000 Single-Gene-Knockout Mutants of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 190 (17). American Society for Microbiology: 5981–88. doi:10.1128/JB.01982-07.
- Tang, Wenzhong, Baoqing Shan, Hong Zhang, and Zhanpo Mao. 2010. "Heavy Metal Sources and Associated Risk in Response to Agricultural Intensification in the Estuarine Sediments of Chaohu Lake Valley, East China." *Journal of Hazardous Materials* 176 (1): 945–51. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.11.131.
- Teuber, M. 2001. "Veterinary Use and Antibiotic Resistance." *Current Opinion in Microbiology* 4 (5): 493–99. doi:10.1016/S1369-5274(00)00241-1.
- Teuber, Michael. 2001. "Veterinary Use and Antibiotic Resistance." *Current Opinion in Microbiology* 4 (5): 493–99. doi:10.1016/S1369-5274(00)00241-1.
- Thaker, Maulik, Peter Spanogiannopoulos, and Gerard D Wright. 2010. "The Tetracycline Resistome." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 67 (3): 419–31. doi:10.1007/s00018-009-0172-6.
- Thiele-Bruhn, Sören, and Iris Constanze Beck. 2005. "Effects of Sulfonamide and Tetracycline Antibiotics on Soil Microbial Activity and Microbial Biomass." *Chemosphere* 59: 457–65. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.023.
- Thomas, Christopher M., and Kaare M. Nielsen. 2005. "Mechanisms Of, and Barriers To, Horizontal Gene Transfer between Bacteria." *Nature Reviews Microbiology* 3 (9). Nature Publishing Group: 711–21. doi:10.1038/nrmicro1234.
- Thomas, François, Jan-Hendrik Hehemann, Etienne Rebuffet, Mirjam Czjzek, and Gurvan Michel. 2011a. "Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection." *Frontiers in Microbiology* 2: 93. doi:10.3389/fmicb.2011.00093.
- . 2011b. "Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection." *Frontiers in Microbiology* 2 (January): 93. doi:10.3389/fmicb.2011.00093.
- Thomas Hillenbrand, and (UBA). 2005. "Einträge von Kupfer, Zink Und Blei in Gewässer Und Böden - Analyse Der Emissionspfade Und Möglicher Emissionsminderungsmaßnahmen | Umweltbundesamt." Umweltbundesamt. <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/eintraege-von-kupfer-zink-blei-in-gewaesser-boeden>.
- Tolls, Johannes. 2001. "Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review." *Environmental Science and Technology* 35 (17): 3397–3406. doi:10.1021/es0003021.
- Topp, Edward, Ralph Chapman, Marion Devers-Lamrani, Alain Hartmann, Romain Marti, Fabrice

- Martin-Laurent, Lyne Sabourin, Andrew Scott, and Mark Sumarah. 2016. "Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil Following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-Degrading Sp." *Journal of Environmental Quality* 42 (1): 173–78. Accessed September 6. doi:10.2134/jeq2012.0162.
- Travis, Rebecca M, Carlton L Gyles, Richard Reid-Smith, Cornelis Poppe, Scott A McEwen, Robert Friendship, Nicol Janecko, and Patrick Boerlin. 2006. "Chloramphenicol and Kanamycin Resistance among Porcine Escherichia Coli in Ontario." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58 (1): 173–77. doi:10.1093/jac/dkl207.
- Tsiodras, S, D Pittet, Y Carmeli, G Eliopoulos, H Boucher, and S Harbarth. 2000. "Clinical Implications of Stenotrophomonas Maltophilia Resistant to Trimethoprim-Sulfamethoxazole: A Study of 69 Patients at 2 University Hospitals." *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 32 (6): 651–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11200376>.
- Tuckfield, R. Cary, and J. Vaun McArthur. 2008. "Spatial Analysis of Antibiotic Resistance Along Metal Contaminated Streams." *Microbial Ecology* 55 (4). Springer-Verlag: 595–607. doi:10.1007/s00248-007-9303-5.
- UBA. 2015. "Umweltbelastungen Der Landwirtschaft | Umweltbundesamt." Umweltbundesamt. <http://www.umweltbundesamt.de/themen/boden-landwirtschaft/umweltbelastungen-der-landwirtschaft>.
- Valderas, Michelle Wright, Philip C Bourne, and William W Barrow. 2007. "Genetic Basis for Sulfonamide Resistance in Bacillus Anthracis." *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 13 (1): 11–20. doi:10.1089/mdr.2006.9992.
- Ventura, Marco, Carlos Canchaya, Andreas Tauch, Govind Chandra, Gerald F Fitzgerald, Keith F Chater, and Douwe van Sinderen. 2007. "Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 71 (3): 495–548. doi:10.1128/MMBR.00005-07.
- Vissers, M M M, F Driehuis, M C Te Giffel, P De Jong, and J M G Lankveld. 2007. "Concentrations of Butyric Acid Bacteria Spores in Silage and Relationships with Aerobic Deterioration." *Journal of Dairy Science* 90 (2): 928–36. doi:10.3168/jds.S0022-0302(07)71576-X.
- Vo, An T. T., Engeline van Duijkeren, Wim Gaastra, Ad C. Fluit, H Esaki, A Morioka, K Ishihara, et al. 2010. "Antimicrobial Resistance, Class 1 Integrins, and Genomic Island 1 in Salmonella Isolates from Vietnam." Edited by Stefan Bereswill. *PLoS ONE* 5 (2). Public Library of Science: e9440. doi:10.1371/journal.pone.0009440.
- VO (EG) Nr. 1334/2003. 2003. "VERORDNUNG Nr. 1334/2003 Zur Änderung Der Bedingungen Für Die Zulassung Einer Reihe von Zur Gruppe Der Spurenelemente Zählenden Futtermittelzusatzstoffen." DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN.
- VO (EU) Nr. 37/2010. 2009. "Verordnung (EU) Nr. 37/2010 Der Kommission Vom 22. Dezember 2009 Über Pharmakologisch Wirksame Stoffe Und Ihre Einstufung Hinsichtlich Der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln Tierischen Ursprungs." <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=L:2010:015:0001:0072:DE:PDF>.
- Waksman, S A. 1950. "Streptomycin and Neomycin: An Antibiotic Approach to Tuberculosis." *British Medical Journal* 2 (4679). BMJ Group: 595–600. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14772423>.
- Wang, Hua H, Michele Manuzon, Mark Lehman, Kai Wan, Hongliang Luo, Thomas E Wittum,

- Ahmed Yousef, et al. 2006. "Food Commensal Microbes as a Potentially Important Avenue in Transmitting Antibiotic Resistance Genes." *FEMS Microbiology Letters* 254 (2). The Oxford University Press: 226–31. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00030.x.
- Waring, M.J. 1965. "Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids." *Journal of Molecular Biology* 13 (1): 269–82. doi:10.1016/S0022-2836(65)80096-1.
- Wasserhaushaltsgesetz, WHG. 2009. *Gesetz Zur Ordnung Des Wasserhaushalts*.
- Watcharasukarn, Montira, Prasad Kaparaju, Jean-Philippe Steyer, Karen A Krogfelt, and Irini Angelidaki. 2009. "Screening Escherichia Coli, Enterococcus Faecalis, and Clostridium Perfringens as Indicator Organisms in Evaluating Pathogen-Reducing Capacity in Biogas Plants." *Microbial Ecology* 58 (2): 221–30. doi:10.1007/s00248-009-9497-9.
- Weiland, Peter. 2003. "Production and Energetic Use of Biogas from Energy Crops and Wastes in Germany." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 109 (1–3): 263–74.
- . 2010. "Biogas Production: Current State and Perspectives." *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (4): 849–60. doi:10.1007/s00253-009-2246-7.
- Weiss, Agnes, Valérie Jérôme, Ruth Freitag, and Helmut K Mayer. 2008. "Diversity of the Resident Microbiota in a Thermophilic Municipal Biogas Plant." *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (1): 163–73. doi:10.1007/s00253-008-1717-6.
- Weißbach, Friedrich. 2008. "Zur Bewertung Des Gasbildungspotenzials von Nachwachsenden Rohstoffen." *LANDTECHNIK – Agricultural Engineering* 63 (6): 356–58. doi:10.1515/LT.2008.880.
- Wellington, Elizabeth M H, Alistair B Boxall, Paul Cross, Edward J Feil, William H Gaze, Peter M Hawkey, Ashley S Johnson-Rollings, et al. 2013. "The Role of the Natural Environment in the Emergence of Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria." *The Lancet. Infectious Diseases* 13 (2): 155–65. doi:10.1016/S1473-3099(12)70317-1.
- Wilcks, Andrea, Sigrid Rita Andersen, Tine Rask Licht, C.M.A.P. Franz, W.H. Holzapfel, M.E. Stiles, I. Klare, et al. 2005. "Characterization of Transferable Tetracycline Resistance Genes in Enterococcus Faecalis Isolated from Raw Food." *FEMS Microbiology Letters* 243 (1). The Oxford University Press: 15–19. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.028.
- Winckler, C, and A Grafe. 2000. "Stoffeintrag Durch Tierarzneimittel Und Pharmakologisch Wirksame Futterzusatzstoffe Unter Besonderer Berücksichtigung von Tetrazyklinen." *UBA-Texte 44/0, Berlin*.
- Wings, Tina K., and Wolfgang Dott. 2015. "Ausbreitung von Antibiotika, Mikroorganismen Und Resistenzen Aus Der Intensiv-Tierhaltung Und Deren Minimierung in Biogasanlagen." In *Immissionsschutz*, Band 5, 297–309. http://www.vivis.de/phocadownload/2015_is/2015_IS_297-310_Dott_Wings.pdf.
- Wirth, Roland, Etelka Kovács, Gergely Maróti, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely, and Kornél L Kovács. 2012. "Characterization of a Biogas-Producing Microbial Community by Short-Read next Generation DNA Sequencing." *Biotechnology for Biofuels* 5 (1). BioMed Central: 41. doi:10.1186/1754-6834-5-41.
- Witte, W. 2000. "Selective Pressure by Antibiotic Use in Livestock." *International Journal of Antimicrobial Agents* 16 Suppl 1 (November): S19-24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137404>.

- Witte, W, and M Mielke. 2003. "β-Laktamasen Mit Breitem Wirkungsspektrum." *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung*.
<http://link.springer.com/article/10.1007/s00103-003-0693-3>.
- Wolters, Birgit, Guo-Chun Ding, Robert Kreuzig, Kornelia Smalla, MI. Bahl, LH. Hansen, A. Goesmann, et al. 2016. "Full-Scale Mesophilic Biogas Plants Using Manure as C-Source: Bacterial Community Shifts along the Process Cause Changes in the Abundance of Resistance Genes and Mobile Genetic Elements." *FEMS Microbiology Ecology* 92 (2). The Oxford University Press: 31–43. doi:10.1093/femsec/fiv163.
- Wright, Gerard D. 2010. "Antibiotic Resistance in the Environment: A Link to the Clinic?" *Current Opinion in Microbiology* 13 (5): 589–94. doi:10.1016/j.mib.2010.08.005.
- Wu, Nan, Min Qiao, Bing Zhang, Wang-Da Cheng, and Yong-Guan Zhu. 2010. "Abundance and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Soils Adjacent to Representative Swine Feedlots in China." *Environmental Science & Technology* 44 (18). American Chemical Society: 6933–39. doi:10.1021/es1007802.
- Xiong, Wenguang, Zhenling Zeng, Yiming Zhang, Xueyao Ding, and Yongxue Sun. 2015. "Fate of Metal Resistance Genes in Arable Soil after Manure Application in a Microcosm Study." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113 (March): 59–63. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.11.026.
- Xu, Jia-Qing, Rui-Lian Yu, Xiao-Yi Dong, Gong-Ren Hu, Xue-Song Shang, Qun Wang, and Hu-Wei Li. 2012. "Effects of Municipal Sewage Sludge Stabilized by Fly Ash on the Growth of Manilagrass and Transfer of Heavy Metals." *Journal of Hazardous Materials* 217: 58–66. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.02.065.
- Xu, Junyi, Claudia Gallert, and Josef Winter. 2007. "Multiple Antibiotic Resistances of Enterococcus Isolates from Raw or Sand-Filtered Sewage." *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (2): 493–500. doi:10.1007/s00253-006-0668-z.
- Yang, Shinwoo, and Kenneth Carlson. 2003. "Evolution of Antibiotic Occurrence in a River through Pristine, Urban and Agricultural Landscapes." *Water Research* 37 (19): 4645–56. doi:10.1016/S0043-1354(03)00399-3.
- Yazdankhah, Siamak, Knut Rudi, and Aksel Bernhoft. 2014. "Zinc and Copper in Animal Feed - Development of Resistance and Co-Resistance to Antimicrobial Agents in Bacteria of Animal Origin." *Microbial Ecology in Health and Disease* 25 (January). doi:10.3402/mehd.v25.25862.
- Yu, Z., F. C. Michel, G. Hansen, T. Wittum, and M. Morrison. 2005. "Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of Genes Encoding Tetracycline Resistance." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11). American Society for Microbiology: 6926–33. doi:10.1128/AEM.71.11.6926-6933.2005.
- Zethner, Gerhard. 2007. "Kupfer Und Zink Im Wirtschaftsdünger von Schweine- Und Geflügelmastbetrieben." Umweltbundesamt.
- Zhao, Bingzi, Morihiro Maeda, Jiabao Zhang, Anning Zhu, and Yasuo Ozaki. 2006. "Accumulation and Chemical Fractionation of Heavy Metals in Andisols after a Different, 6-Year Fertilization Management." *Environmental Science and Pollution Research International* 13 (2): 90–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612897>.
- Zipper, Hubert, and Herwig Brunner. 2004. "Investigations on DNA Intercalation and Surface Binding by SYBR Green I, Its Structure Determination and Methodological Implications."

Nucleic Acids ... 32 (12): 1–10. doi:10.1093/nar/gnh101.

VIII. ANHANG

Tabelle A1 Charakterisierung der Biogasanlagen, insbesondere der Substratzusammensetzung und Anlagenkapazität nach Angaben der Anlagenbetreiber.

Biogasanlage		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Installierte Leistung	[kW]	250	500	250	250	250	350	500	190	45	530	787	5240	190	190	210
Wirkungsgrad	[%]	-	-	43	43	-	-	-	-	37	45	-	40,9	39	-	38,5
Gesamtverweilzeit	Tage	380	110	140	227	170	240	75	270	42	100	175	118	235	170	130
Temperaturniveau	mesophil/ thermophil	meso.	meso.	meso.	meso.	meso.	meso.	meso.	meso.	meso.	meso.	thermo.	thermo.	meso.	meso.	meso.
Fermentervolumen	[m³]	1800	1500	1500	1700	1700	2000	1200	1400	600	2000	1400	4000	1100	1200	500
Methanmenge	[%]	54	-	-	50	54	-	60	52	-	53	-	54	52	54	-
Gülle [tTS/d]	S-Mast*	0,42	0,81	0,07			0,60							0,30		
	R-Mast**	0,15			0,75			0,05	0,08			0,83			0,25	0,49
	Milchvieh		0,34	0,81		1,50	0,75		0,23	0,60	0,91					
	Σ	0,57	1,15	0,88	0,75	1,50	0,75	0,05	0,30	0,60	0,98	0,83		0,30	0,25	0,49
Festmist [tTS/d]	R-Mast	5,0	8,0		6,8	5,0			1,2						2,9	
	Milchvieh			11,0			4,0									
	Geflügel-Mast	0,8	4,0			2,5							11,0			1,0
	Legehenne	0,5									5,0					
	Pferd		4,0	3,0											1,0	3,0
	Σ	6,3	16,0	14,0	6,8	7,5	4,0		1,2		5,0		11,0		3,9	4,0
	Σ G + F	6,8	17,1	14,9	7,6	9,0	5,35		1,5	0,6	6,0	0,8	11,0	0,3	4,1	4,5
% NaWaRo [tTS/d]	Mais	7,0	8,0	2,2	10,0	9,0	9,3		7,5		18,0	36,0	25,5	8,0	7,6	3,0
	sonst.	1,2	8,0	2,6	4,0	1,0	7,4	21,0	1,0	3,0	0,0	0,0	0,0	2,0	1,5	5,0
	Σ	8,2	16,0	4,8	14,0	10,0	16,7	21,0	8,5	3,0	18,0	36,0	25,5	10,0	9,1	8,0
	% Anteil	54,6	48,3	24,4	65,0	54,0	75,7	100,0	85,0	83,3	75,1	97,8	69,9	97,1	68,9	64,0

- Keine Angabe

Tabelle A2 Chemische Charakterisierung von Eingangs- und Ausgangsproben der 15 Biogasanlagen im Screening 2012 und Jahresgang 2013. Daten zu Abbildung 6.

2012	BGA	DOC [g/kgTS] wässriges Eluat		CSB [g/kgTS] wässriges Eluat		Gesamt-N [g/kgTS] wässriges Eluat		Ammonium [g/kgTS] wässriges Eluat		Phosphat [g/kg TS] wässriges Eluat	
		E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
	1	24,7	21,4	1.186,5	783,2	53,5	52,5	36,8	45,9	32,2	24,0
	2	86,8	24,7	582,8	769,6	40,7	53,4	25,4	48,2	30,9	28,9
	3	35,2	26,4	488,2	696,4	30,3	43,4	16,8	37,4	4,2	8,0
	4	22,4	19,2	721,7	735,5	31,8	46,7	15,0	30,4	7,1	5,6
	5	81,4	37,5	875,0	921,8	35,9	77,4	14,0	70,8	10,0	22,6
	6	25,9	23,0	680,4	778,9	34,7	49,6	17,9	32,5	18,6	29,4
	7	25,0	18,8	596,4	634,1	19,7	175,9	15,3	337,9	4,8	10,4
	8	42,2	38,6	525,3	780,9	28,7	58,9	16,0	42,2	0,9	13,2
	9	25,7	26,1	782,7	720,6	23,5	38,0	6,6	22,3	11,1	18,3
	10	50,6	41,2	692,0	725,2	40,6	67,4	18,9	61,5	16,9	29,6
	11	30,4	27,9	948,6	998,7	41,2	59,2	22,3	43,1	15,2	23,9
	12	113,2	72,2	569,6	1.082,6	28,9	39,0	18,1	60,3	11,6	23,0
	13	16,3	35,1	781,7	880,1	39,0	60,1	33,8	56,9	51,5	30,3
	14	40,3	29,9	716,9	867,1	31,2	52,2	14,6	42,5	17,5	22,4
	15	107,5	24,3	1.813,2	783,2	102,1	67,8	82,7	65,5	67,3	34,7
2013											
13. Jan	1	41,8		843,8		30,8		21,2		14,0	
	8	16,6		599,8		24,8		16,2		9,2	
	15	42,4		850,9		40,2		35,8		30,6	
13. Feb	1	59,8	41,4	367,0	545,9	29,3	51,2	17,9	47,3	23,0	21,2
	8	22,0	37,1	569,0	731,1	n.b.	46,6	12,5	38,3	10,0	20,6
	15	101,6	52,9	559,6	623,8	49,0	70,3	41,0	74,1	32,0	36,2
13. Mrz	1	41,8	36,1	604,9	914,8	36,0	70,3	23,8	59,8	16,1	24,7
	8	26,1	27,5	984,4	1213,1	30,6	57,6	19,7	51,0	15,1	27,8
	15	66,3	43,1	815,9	627,5	52,0	60,4	43,9	68,7	33,1	37,2
13. Apr	1	31,8	100,8	645,6	1229,9	21,4	107,9	10,2	108,3	29,9	17,3
	8	18,8	35,1	643,7	775,6	25,8	50,5	16,1	44,0	16,7	21,6
	15	23,1	42,0	789,4	686,9	77,0	103,3	43,2	65,4	32,1	32,2
13. Mai	1		27,1		480,0		38,6		38,0		15,7
	8		23,2		489,2		32,8		26,4		12,7
	15		42,9		672,6		67,5		71,9		34,7

n.b. nicht bestimmbar

Tabelle A3 Wässrige Verfügbarkeit von Kupfer und Zink. Weiterführende Daten zu Abbildung 7.

2012	BGA	Kupfer				Zink			
		E		A		E		A	
		[mg/kg TS]	[%]	[mg/kg TS]	[%]	[mg/kg TS]	[%]	[mg/kg TS]	[%]
	1	51,1	17,1	65,8	-	253,1	-	349,8	-
	2	81,6	-	102,7	-	391,4	-	592,6	-
	3	26,8	13,8	32,3	16,6	194,7	-	180,7	-
	4	30,1	11,6	37,1	14,9	193,7	-	218,0	-
	5	55,3	-	99,0	-	261,3	-	389,8	-
	6	166,6	2,3	56,5	15,5	1168,6	-	321,2	-
	7	40,2	-	77,1	-	48,6	-	458,5	12,48
	8	37,8	11,1	35,0	26,4	235,2	-	220,5	-
	9	16,3	0,0	19,9	-	109,0	-	117,9	-
	10	75,6	12,7	78,8	36,2	330,5	-	377,5	-
	11	72,8	8,2	58,6	14,5	248,6	-	213,5	-
	12	61,1	32,8	57,9	30,1	455,4	13,20	436,4	-
	13	64,7	9,3	29,9	36,8	405,9	-	172,8	-
	14	40,5	12,5	37,4	18,0	387,9	-	280,1	-
	15	75,4	20,4	72,8	11,4	568,4	-	448,0	-
	Maissilage (BGA15)	4,88				28,8			
2013	BGA								
13.1	1	44,8	11,6			238,3	-		
	8	42,4	8,3			236,5	-		
	15	80,4	7,8			512,5	-		
13.2	1	83,7	10,2	60,4	15,9	434,1	-	281,4	-
	8	31,3	14,4	36,8	16,5	182,2	-	205,8	-
	15	75,0	14,2	76,4	9,7	543,3	-	441,5	-
13.3	1	99,3	-	58,8	-	515,7	-	266,2	-
	8	47,3	10,8	33,3	27,6	327,6	-	218,0	-
	15	95,7	10,7	76,0	10,7	820,6	-	487,5	-
13.4	1	90,1	4,8	93,2	33,1	400,9	-	334,3	-
	8	39,8	9,4	32,1	19,1	148,6	-	128,9	-
	15	78,0	1,2	72,2	1,2	430,0	-	233,0	-
13.5	1			93,4	11,5			424,6	-
	8			38,1	10,5			243,1	-
	15			83,6	1,2			490,5	-

Tabelle A4 Anzahl aller identifizierten Isolate in Eingangs- und Ausgangsproben der 15 Biogasanlagen im Screening 2012. Isolate sind nach Phylum, Familie und Gattung eingeteilt ohne Bezug zum Ursprungsmedium. Daten der Anlagen BGA1-7 und BGA12 wurden am IAM der Justus-Liebig-Universität Gießen generiert.

		Eingang															Ausgang																
Familie	Gattung	ges.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	ges.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Actinobacteria																																	
Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>	4	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	41	0	0	2	1	0	0	0	7	0	14	1	3	1	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dermabacteraceae	<i>Brachybacterium</i>	3	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Intrasporangiaceae	<i>Janibacter</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Jonesiaceae	<i>Jonesia</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	34	1	0	0	3	0	0	2	15	3	6	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Citricoccus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Microbacteriaceae	<i>Leucobakter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
	<i>Microbacterium</i>	11	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	2	5	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
Nakamurellaceae	<i>Nakamurella</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Sanguibacteraceae	<i>Sanguibacter</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Bacteroidetes																																	
Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Myroides</i>	19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	2	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Ornithobacterium</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Empedobacter</i>	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i>	17	0	1	1	1	0	0	0	1	4	1	7	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	0	0	0
Firmicutes																																	
Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>	7	0	2	0	1	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	117	6	2	0	4	4	6	9	19	37	1	16	1	2	7	3	375	6	7	9	9	13	8	11	52	68	51	22	9	35	31	44
	<i>Gracilibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Lysinibacillus</i>	25	0	0	0	1	0	0	0	7	7	2	0	0	7	0	1	55	2	1	1	0	4	0	2	16	0	9	7	1	8	1	3
	<i>Oceanobacillus</i>	4	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	5	2	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Ornithinibacillus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	<i>Virgibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	27	0	0	0	0	0	0	0	7	8	4	4	0	4	0	0	34	0	0	0	0	0	0	0	7	13	4	7	0	3	0	0
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	117	7	0	7	3	5	2	1	19	16	19	7	2	8	12	9	107	2	8	0	0	0	3	1	20	19	21	0	1	11	13	8
	<i>Vagococcus</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	1	0	0	
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	10	2	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	1	8	3	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	
	<i>Pediococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Leuconostocaceae	<i>Weissella</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	
	<i>Paenibacillus</i>	20	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	8	0	6	2	3	48	1	0	0	0	0	0	1	8	0	9	8	0	4	12	5
Planococcaceae	<i>Planococcus</i>	4	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Kurthia</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	7	0	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	<i>Solibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	2	3	
	<i>Sporosarcina</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	
	<i>Viridibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	2	
Staphylococcaceae	<i>Jeotgalicoccus</i>	5	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>Staphylococcus</i>	64	2	2	3	1	5	1	0	8	1	16	2	0	10	5	8	8	0	2	0	0	0	1	0	3	1	0	0	0	1	0	0

Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	2	0	0	0	4	1	0	0	0	0	4	1	0	8	0								
									Eingang												Ausgang																				
Family	Gattung	ges.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	ges.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15								
Proteobacteria																																									
Acetobacteraceae	<i>Acetobacter</i>	4	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Alcaligenaceae	<i>Achromobacter</i>	10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	3	6	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0								
	<i>Advenella</i>	6	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	8	0	1	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	<i>Alcaligenes</i>	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	4	0	2	17	0	0	0	0	1	0	2	6	3	0	0	0	0	0	5								
	<i>Bordetella</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	4	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0									
	<i>Paenalcaligenes</i>	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2								
	<i>Pusillimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i>	22	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	4	0	3	7	5	35	0	5	2	0	7	4	0	2	2	0	9	0	4	0	0								
	<i>Pseudochrobactrum</i>	4	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2									
Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>	6	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	1	6									
Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	4	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
	<i>Hydrogenophaga</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	17	1	1	0	1	2	0	0	8	1	0	1	0	0	1	1	19	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	1	1	0	0								
	<i>Hafnia</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0									
	<i>Enterobacter</i>	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0									
	<i>Escherichia/Shigella</i>	44	2	1	1	0	0	2	0	18	8	4	3	1	0	3	1	5	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	1								
	<i>Morganella</i>	4	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0									
	<i>Proteus</i>	18	0	2	0	0	0	1	0	0	1	1	6	0	1	2	4	24	1	2	0	0	0	1	0	5	10	0	0	0	4	0	1								
	<i>Providencia</i>	7	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	1	0	7	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	4									
	<i>Serratia</i>	24	0	0	0	1	0	0	0	1	4	16	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0								
	<i>Yersinia</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0									
Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	43	5	2	0	0	6	4	0	7	10	5	1	0	2	0	1	7	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	1	0	0	0								
	<i>Psychrobacter</i>	8	0	0	1	2	0	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Phyllobacteriaceae	<i>Aquamicrobium</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	46	0	0	4	2	2	1	0	7	2	0	12	5	6	3	2	43	1	3	1	3	1	2	1	3	0	0	4	2	6	3	13								
Rhodobacteraceae	<i>Castellibacterium</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	<i>Paracoccus</i>	3	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0								
Xanthomonadaceae	<i>Pseudoxanthomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0								
	<i>Ignatzschineria</i>	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	<i>Stenotrophomonas</i>	15	2	2	0	0	0	0	0	4	0	4	0	0	1	1	1	14	0	0	0	0	0	0	0	7	5	0	1	0	0	0	1								

Tabelle A5 Anzahl Isolate in Eingangs- und Ausgangsproben der 15 Biogasanlagen im *screening* 2012 bezogen auf Ursprungsmedien. Daten der Anlagen BGA1-7 und BGA12 wurden am IAM der Justus-Liebig-Universität Gießen generiert.

Eingang														Ausgang													
Actinobacteria																											
Familie	Gattung	ges.	EMB	MC	SS	ESBL	CASO	R2A	MSA	VRE	MRSA	S&B	GEA	Ges.	EMB	MC	SS	ESBL	CASO	R2A	MSA	VRE	MRSA	S&B	GEA		
Cellulomonadaceae	Cellulomonas	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Corynebacteriaceae	Corynebacterium	9	0	0	0	0	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Dermabacteraceae	Brachybacterium	3	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Intrasporangiaceae	Janibacter	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Jonesiaceae	Jonesia	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Micrococcaceae	Arthrobacter	7	0	2	0	0	4	5	4	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
	Citricoccus	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Leucobakter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0		
	Microbacterium	6	0	0	0	0	5	3	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0		
Nakamurellaceae	Nakamurella	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
Sanguibacteraceae	Sanguibacter	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Bacteroidetes																											
Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Myroides	4	0	0	0	1	2	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Ornithobacterium	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Empedobacter	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	8	0	0	0	0	2	2	0	5	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0		
Firmicutes																											
Aerococcaceae	Aerococcus	4	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
Bacillaceae	Bacillus	14	1	0	2	0	9	8	10	1	6	0	0	15	4	5	2	1	15	14	15	0	8	1	1		
	Gracilibacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
	Lysinibacillus	6	0	0	0	0	3	3	0	0	3	1	0	12	0	0	0	0	6	10	0	0	7	0	0		
	Oceanobacillus	2	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	3	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0		
	Ornithinibacillus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
	Virgibacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0		
Enterococcaceae	Enterococcus	14	1	1	0	0	4	2	0	2	3	12	7	11	0	2	1	0	1	2	0	2	2	10	6		
	Vagococcus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1		
Lactobacillaceae	Lactobacillus	5	0	0	0	0	0	1	0	1	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1		
	Pediococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
Leuconostocaceae	Weissella	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Paenibacillaceae	Brevibacillus	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0		
	Paenibacillus	4	0	0	0	0	1	1	1	0	4	0	0	8	3	0	0	0	5	5	0	2	3	0	0		
Planococcaceae	Planococcus	2	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Kurthia	4	0	1	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
	Solibacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0		
	Sporosarcina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0		
	Viridibacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0		
Staphylococcaceae	Jeotgalicoccus	3	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Staphylococcus	13	0	2	1	0	5	4	9	0	2	0	4	5	1	0	1	0	2	0	1	1	0	0	1		
Streptococcaceae	Streptococcus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0		

Familie	Gattung	Eingang												Ausgang											
		ges.	EMB	MC	SS	ESBL	CASO	R2A	MSA	VRE	MRSA	S&B	GEA	Ges.	EMB	MC	SS	ESBL	CASO	R2A	MSA	VRE	MRSA	S&B	GEA
<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacter</i>	2	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>	3	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter</i>	4	0	3	1	2	0	0	0	0	1	0	0	3	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Advenella</i>	5	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Alcaligenes</i>	4	1	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	5	2	2	1	1	1	0	0	1	0	0	0
	<i>Bordetella</i>	2	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	<i>Paenkaligenes</i>	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Pusillimonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	7	0	4	3	3	0	1	0	2	1	1	0	8	1	3	4	6	0	0	0	1	0	0	0
	<i>Pseudochrobactrum</i>	4	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0
<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	5	1	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas</i>	3	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Hydrogenophaga</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	9	0	1	5	4	1	1	0	1	0	0	0	3	1	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0
	<i>Hafnia</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Enterobacter</i>	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia/Shigella</i>	11	3	6	1	5	2	2	0	0	1	0	0	4	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Morganella</i>	3	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Proteus</i>	8	1	2	6	0	0	1	0	0	0	0	0	7	1	2	4	0	0	0	0	0	1	0	0
	<i>Providencia</i>	4	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Serratia</i>	5	0	1	1	4	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Yersinia</i>	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Halomonadaceae</i>	<i>Halomonas</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	10	4	3	0	4	7	7	0	0	0	0	0	2	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Psychrobacter</i>	5	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Aquamicrobium</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	11	2	2	7	8	3	1	0	0	0	0	0	13	0	1	9	6	1	1	0	0	0	0	0
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Castellibacterium</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Paracoccus</i>	3	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Ignatzschineria</i>	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Stenotrophomonas</i>	7	0	0	0	2	6	2	0	0	0	0	0	4	1	0	1	3	1	0	0	0	0	0	0

Tabelle A6 Anteilige Häufigkeit der der Familien auf den verwendeten Medien.

Me- dien	Anteil [%]	Familie	Anteil [%]	Eingang		
				Familie	Anteil [%]	Familie
EMB	23	<i>Enterobacteriaceae</i>	20	<i>Moraxellaceae</i>	10	<i>Bacillaceae/ Pseudomonadaceae</i>
MC	32	<i>Enterobacteriaceae</i>	15	<i>Brucellaceae/Moraxellaceae</i>	1	<i>Staphylococcaceae/Alcaligenaceae</i>
SS	47	<i>Enterobacteriaceae</i>	32	<i>Pseudomonadaceae</i>	9	<i>Brucellaceae</i>
ESBL	50	<i>Enterobacteriaceae</i>	18	<i>Pseudomonadaceae</i>		
CASO	32	<i>Bacillaceae</i>	13	<i>Corynebacteriaceae</i>	11	<i>Micrococcaceae</i>
R2A	25	<i>Bacillaceae</i>	12	<i>Micrococcaceae</i>	10	<i>Corynebacteriaceae</i>
MSA	39	<i>Staphylococcaceae</i>	37	<i>Bacillaceae</i>	9	<i>Corynebacteriaceae</i>
MRSA	32	<i>Bacillaceae</i>	22	<i>Paenibacillaceae</i>	12	<i>Enterococcaceae/Planococcaceae</i>
SB	91	<i>Enterococcaceae</i>	5	<i>Lactobacillaceae</i>	2	<i>Bacillaceae</i>
GEA	72	<i>Enterococcaceae</i>	13	<i>Staphylococcaceae</i>	7	<i>Lactobacillaceae</i>
VRE	30	<i>Sphingobacteriaceae</i>	26	<i>Flavobacteriaceae</i>	12	<i>Alcaligenaceae/Brucellaceae</i>
Me- dien	Anteil [%]	Familie	Anteil [%]	Ausgang		
				Familie	Anteil [%]	Familie
EMB	29	<i>Alcaligenaceae</i>	25	<i>Bacillaceae</i>	13	<i>Paenibacillaceae</i>
MC	42	<i>Bacillaceae</i>	20	<i>Enterobacteriaceae</i>	17	<i>Alcaligenaceae</i>
SS	36	<i>Enterobacteriaceae</i>	25	<i>Pseudomonadaceae</i>	19	<i>Rhodobacteraceae</i>
ESBL	24	<i>Brucellaceae/Rhodobacteraceae</i>	16	<i>Xanthomonadaceae/Pseudomonadaceae</i>	7	<i>Alcaligenaceae</i>
CASO	86	<i>Bacillaceae</i>	5	<i>Paenibacillaceae</i>	2	
R2A	78	<i>Bacillaceae</i>	17	<i>Paenibacillaceae</i>	2	<i>Alcaligenaceae</i>
MSA	94	<i>Bacillaceae</i>	2	<i>Enterobacteriaceae/</i>	2	
MRSA	72	<i>Bacillaceae</i>	14	<i>Enterococcaceae</i>	13	<i>Paenibacillaceae</i>
SB	66	<i>Enterococcaceae</i>	27	<i>Streptococcaceae</i>	5	<i>Lactobacillaceae</i>
GEA	87	<i>Enterococcaceae</i>	4	<i>Bacillaceae</i>	4	<i>Staphylococcaceae</i>
VRE	28	<i>Paenibacillaceae</i>	23	<i>Caulobacteraceae</i>	13	<i>Brucellaceae</i>

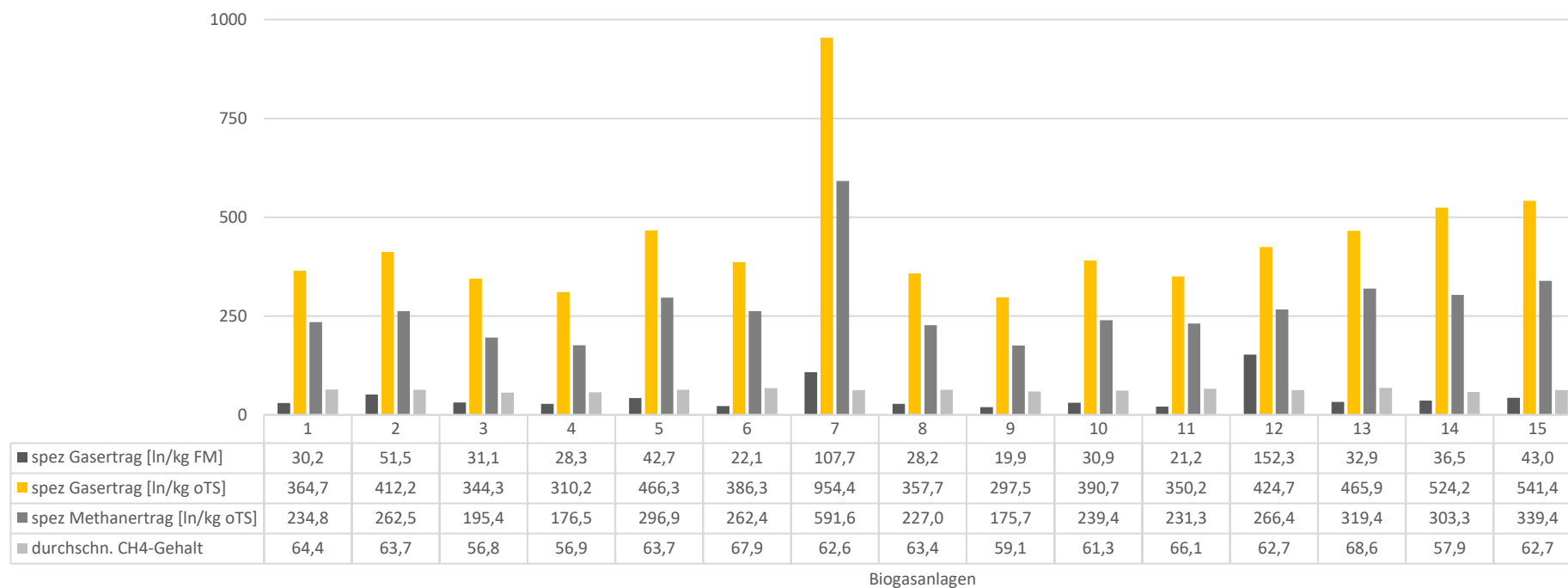


Abbildung A1 Gasanalytik der Biogasanlagen 1-15 im Screening 2012, durchgeführt von Fritzmeier Umwelttechnik GmbH.

Katalog-Nr.		Kategorie		Bezeichnung								MERLIN	
ES-VET-MHK		X		MICRONAUT-S Prof. Dott VET-MHK								Diagnostika	
Layout		K		Produktion von 1500 Platten mit diesem Layout akzeptiert: _____ Datum: _____								Aktualisierungsdatum: 11.01.2012	
1 Test		Druckdatum: 11.01.2012											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	AMX 64	OXA 32	CET 32	CUC 32/4	CEQ 32	CQC 32/4	ENR 8	TET 32	TLS 16	FLL 64	T/S 8/152	SMO 256	
B	AMX 32	OXA 16	CET 16	CUC 16/4	CEQ 16	CQC 16/4	ENR 4	TET 16	TLS 8	FLL 32	T/S 4/76	SMO 128	
C	AMX 16	OXA 8	CET 8	CUC 8/4	CEQ 8	CQC 8/4	ENR 2	TET 8	TLS 4	FLL 16	T/S 2/38	SMO 64	
D	AMX 8	OXA 4	CET 4	CUC 4/4	CEQ 4	CQC 4/4	ENR 1	TET 4	TLS 2	FLL 8	T/S 1/19	SMO 32	
E	AMX 4	OXA 2	CET 2	CUC 2/4	CEQ 2	CQC 2/4	ENR 0,5	TET 2	TLS 1	FLL 4	T/S 0,5/9,5	SMO 16	
F	AMX 2	OXA 1	CET 1	CUC 1/4	CEQ 1	CQC 1/4	ENR 0,25	TET 1	TLS 0,5	FLL 2	T/S 0,25/4,75	SMO 8	
G	AMX 1	OXA 0,5	CET 0,5	CUC 0,5/4	CEQ 0,5	CQC 0,5/4	ENR 0,125	TET 0,5	TLS 0,25	FLL 1	T/S 0,125/2,375	SMO 4	
H	AMX 0,5	OXA 0,25	CET 0,25	CUC 0,25/4	CEQ 0,25	CQC 0,25/4	ENR 0,0625	TET 0,25	TLS 0,125	FLL 0,5	T/S 0,0625/ 1,1875	GC	

Abbildung A2 Plattenkonfiguration zur MHK-Bestimmung ausgewählter Mikroorganismen über Mikrobouillondilutionsverfahren; Antibiotikakonzentration in mg/L. AMX: Amoxicillin, CEQ: Cefquinom, CQC: Cefquinom/Clavulansäure, CET: Ceftiofur, CUC: Ceftiofur/Clavulansäure, ENR: Enrofloxacin; FLL: Florfenicol, OXA: Oxacillin, SMO: Sulfmethoxazol; TET: Tetracyclin, T/S: Trimethoprim/Sulfmethoxazol, TLS: Tylosin, GC: Wachstumskontrolle.

Tabelle A7 Klinische Breakpoints (CLSI 2014).

Familie	Amoxicillin		Oxacillin		Enrofloxacin		Tetracyclin		Trimethoprim/ Sulfamethoxazol		Sulfamethoxazol	
	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>
<i>Enterococcaceae</i>	4	8			1	4	4	16	2/38	8/152	100	350
<i>Enterobacteriaceae</i>	8	8			2	4	4	16	2/38	4/76	256	512
<i>Acinetobacter</i>					1	4	4	16	2/38	4/76		
<i>Staphylococcaceae</i>			2	4	1	4	4	16	2/38	8/152	100	350

Tabelle A8 Biogasproduktion und –zusammensetzung in Fermenterstudien mit Substrat aus BGA15 und BGA14.

Zeitraum [Versuchstage] Antibiotika	Phase 1 <i>tägliche Antibiotikazugabe</i>			Phase 2 <i>keine Antibiotikazugabe</i>		
	Fermenter 1	Fermenter 2	Fermenter 3	Fermenter 1	Fermenter 2	Fermenter 3
		Sulfadiazin, Sulfame- thazin, Trime- thoprim	Chlortetracyc- lin, Tetracyc- lin		Sulfadiazin, Sulfame- thazin, Trime- thoprim	Chlortetracyclin, Tetracyclin
BGA15						
Ø tägl. Gasproduktion [L _N /kg FM Substrat*d]	65,0	70,8	67,3	64,2	69,5	65,2
Ø spez. Methanertrag [L _N /kg oTS Substrat]	303,1	329,9	313,4	288,4	311,4	293,1
Ø CH ₄ -Gehalt [%]	53,9	53,8	53,8	54,1	54,0	54,2
Ø CO ₂ -Gehalt [%]	46,1	46,2	46,2	45,9	46,0	45,8
H ₂ -Gehalt [ppm]	51,4	35,3	5,6	29,5	31,2	2,0
H ₂ S-Gehalt [ppm]	254,0	207,7	234,3	352,8	269,8	284,9
BGA14						
Ø tägl. Gasproduktion [L _N /kg FM Substrat*d]	112,2	110,2	115,3	126,5	123,3	128,4
Ø spez. Methanertrag [L _N /kg oTS Substrat]	315,2	311,1	325,3	346,4	337,2	351,8
Ø CH ₄ -Gehalt [%]	53,9	54,2	54,2	53,6	53,6	53,6
Ø CO ₂ -Gehalt [%]	46,1	45,8	45,8	46,4	46,4	46,4
H ₂ -Gehalt [ppm]	21,4	16,1	24,7	7,3	7,2	12,9
H ₂ S-Gehalt [ppm]	327,6	401,1	254,3	169,4	265,9	158,7

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Eintragspfade landwirtschaftlich generierter Kontaminanten in Umwelt und Lebensmittel.	1
Abbildung 2	Ausbreitung von Antibiotika, Mikroorganismen, Resistenzgenen und Resistenzen aus der Intensiv-Tierhaltung und deren Minimierung in Biogasanlagen.	2
Abbildung 3	Prozess der Biogasproduktion in und die häufigsten Gattungen die and den Prozessphasen beteiligt sind.....	14
Abbildung 4	Taxonomische Verteilung der mikrobiologischen Gemeinschaft in einer Biogasanlage.	15
Abbildung 5	Reduktion von Schadstoffen durch die biotechnologische Behandlung langwirtschaftlicher Abwässer.	17
Abbildung 6	Chemische Charakterisierung der Substrat- bzw. Gärrestproben im <i>screening</i> 2012 und Jahresgang 2013.....	41
Abbildung 7	Kupfer, Zink im Feststoff der Substrat- bzw. Gärrestproben sowie einer Stichprobe Maissilage (BGA15) im <i>screening</i> 2012 und Jahresgang 2013.....	43
Abbildung 8	Übersicht des methodischen Ablaufs und der verwendeten Testverfahren zur mikrobiologischen Charakterisierung landwirtschaftlicher Abwasserproben. .	45
Abbildung 9	Schematischer Ablauf der Probenahme im <i>screening</i> 2012.....	47
Abbildung 10	Schematischer Ablauf der Probenahme im Jahresgang 2013.....	47
Abbildung 11	Auszählung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) von Eingangs- und Ausgangsproben 15 deutscher Biogasanlagen in einem landesweiten <i>screening</i> 2012.....	49
Abbildung 12	Auszählung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) von Eingangs- und Ausgangsproben von BGA8 über den Jahresgang 2013 sowie einer Einzelprobe NaWaRo (Maissilage) aus BGA 15.	50
Abbildung 13	Spektrum kultivierbarer, identifizierter Bakterien in Eingangs- und Ausgangsproben von Biogasanlagen BGA1-BGA15 aus dem <i>screening</i> 2012.	52
Abbildung 14	Bakterielle Diversität der Isolat-Funde, aus Proben des <i>screenings</i> 2012, auf verwendeten Komplex-und Selektivmedien.....	55
Abbildung 15	Bakterielle Diversität der Isolat-Funde, aus Proben des <i>screenings</i> 2012, auf verwendeten Komplex-und Selektivmedien.....	57
Abbildung 16	Übersicht des methodischen Ablaufs und der verwendeten Testverfahren zur mikrobiologischen Charakterisierung landwirtschaftlicher Abwasserproben. .	59
Abbildung 17	Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung vorherrschender bakterieller Familien in Eingangs- (E) und Ausgangsproben (A) unter Angabe des Anteils resistenter, intermediärer- und empfindlicher Isolate in Bezug zu vorliegenden Grenzwerten.	62

Abbildung 18	Übersicht des methodischen Ablaufs und der verwendeten Testverfahren zur mikrobiologischen Charakterisierung landwirtschaftlicher Abwasserproben..	72
Abbildung 19	Schematische Darstellung des Versuchablaufs einer Durchflussfermenter-Studie im Labormaßstab.....	73
Abbildung 20	Quantitative Erfassung von Antibiotikaresistenzgenen (<i>tetA</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>sul2</i>) und Kolonie-bildenden Einheiten in einer Fermenterstudie über einen Zeitraum von 60 Tagen mit Substrat aus BGA15.	76
Abbildung 21	Quantitative Erfassung von Antibiotikaresistenzgenen (<i>tetA</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>sul2</i>) und Kolonie-bildenden Einheiten in einer Fermenterstudie über einen Zeitraum von 60 Tagen mit Substrat aus BGA14.	77
Abbildung 22	Quantitative Erfassung von Antibiotikaresistenzgenen (<i>tetA</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>sul2</i>) in Gärsubstrat (E) ohne NaWaRo und Gärrest (A) von 15 deutschen Biogasanlagen im <i>screening</i> 2012.....	79
Abbildung 23	Quantitative Erfassung von Antibiotikaresistenzgenen (<i>tetA</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>sul2</i>) in Gärsubstrat (E) ohne NaWaRo und Gärrest (A) von BGA1, BGA8 und BGA15 beprobt über den Jahresgang 2013 mit 5 Messpunkten.	81
Abbildung A1	Gasanalytik der Biogasanalgen 1-15 im <i>screening</i> 2012, durchgeführt von Fritzmeier Umwelttechnik GmbH.....	145
Abbildung A2	Gasanalytik der Biogasanalgen 1-15 im <i>screening</i> 2012, durchgeführt von Fritzmeier Umwelttechnik GmbH.....	146

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Vergleich der Abgabemengen antimikrobieller Substanzen [t] für Lebensmittel liefernde Tiere in 25 europäischen Mitgliedsstaaten	4
Tabelle 2	Abgegebene Menge antimikrobiell wirksamer Grundsubstanz je Wirkstoffklasse [t] an in Deutschland ansässige Tierärzte mit einer Hausapotheke in 2011 und 2012.....	4
Tabelle 3	Kupfer und Zink als Futtermittelzusatzstoffe	5
Tabelle 4	Einsatz von Kupfer und Zink als Tierarzneimittel.....	5
Tabelle 5	Antibiotika in Gewässern, Boden und landwirtschaftlichen Abwässern.....	8
Tabelle 6	Schwermetallkonzentrationen in Wasser, Sediment, Boden, Klärschlamm und Gülle..	9
Tabelle 7	Probenkennzeichnung	19
Tabelle 8	Oligonukleotide.....	21
Tabelle 9	Versuchsstämme	292
Tabelle 10	Ausplattierte Verdünnungsstufen zur Ermittlung von Gesamt-KBE und Differenzierung von Organismen	29
Tabelle 11	Konzentration der in PCR-Reaktionen eingesetzten Reagenzien	342
Tabelle 12	PCR-Phasen.....	36
Tabelle 13	Konzentrationen (μM) und Mengen (μl) der in der qRT-PCR eingesetzten Reagenz.....	394
Tabelle 14	qRT-PCR-Phasen unter Angabe von Temperatur ($^{\circ}\text{C}$), Dauer (Min./Sek.) und der Wiederholungszahl der Zyklen	34
Tabelle 15	ICP-MS_Parameter	36
Tabelle 16	Parameter der Methoden zur Ermittlung der DOC im wässrigen Eluat.....	37
Tabelle 17	Testkits zur Bestimmung der Abwasserparameter.....	37
Tabelle 18	Chemisch-physikalische Daten der Substrat- bzw Gärrestproben im <i>screening</i> 2012 und Jahresgangs 2013.....	39
Tabelle 19	Metallgehalte im Feststoff und wässrigen Eluat der Substrat- bzw. Gärrestproben im Screening 2012 und einer NaWaRo-Probe (Maissilage, BGA15).....	44
Tabelle 20	Spektrum kultivierbarer, identifizierter Bakterien in Eingangs- und Ausgangsproben von Biogasanlagen BGA1-BGA15 aus dem <i>screening</i> 2012..	53
Tabelle 21	Prävalenz der Gattungen auf Komplex- und Selektivmedien.	58
Tabelle 22	Qualitativer Nachweis von Resistenzgenen in Screeningproben.....	64

Tabelle 23 Qualitativer Nachweis von Resistenzgenen in Substrat und Gärrestproben des Jahresganges 2013.....	65
Tabelle 24 Qualitativer Nachweis von 12 Tetrazyklin- und 3 Sulfonamidresistenzgenen in 43 Isolaten der Familie der Enterobacteriaceae aus Eingangsproben der Biogasanlagen BGA8, BGA9, BGA10 und BGA11.....	67
Tabelle 25 Qualitativer Nachweis von 12 Tetrazyklin- und 3 Sulfonamidresistenzgenen in 4 Isolaten der Familie der Enterococcaceae aus Eingangsproben der Biogasanlage....	68
Tabelle 26 Qualitativer Nachweis von 12 Tetrazyklin- und 3 Sulfonamidresistenzgenen in 19 Isolaten der Familie der Enterobacteriaceae und Enterococcaceae aus Ausgangsproben der Biogasanlagen BGA8, BGA9 und BGA10.	68
Tabelle 27 Qualitativer Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in 28 Isolaten der Familie der Enterobacteriaceae.....	70
Tabelle 28 Qualitativer Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in 34 Isolaten der Familie der Enterobacteriaceae und Enterococcaceae aus Fermenter 1-3 der Fermenterstudie 2013 nach Zugabe von Antibiotika.	71
Tabelle 29 Qualitative Bestimmung der Resistenzgene in Proben der Fermenterstudien mit Substrat aus BGA14 und BGA15	74
Tabelle A1 Charakterisierung der Biogasanlagen, insbesondere der Substratzusammensetzung und Anlagenkapazität nach Angaben der Anlagenbetreiber.	137
Tabelle A2 Chemische Charakterisierung von Eingangs- und Ausgangsproben der 15 Biogasanlagen im Screening 2012 und Jahresgang 201.	138
Tabelle A3 Weiterführende Daten zu Abbildung 7.	139
Tabelle A4 Biogasproduktion und -zusammensetzung in Fermenterstudien mit Substrat aus BGA15 und BGA14.....	140
Tabelle A5 Anzahl Isolate in Eingangs- und Ausgangsproben der 15 Biogasanlagen im <i>screening</i> 2012 bezogen auf Ursprungsmedien.....	142
Tabelle A6 Anteilige Häufigkeit der der Familien auf den verwendeten Medien.	144
Tabelle A7 Klinische Breakpoints (CLSI 2014).....	146
Tabelle A8 Biogasproduktion und -zusammensetzung in Fermenterstudien mit Substrat aus BGA15 und BGA14.....	147

XI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μ	mikro- (10^{-6})
A	hier: Ausgang
AMX	Amoxicillin
ARG	Antibiotika-Resistenzgen(e)
ARGD	Antibiotika-Resistenzgen-Determinante
BGA	Biogasanlage
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CASO	Caseinpepton-Sojamehl-Agar
CEQ	Cefquinom
CET	Ceftiofur
ColSB	Columbia-Agar mit Schafblut
CQC	Cefquinom/Clavulansäure
CUC	Ceftiofur/Clavulansäure
d	Tag
d. h.	das heißt
DHPS	Dihydropterat Synthetase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
E	hier: Eingang
ECOFF	epidemiologische Cut-Off-Grenzwerte
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMB	Eosin-Methylenblau-Agar
ENR	Enrofloxacin
ESBL	<i>Gram-negative bacteria producing Extended Spectrum Beta-Lactamase</i>
<i>et al.</i>	und andere
etc.	<i>et cetera</i>
EUCAST	<i>European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FLL	Florfenicol
FM	Frischmasse
g	Gramm
mg	(-fache) Erdbeschleunigung
GC	<i>growth control</i> (Wachstumskontrolle)
GEA	Galle-Aeskulin-Azid-Agar
h	Stunde(n)
IAM	Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen
IHU	Institut für Hygiene und Umweltmedizin, RWTH-Aachen
K	Kopien
k	Kilo- (10^3)
k. A.	keine Angaben
kb	Kilobasenpaar(e)
KBE	koloniebildende Einheit(en)
KECS	<i>Klebsiella spp., Enterobacter spp., Citrobacter spp., Serratia spp.</i>
kW	Kilowatt
l	Liter
L _N	Normliter
LDZ	Labordiagnostisches Zentrum; Uniklinikum Aachen
m	Meter
M	Molar (mol/l)
m	mili- (10^{-3})
MALDI-TOF MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie
MC	MacConkey-Agar
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>

MHK	Minimale-Hemmstoff-Konzentration
MID	Mikrobouillondilutionsverfahren
min	Minute(n)
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Mannitol-Salz-Agar
n	nano- (10^{-9})
N	Organismen(anzahl)
NaWaRo	nachwachsende Rohstoffe
Neo	Neomycin-Blutagar
OXA	Oxacillin
p	piko- (10^{-12})
p. a.	<i>per analysis</i>
PABA	p-Aminobenzoessäure
past.	pasteurisiert
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
pH	negative dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
R-Mast	Rindermast
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPP	<i>ribosomal protection protein</i> (ribosomale Schutzproteine)
s	Sekunde(n)
S	Svedberg-Einheit
S&B	Slanetz & Bartley-Agar
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Mast	Schweinemast
SMO	Sulfamethoxazol
spez.	spezifisch
sonst.	sonstige
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
SS	Salmonella-Shigella-Agar
t	Tonne(n)
TS	Trockensubstanz
T/S	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TET	Tetrazyklin
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockensubstanz
U	<i>unit</i> (Einheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
u. a.	und andere
unpast.	unpasteurisiert
unverd.	unverdünnt
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
X	-fach
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

Prof. Dr. Wolfgang Dott danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit im Institut für Hygiene und Umweltmedizin selbstständig durchführen zu können sowie sein fortwährendes Interesse an meinem Promotionsthema. Besonders bedanken will ich mich auch für das Höchstmaß kreativer und wissenschaftlicher Freiheit, die er mir von Beginn der Themenentwicklung und über die gesamte Laufzeit des Forschungsprojektes gewährte und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Prof. Dr. Jan Schirawski danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens für meine und die Arbeiten meiner Masterstudenten.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegen und Beteiligten des Verbundprojekts RiskAGuA für die gute Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Rita Kramer, ohne deren engagierte und mühevollen Mitarbeit die Bearbeitung dieses Projekts nicht zustande gekommen wäre.

Für die finanzielle Unterstützung danken wir dem BMBF.

Meinen Master- und Diplomstudenten Maxim Petrischtschew, Mathias Gast, Frauke Platzbecker, Jennifer Kowalski, Lisa Dreisbach und Bobo Yaye Conde möchte ich danken für ihr ausdauerndes, selbstständiges und anregendes Arbeiten und eine bisweilen sehr amüsante Zusammenarbeit.

Besonderen Dank auch an meine Kolleginnen Kathrin Erlinghagen, Marie Wanders, Andrea Knauf und Veronika Kossak, meine Arbeitsgruppe sowie dem gesamten Institut für wertvolle Anregungen, Hilfsbereitschaft und lange Abende im Labor, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Mitdoktorandin Sabrina Michael, die mich mit ihrer „väterlichen“ Freundschaft unterstützt, mir auch in den schwierigsten Zeiten beigestanden hat und von der Assistentensitzung bis zum Roadtrip erstklassige Unterhaltung geboten hat.

Auch meinem Kollegen Nicolaj Heuer danke ich für die gute Zeit und aufopfernde statistische Unterstützung aber vor allem für den Schubs in eine gewaltfreie Ernährung.

Mein außerordentlicher Dank gilt Michèle Busse, die in kürzester Zeit von Masterandin zu engster Freundin wurde und mein Leben tagtäglich bereichert. (Die Promotion ist der Bonus.)

Meinen Freunden Anna Clemens, Lena Riemann, Fly, Lilli und Chico, Fine van Treek und Kimba, Lina Mußler, Nuriye Mustafi, Rosi Kürten und Thorge Voel danke ich für ihre Ausdauer und Geduld mit mir während dieser und anderer unendlicher Geschichten und dem puren Vergnügen sie in meinem Leben zu haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mutter und meine Großmutter, die mir das Studium der Biologie ermöglichten und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu verlässlich und unterstützend, nicht zuletzt als Hundesitter, zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Momo, Fenris und Bambi, die mich nicht nur zu dieser Arbeit inspiriert, jede frustrierende Phase erheitert haben und mehr oder weniger begeisterte Rezipienten vieler wissenschaftlicher Monologe waren, sondern auch den Rest meines Lebens in ein marauderndes Abenteuer verwandelten.

Eidesstattliche Erklärung

Tina Katrin Wings

erklärt hiermit, dass diese Dissertation und die darin dargelegten Inhalte die eigenen sind und selbstständig, als Ergebnis der eigenen originären Forschung, generiert wurden.

Hiermit erkläre ich an Eides statt

1. Diese Arbeit wurde vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt;
2. Sofern irgendein Bestandteil dieser Dissertation zuvor für einen akademischen Abschluss oder eine andere Qualifikation an dieser oder einer anderen Institution verwendet wurde, wurde dies klar angezeigt;
3. Wenn immer andere eigene- oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt;
4. Wenn aus anderen eigenen- oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurde stets die Quelle hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate;
5. Alle wesentlichen Quellen von Unterstützung wurden benannt;
6. Wenn immer ein Teil dieser Dissertation auf der Zusammenarbeit mit anderen basiert, wurde von mir klar gekennzeichnet, was von anderen und was von mir selbst erarbeitet wurde;
7. Teile dieser Arbeit wurden zuvor veröffentlicht und zwar in:

Publikationen in Fachzeitschriften

1. Tina K. Wings, Astrid Spielmeyer, Stefanie P. Glaeser, Thorsten Schauss, Gerd Hamscher, Peter Kämpfer, and Wolfgang Dott. 2014. "Prevention of Human Health Risks and Environmental Pollution from Agricultural Waste." *Toxicology Letters* 229 (September). Elsevier: S131. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.06.467.
2. Tina K. Wings, Michèle Busse, Sabrina Michael, Wolfgang Dott. 2015. "Measuring a contemporary threat: ascertaining the influence of biotechnological processes on the occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in agricultural effluents." *Toxicology Letters* 238 (September). Elsevier: S133. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.08.418. 2
3. Thorsten Schauss and Tina K. Wings, Brunner JS, Glaeser SP, Dott W, Kämpfer P. 2016. Bacterial diversity and antibiotic resistances of abundant aerobic culturable bacteria in input and output samples of 15 German biogas plants. *J Appl Microbiol* 121:1673–1684.

Vorträge

1. Tina K. Wings und W. Dott. Veterinärpharmaka, Mikroorganismen und Resistenzen im Wasserkreislauf. 45. IWASA, Aachen, Januar 2015.
2. T. Wings. Veterinärpharmaka und Resistenzen im Wasserkreislauf. 15. IFWWFachkolloquium, Haltern am See, Mai 2015.
3. Tina K. Wings, Michèle Busse, Astrid Spielmeyer, Thorsten Schauss, Stefanie P. Glaeser, Peter Kämpfer, Gerd Hamscher, Wolfgang Dott. Assessing and preventing risks posed by waste water from intensive livestock farming to human and environmental health. SETAC Australiasa Congress, Nelson, New Zealand, August 2015.

Tagungsbeiträge

1. Wings TK, Petrischtschew M, Lehnberg K, Dott W. Influence on the persistence of antibiotic residues and antibiotic resistance activity in response to manure treatment. In: VAAM Jahrestagung. Vol Karlsruhe; 2011.
2. Wings TK, Platzbecker F, Dott W. Co-extraction and -quantification of 16 veterinary antibiotics and the evaluation of their bioavailability in dairy manure. In: 6th SETAC World Congress. Vol Berlin; 2012.
3. Wings TK, Kowalski JS, Dreisbach LK, et al. Antibiotikaresistenzen und Resistenzgene in landwirtschaftlichen Abwässern Untersuchung zur Betrachtung des Rückhaltungs- und Hygienisierungspotentials biotechnologischer Barrieren. In: 8. Jahrestagung Der Deutschen Gesellschaft Für Hygiene Und Umweltmedizin GHUP. Vol Köln; 2014.
4. Wings TK, Kowalski JS, Schauss T, Glaeser S, Kämpfer P, Dott W. Mikrobielle Diversität in Biogasanlagen: Bestimmung und Quantifizierung von Mikroorganismen über kultivierungsabhängige Populationsanalysen im Substrat und Gärrest von Biogasanlagen zur Detektion klinisch relevanter Schlüsselorganismen. In: 8. Jahrestagung Der Deutschen Gesellschaft Für Hygiene Und Umweltmedizin GHUP. Vol Köln; 2014.
5. Wings TK, Conde BY, Busse M, Dott W. Counteracting antibiotic resistance in agriculture: biotechnological barriers might do the trick. In: FEMS 7th Congress of European Microbiologists. Vol Maastricht; 2015.

Unterschrift