Schriftenreihe IWAR

266

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT

IWAR

Norman Hembach

Vergleich ausgewählter Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung auf Grundlage ihrer Reduktion von mikrobiellen Kontaminationen

Herausgeber:
Verein zur Förderung des Instituts IWAR der TU Darmstadt e. V.

Vergleich ausgewählter Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung auf Grundlage ihrer Reduktion von mikrobiellen Kontaminationen

Vom Fachbereich Bau- und Umweltingenieurwissenschaften
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.) genehmigte Dissertation

von

Norman Hembach, M.Sc.
aus Lindlar

Erstgutachterin: Prof. Dr. Susanne Lackner
Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Schwartz

Darmstadt 2021
D 17

Norman Hembach

Vergleich ausgewählter Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung auf Grundlage ihrer Reduktion von mikrobiellen Kontaminationen.

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUprints: 2021

URN: nbn:de:tuda-tuprints-176235
URI: https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/id/eprint/17623

Hrsg.: Verein zur Förderung des Instituts IWAR der TU Darmstadt e. V.
Darmstadt: Eigenverlag, 2021
(Schriftenreihe IWAR 266)

ISSN 0721-5282
ISBN 978-3-940897-67-1

Referentin: Prof. Dr. Susanne Lackner
Korreferent: Prof. Dr. Thomas Schwartz

Tag der schriftlichen Einreichung: 24.10.2020
Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2021

Veröffentlichung unter CC BY-NC-ND 4.0 International
https://creativecommons.org/licenses/

Alle Rechte vorbehalten. Wiedergabe nur mit Genehmigung des Vereins zur Förderung des Instituts IWAR der Technischen Universität Darmstadt e. V., c/o Institut IWAR, Franziska-Braun-Str. 7, 64287 Darmstadt.

Herstellung: Lasertype GmbH
Holzhofallee 19
64295 Darmstadt
IWAR

Vertrieb: Institut
TU Darmstadt
Franziska-Braun-Straße 7
64287 Darmstadt
Telefon: 06151 / 16 20301
Telefax: 06151 / 16 20305

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Susanne Lackner des Institut IWAR der Technischen Universität Darmstadt für die Möglichkeit der Promotion und das Übernehmen der Aufgaben als Erstreferentin.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Thomas Schwartz für seine zahlreichen Denkanstöße, intensive Begleitung und vor allem Geduld bei der Betreuung meiner Arbeit.

Dank auch an meine Familie und Freunde für die anhaltende Unterstützung und Hinweise auf weitere Blickwinkel.

Weiterhin danke ich allen Kollegen am Institut für Funktionelle Grenzflächen am Karlsruher Institut für Technologie für die angenehme Atmosphäre und fachlichen Anregungen im Laboralltag.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, sowie dem Institut für funktionelle Grenzflächen am KIT Campus Nord.

Zusammenfassung

Antibiotikaresistente und fakultativ pathogene Bakterien stellen eine wachsende Gefahr für die öffentliche Gesundheit und Umwelt dar. Als letzte gemeinsame Barriere der unterschiedlichen Emissionsquellen, wie Abwässer aus Krankenhäusern, Pflegeheimen, Schlachtbetrieben, privaten Haushalten etc., ist die Kläranlage ein geeigneter Ort, um die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzgenen und fakultativ pathogenen Bakterien in die Umwelt zentral zu minimieren. Da, trotz bestehender gesundheitlicher Risiken durch die bisherige Gesetzgebung keine allgemeinen und übergreifenden Regelungen für die Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen durch die Kläranlagen existieren, sind die einzelnen Prozesse sowie die Betriebsweise existierender Kläranlagen nicht auf deren Rückhalt ausgelegt. Eine Grenzwerterhebung, wie sie für Spurenstoffe als sinnvoll erachtet wird, ist allerdings für Bakterien aufgrund ihres Vermehrungspotentials nicht zielführend. Die amerikanische National Blue Ribbon Commission schlägt aus diesem Grunde eine minimal zu erreichende Reduktion von 6 Log-Stufen durch den gesamten Klärprozess vor.

Vor diesem Hintergrund wird in dieser Arbeit, im Ablauf von sieben Kläranlagen, die Abundanz an 6 unterschiedlichen, an die Gruppe angelehnten, fakultativ pathogenen Bakterien (Enterokokken, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* und *Escherichia coli*) sowie einer Auswahl von 14 Antibiotikaresistenzgenen mit unterschiedlicher gesundheitlicher Relevanz ermittelt. Es werden Resistenzen gegen veterinär genutzte Antibiotika, Resistenzen gegen Breitbandantibiotika, sowie aus hygienischer Sicht kritische Resistenzen gegen Reserveantibiotika unterschiedlicher Wirkungsklassen untersucht. Hierfür wurden neben der Methode der qPCR auch kulturbasierte Experimente sowie Metagenom-Analysen und Isolate-Charakterisierungen durchgeführt.

Die untersuchten 7 Kläranlagen mit konventioneller Klärung bestehend aus mechanischer sowie biologischer Behandlung, wie sie in Deutschland verbreitet ist, sind in der Lage, fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene um ca. 1,8 ± 0,6 Log-Stufen zu reduzieren.

Weiterhin wurde untersucht inwiefern jeweils eine:

- Pulveraktivkohlebehandlung mit nachgeschalteter Sandfiltration
- Ozonbehandlung (1-2 g Ozon/g DOC)
- UV-Bestrahlung (400 J/m² UV)
- sequentiellen Ozonbehandlung mit nachgeschalteter UV-Bestrahlung (1-2 g Ozon/g DOC, 400-600 J/m²)
- Ultrafiltration (20 und 25nm)

am Standort einer Kläranlage dazu beitragen können, die erforderliche Reduktion von 6 Log-Stufen zu erreichen.

Als besonders effizient erwies sich die Ultrafiltration, welche eine Reduktion der mikrobiellen Kontaminanten von bis zu 7 Log-Stufen erreichte. Der weitere Verbleib oder Möglichkeiten einer zusätzlichen Behandlung des, bei der Ultrafiltration entstehenden, stark belasteten und

biologisch weiterhin aktiven Retentats, ist allerdings noch nicht geklärt. Die Verfahren der Ozonbehandlung erzielten, abhängig von den eingesetzten Ozonkonzentrationen und hydraulischen Verweilzeiten im Ozonkontaktreaktor, Reduktionen zwischen 1,5 und 3,5 Log-Stufen. Allerdings konnten einzelne fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene identifiziert werden, welche sich als besonders robust gegenüber der Ozonung erweisen (z.B. *P. aeruginosa*). Durch eine sequentielle Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung konnten synergistische Effekte beobachtet werden, welche die Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen steigern und auch eine verstärkte Reduktion dieser robusten Spezies ermöglichen.

Eine alleinstehende UV-Bestrahlung erzielte lediglich geringfügige Reduktionen der mikrobiellen Kontaminationen. Die ebenfalls auf ihre mikrobiologische Reduktionsleistung untersuchte, aber für die Spurenstoffelimination konzipierte, adsorptive Reinigung mittels pulverisierter Aktivkohle erzielte ebenfalls eine geringe Reduktion der untersuchten mikrobiellen Kontaminationen.

Weiterhin wird deutlich, dass eine Kombination mehrerer Verfahren synergetische Effekte für die Reduktion mikrobieller Kontaminationen mit sich bringen kann.

Eine Hygienisierung des Wassers, also eine vollständige Elimination aller mikrobieller Kontaminationen, ist mit den untersuchten Verfahren nur bedingt möglich. Mehrere Verfahren und Verfahrenskombinationen waren jedoch in der Lage, die Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Laufe des gesamten Klärprozesses auf die erforderlichen 6 Log-Stufen anzuheben.

Abstract

Antibiotic resistance genes and facultative pathogenic bacteria pose a growing threat to public health and the environment. As the last common barrier of the different emission sources, such as wastewater from hospitals, slaughterhouses, private households etc., the wastewater treatment plant is a suitable place to centrally minimize the spread of antibiotic resistance genes and facultative pathogenic bacteria into the environment. Despite existing health risks, there is no general and comprehensive regulation for the reduction of facultative pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes by the wastewater treatment plants. Therefore, the individual processes as well as the mode of operation of existing sewage treatment plants are not designed for their retention. However, a threshold value, as it is considered useful for trace compounds, is not appropriate for bacteria due to their proliferation potential. For this reason, the American National Blue Ribbon Commission proposes a minimum reduction of 6 log levels to be achieved throughout the entire treatment process.

Against this background, in this work, the abundance of 6 different facultative pathogenic bacteria (Enterococci, *Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, A. baumannii* and *E. coli*), which are similar to the ESKAPE group, as well as a selection of 14 antibiotic resistance genes with different health care relevance are determined in the effluent of seven wastewater treatment plants. Resistances to antibiotics used in veterinary medicine, resistances to broad-spectrum antibiotics, as well as resistances to reserve antibiotics, which are critical from a hygienic point of view, are investigated. For this purpose, in addition to the qPCR method, culture-based experiments as well as metagenome analyses and isolate characterisations were carried out.

Seven analysed wastewater treatment plants with conventional treatment consisting of mechanical and biological treatment, as it is common in Germany, are able to reduce facultative pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes by about 1.8 ± 0.6 log levels.

Furthermore, it was analysed to what extent each of the following advanced treatment processes at the site of a wastewater treatment plant can contribute to achieve the required 6 log level reduction:

- Activated carbon treatment with downstream sand filtration
- Ozone treatment (1 2 g ozone/g DOC)
- UV irradiation (400 J/m² UV)
- sequential ozone treatment with subsequent UV irradiation (1 2 g ozone/g DOC, 400 600 J/m²)
- Ultrafiltration (20 and 25nm)

Ultrafiltration proved to be particularly efficient, achieving a reduction in microbial contaminants of up to 7 log levels. However, the further fate or necessary of additional treatment of the contaminated and biologically still active retentate resulting from the ultrafiltration is not yet clear. Depending on the ozone concentrations used and the hydraulic residence time in the ozone contact reactor, the ozone treatment process achieved reductions of between 1.5 and 3.5 log stages. However, individual facultative pathogenic bacteria and

antibiotic resistance genes could be identified, which prove to be particularly robust against ozonation (e.g. *P. aeruginosa*). By sequential ozone treatment and UV-irradiation synergistic effects could be observed, which increase the reduction of facultative pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes and also allow an increased reduction of these robust species.

A stand-alone UV-irradiation achieved only slight reductions of microbial contamination. An adsorptive cleaning process using pulverized activated carbon, which was designed for the elimination of trace compounds, was also tested for its microbiological reduction capacity and achieved a small reduction of the microbial contaminations.

It becomes clear that when considering the overall process of wastewater treatment, which is intended to continuously reduce nutrients, trace substances and hygienically relevant bacteria, a combination of several processes is advantageous and can bring synergetic effects.

Hygienisation of the water, i.e. complete elimination of all microbial contamination, is not possible with the processes investigated. However, several processes and process combinations were able to increase the reduction of facultative pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes to the required 6 log levels during the entire clarification process.

Inhalt

1 EINLEITUNG 1

1.1 WISSENSCHAFTLICHE HINTERGRÜNDE DER ARBEIT 1

1.2 AKTUELLE SITUATION 2

1.2.1 Verbrauch von Antibiotika in Deutschland 2

1.2.2 Verbreitungswege von antibiotikaresistenten fakultativ pathogenen Bakterien 2

1.2.3 Infektionslage mit resistenten Bakterien 5

1.2.4 Problematik der Grenzwerterhebung 6

1.3 ÜBERSICHT UNTERSUCHTER VERFAHREN ZUR ENTFERNUNG FAKULTATIV PATHOGENER BAKTERIEN UND ANTIBIOTIKARESISTENZGENE AUS ABWASSER 7

1.4 INTENTION DER UNTERSUCHUNGEN 8

1.5 WIRKUNGSWEISE DER UNTERSUCHTEN TECHNIKEN DER WEITERGEHENDEN ABWASSERBEHANDLUNG ZUR REDUZIERUNG VON FAKULTATIV PATHOGENEN BAKTERIEN UND ANTIBIOTIKARESISTENZGENEN 9

1.5.1 Pulverisierte Aktivkohle mit nachgeschalteter Sandfiltration 10

1.5.2 Oxidative Abwasserbehandlung durch Ozon 10

1.5.3 Bestrahlung mit UV 12

1.5.4 Sequentielle Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung 13

1.5.5 Nachgeschaltete Ultrafiltration 14

1.5.6 Weitere Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung zur gezielten Bakterienreduktion 16

1.6 NACHWEIS VON BAKTERIEN UND ANTIBIOTIKARESISTENZGENEN 17

1.6.1 Kulturabhängiger Nachweis mittels Agarosesystemen 17

1.6.2 Nachweis mittels Polymerase Kettenreaktion 18

1.6.3 Sequenzierung 19

1.7 FORSCHUNGSFRAGEN 20

2 MATERIAL UND METHODEN 21

2.1 EXPERIMENTELLE ÜBERSICHT 21

2.1.1 Überblick aller beprobten Kläranalgen zur Feststellung der allgemeinen mikrobiellen Belastungssituation 21

2.1.2 Übersicht des Versuchsfeldes für weitergehende Abwasserbehandlungsverfahren 22

2.1.3 Ablauf der Probenahmen 24

2.1.4 Umfang der Probenahmen am Untersuchungsfeld für Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung 25

2.1.5 PMA-Behandlung und DNA-Extraktion 26

2.2 NACHWEIS FAKULTATIV PATHOGENER BAKTERIEN UND ANTIBIOTIKARESISTENZGENE 27

2.2.1 Untersuchte Parameter 27

2.2.2 Molekularbiologische Quantifizierung 30

2.3 KULTIVIERUNG AUF SELEKTIVNÄHRBÖDEN 34

2.4 METAGENOMANALYSE 35

2.5 AUSWERTUNG UND STATISTIK 36

2.5.1 Signifikanz und Varianz 36

2.5.2 Verwendete Darstellung in Diagrammen 36

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 37

3.1 VALIDIERUNG DER MOLEKULARBIOLOGISCHEN DETEKTIONSSYSTEME 37

3.2 Emission von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen durch verschiedene kommunale Kläranlagen 41
3.3 Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung 48
3.3.1 Aktivkohle mit nachgeschalteter Sandfiltration 48
3.3.2 UV-Bestrahlung mit 400 J/m² 51
3.3.3 Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC 53
3.3.4 Ozonbehandlung mit sequentieller UV-Bestrahlung 57
3.3.5 Ultrafiltration 59
3.3.6 Ergänzende Kultivierungsexperimente zur Verifizierung der Reduktion von Verfahren zur weitergehender Abwasserbehandlung 69
3.3.7 Zwischenfazit zur mikrobiellen Reduktion durch Verfahren zur weitergehender Abwasserbehandlung 71
3.4 Optimierung der Betriebsparameter zur Reduktion mikrobieller Kontaminationen bei sequentieller Ozon/UV-Behandlung 72
3.4.1 Erhöhung der Ozonkonzentration und UV-Dosis einer sequentiellen Behandlung 73
3.4.2 Effekte einer vorgeschalteten adsorptiven Reinigungsstufe auf die Reduktion von mikrobiellen Kontaminanten 76
3.4.3 Einfluss der hydraulischen Verweilzeit auf das Reduktionsvermögen der sequentiellen Anwendung von Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung 80
3.4.4 Verifizierung der Effekte der veränderten Betriebsparameter durch Kultivierungsexperimente 83
3.4.5 Zwischenfazit zu veränderten Betriebsparametern der sequentiellen Ozon/UV-Behandlung 84
3.5 Optimierung der Betriebsparameter beider Ultrafiltrationseinheiten 85
3.5.1 Einfluss der Fluxrate auf die Reduktion von Ultrafiltrationen 85
3.5.2 Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen durch eine Ultrafiltration mit vorgeschalteter adsorptiver Reinigungsstufe 87
3.6 Empfehlung zur erweiterten Abwasseraufbereitung an kommunalen Kläranlagen 88

4 AUSBLICK 93

5 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN ZUR THEMATIK 95
5.1 Publikationen in Fachzeitschriften 95
5.2 Weitere Veröffentlichungen 95
5.3 Posterbeiträge 95

6 LITERATURVERZEICHNIS 97

7 ERKLÄRUNG ZUR VORLIEGENDEN ARBEIT GEMÄß §22/7 APB 109

ANHANG 111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausbaugröße, gereinigte tägliche Abwassermenge, genutzte technische Stufen und Anzahl der Probenahmen aller sieben beprobten Kläranlagen. Die durchschnittliche behandelte Abwassermenge basiert auf der jährlichen behandelten Wassermenge. ... 21

Tabelle 2: Mittelwert sowie Standardabweichung stündlich erhobener Parameter im Ablauf des Nachklärbeckens (Zulauf der weitergehenden Abwasserbehandlungsverfahren) von Kläranlage 7 über den Zeitraum von einem Jahr. ... 22

Tabelle 3: Anzahl an Probenahmen während der unterschiedlichen Probenkampagnen. ... 26

Tabelle 4: Klinische Relevanz der untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien und deren prozentualer Anteil an den klinischen Infektionen im Jahr 2016 ... 28

Tabelle 5: Auswahl der untersuchten Antibiotikaresistenzgene und deren Antibiotikaklasse der vermittelten Resistenz. ... 29

Tabelle 6: Temperaturprofil der qPCR mit anschließendem Temperaturprofil zur Schmelzkurvenanalyse. ... 31

Tabelle 7: Verwendete Inkubationsparameter und Morphologie der gebildeten spezifischen Kolonien der mikrobiologischen Untersuchungen. ... 35

Tabelle 8: Liste aller verwendeten Primer mit Sequenzen, Geradengleichungen der Kalibrierung, Amplikongrößen, Effizienzen der Amplifikation, Korrelationkoeffizient der Kalibirergeraden (R^2), Detektionslimits (LOD), Angaben zu Kontrollstämmen und Referenzliteratur. ... 38

Tabelle 9: Mittelwert von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL aus drei einzelnen Probenahmen im Ablauf des Nachklärbeckens der sieben untersuchten Kläranlagen. ... 42

Tabelle 10: Nachweis der fakultativ pathogenen Bakterien und Kategorisierung der nachgewiesenen Antibiotikaresistenzgene anhand deren Abundanz im Ablauf aller sieben untersuchten Kläranlagen unterschiedlicher Ausbaugröße. ... 43

Tabelle 11: Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Log-Stufen der Kläranlagen 1-7 sortiert nach der Ausbaugröße der Kläranlagen in EW. ... 46

Tabelle 12: Mittelwert der untersuchten Auswahl an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Zulauf und Retentat beider Ultrafiltrationseinheiten mit 20 nm und 25 nm Porendurchmesser. ... 64

Tabelle 13: Prozentuale Häufigkeit der funktionellen Gengruppen im Retentat beider Ultrafiltrationsanlagen. ... 67

Tabelle 14: Bewertung der Änderung einzelner Betriebsparameter auf die Reduktion fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Vergleich zur Behandlung mit 1 g Ozon/g DOC bei einer hydraulischen Verweilzeit von 8 Minuten ... 84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei Mechanismen des horizontalen Gentransfers. A: Transformation, B: Konjugation, C: Transduktion.....4

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung zur Untersuchung der weitergehenden Abwasserbehandlung. Rote Punkte: Probenahmestellen. 8

Abbildung 3: Überblick der verwendeten analytischen Verfahren. 9

Abbildung 4: Blockungsmethoden einer Ultrafiltrationsmembran a: Porenverblockung; b: Adsorption; c: Deckschicht; d: Biofilm. 15

Abbildung 5: Überblick über die untersuchten Parametereinstellungen der unterschiedlichen Abwasserbehandlungsverfahren. 24

Abbildung 6: Überblick der Versuchsabläufe und Durchführungsort der entsprechenden Methoden. 25

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Wirkprinzips von PMA. PMA gelangt durch geschädigte Zellmembran in eine Zelle, interkaliert in der DNA und erzeugt nach einem UV-induzierten Quervernetzung kovalente Bindungen, welche die DNA für nachfolgende PCR-Reaktionen blockiert.....27

Abbildung 8: Prinzip der qPCR Quantifizierung......32

Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Eliminationsprozesses in definiertem Wasservolumen zur Verdeutlichung unterschiedlicher Normierungsmethoden. 40

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Anordnung der unterschiedlichen Reinigungsstufen für die weitergehende Behandlung durch Aktivkohle mit nachgeschalteter Sandfiltrationn. 49

Abbildung 11: Zelläquivalente/100 mL im Zulauf der Aktivkohleadsorption (blauer Balken) und Ablauf der Sandfiltration (orange Säulen). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Abundanzen im Ablauf. 49

Abbildung 12: Schematische Darstellung der einzelnen Prozesse und Probenahmestellen zur Technik der UV Bestrahlung 51

Abbildung 13: Zelläquivalente/100 mL vor (blaue Balken) und nach UV-Bestrahlung mit 400 J/m² für 1 Sekunde (orange Säulen). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Abundanzen im Ablauf. 52

Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Eliminationsleistung einer Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC und einer Verweilzeit von 8 Min. nach dem Nachklärbecken (Sedimentation).....54

Abbildung 15: Zelläquivalente/100 mL im Zu- (blaue Balken) und Ablauf (orange Säulen) der Ozonanlage mit 1 g Ozon/g DOC und 8 Min. Kontaktzeit. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung im Ablauf.....55

Abbildung 16: Schematische Darstellung des Verfahrens der sequentiellen Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung nach dem Nachklärbecken.....57

Abbildung 17: Zelläquivalente/100 mL vor (blauer Balken) und nach (orange Säulen) der Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC und sequentieller UV-Bestrahlung mit 400 J/m². Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Abundanzen im Ablauf. ..58

Abbildung 18: Schematische Darstellung der Anordnung der Ultrafiltrationseinheiten und Probenamestellen nach dem Nachklärbecken.. 60

Abbildung 19: Zelläquivalente im Zu- (blaue Balken) und Ablauf (orange Säulen) der Ultrafiltration 1. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Abundanzen im Ablauf 61

Abbildung 20: Zelläquivalente im Zulauf (blau) und Ablauf (orange) der Ultrafiltration 2. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Abundanzen im Ablauf 62

Abbildung 21: Relative Abundanzen an Antibiotikaresistenzgenen im Retentat von UF1 bzw. UF2. 66

Abbildung 22: Zusammensetzung der Gesamtpopulation auf Speziesebene mit einem Anteil >1 % im Retentat beider Ultrafiltrationseinheiten. 68

Abbildung 23: Kolonie bildende Einheiten in 100 mL von *E. coli*, Enterokokken, *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. nach den einzelnen Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung 70

Abbildung 24: Kolonie bildende Einheiten in 100 mL von ESBL-resistenten Bakterien, MRSA und Vancomycin resistenten Enterokokken nach den einzelnen weitergehenden Abwasserbehandlungsverfahren.. 70

Abbildung 25: Abstufung der untersuchten Verfahren zur weitergehender Abwasserbehandlung basierend auf ihrer Fähigkeit zur Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen. 71

Abbildung 26: Optimiertes Kombinationsverfahren zur erweiterten Abwasserbehandlung mit einer Ozonung, einer Aktivkohleadsorption (PAK) und einer abschließenden Ultrafiltration zur Reduzierung von sowohl Nährstoffen, Spurenstoffen als auch fakultativ pathogenen Bakterien. 72

Abbildung 27: Schema der Prozessführung und einzelnen Probenahmestellen für die Erhöhung der Betriebsparameter der sequentiellen Behandlung mit Ozon und UV nach der Nachklärung.. 74

Abbildung 28: Zelläquivalente/100 mL als Summenparameter der Cluster fakultativ pathogene Bakterien (A), häufig vorkommender Resistenzgene (B), intermediär vorkommender Resistenzgene (C) und selten vorkommender Resistenzgene (D) im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens) und nach 1,5 g Ozon/g DOC bzw. 2 g Ozon/g DOC ohne und mit nachgeschalteter UV-Bestrahlung mit 400 J/m² bzw. 600 J/m². 75

Abbildung 29: Schematisch dargestellter Aufbau der Prozessführung und Probenahmestellen der sequentiellen Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung nach konventioneller Klärung und Aktivkohlebehandlung. 77

Abbildung 30: Zelläquivalente/100 mL der Summenparameter der fakultativ pathogenen Bakterien (A), häufig vorkommenden Resistenzgene (B), intermediär vorkommenden Resistenzgene (C) und selten vorkommenden Resistenzgene (D) im Zulauf (Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung) und nach 1,5 g Ozon/g DOC bzw. 2 g Ozon/g DOC ohne und mit nachgeschalteter UV-Bestrahlung mit 400 J/m² bzw. 600 J/m². 78

Abbildung 31: Schematische Darstellung der Prozessführung zur Untersuchung des Effekts einer verlängerten hydraulischen Ozon-Verweilzeit von 30 Minuten bzw. 60 Minuten ohne und mit nachfolgender UV-Bestrahlung 80

Abbildung 32: Zelläquivalente/100 mL der Summenparameter der fakultativ pathogenen Bakterien(A), häufig vorkommenden Resistenzgene (B) intermediär vorkommenden Resistenzgene (C) und selten vorkommenden Resistenzgene (D) im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens) und nach einer Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC, einer Ozonkontaktzeit von 30 Minuten bzw. 60 Minuten sowie optionaler UV-Bestrahlung mit 400 J/m². 81

Abbildung 33: Schematische Darstellung der Prozessführung sowie die verwendeten Fluxraten der beiden Ultrafiltrationseinheiten. Rote Punkte: Probenahmestellen. 86

Abbildung 34: Schematische Darstellung der Prozessführung sowie die verwendeten Fluxrate der beiden Ultrafiltrationseinheiten zur Ermittlung des Einflusses vom Zulauf der Ultrafiltration. 87

Abbildung 35: Vorschlag zweier Verfahren zur erweiterten Abwasserbehandlung, welche eine umfassende Reduktion von fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen unter Nutzung mehrerer synergetischer Effekte ermöglicht. 90

1 Einleitung

1.1 Wissenschaftliche Hintergründe der Arbeit

Die Anzahl der Berichte über Krankheitserreger, gegen welche die gebräuchlichen Antibiotika nicht mehr wirken, häufen sich seit mehreren Jahren (Berendonk et al. 2015, Lüneberg et al. 2018, Lupo et al. 2012, Rossolini et al. 2014). Diese Zunahme von antibiotikaresistenten Bakterien stellt für das Gesundheitswesen eine stetig wachsende Herausforderung dar. Auch die World Health-Organisation (WHO) hat das Risiko der Antibiotikaresistenzen erkannt und beschreibt das Auftreten und die Verbreitung dieser antibiotikaresistenten Bakterien als globales Problem, mit dem die Menschheit in Zukunft in verstärktem Maße konfrontiert sein wird (Organization 2014). Aktuelle Patientendaten des Robert Koch-Instituts aus Deutschland belegen einen deutlichen Nachweis von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen in Pathogenen und fakultativ pathogenen Bakterien, wobei die tatsächlichen Verbreitungswege hierbei jedoch ausgeklammert bleiben (Noll et al. 2012).

Antibiotikaresistenzgene und fakultativ pathogene Bakterien aus unterschiedlichen Quellen (Krankenhäusern, Pflegeheimen, Privathaushalten, Schlachtereien, öffentlichen Einrichtungen, landwirtschaftlichem Ausbringen von Gülle etc.), welche in die Umwelt gelangen, können zu einer Kontamination dieser und insbesondere von Wasserressourcen führen. Im Falle eines direkten Kontakts mit dem kontaminierten Wasser und darauffolgender Kolonisation kann dies wiederum bei einer Infektion zu einer Beeinträchtigung der Gesundheit beim Menschen führen (Feuerpfeil et al. 1999, Hembach et al. 2017, Jager et al. 2018b, Volkmann et al. 2004). Die betroffenen Patienten werden im Krankenhaus unter erheblichem, auch finanziellem Mehraufwand durch zusätzliche Behandlungsmaßnahmen therapiert (Engler-Hüsch et al. 2018, Slama 2008). So ist die Behandlung einer Infektion mit einem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* um ca. 2.000 € teurer und mit 13 % höherer Wahrscheinlichkeit nicht erfolgreich, als eine Infektion mit einem sensiblen *S. aureus* Stamm (Engler-Hüsch et al. 2018, Rubin et al. 1999).

Bakterien, welche in die aquatische Umwelt gelangen und dort persistieren, können sich unter günstigen Bedingungen wieder erneut zu kritischen Konzentrationen vermehren (Czekalski et al. 2012). So ist eine nachhaltige Lösung, um diese fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene zurückzuhalten, unumgänglich. Kläranlagen stellen eine mögliche gemeinsame Barriere mehrerer möglicher Quellen von Antibiotikaresistenzgenen und fakultativ pathogenen Bakterien dar, bevor diese die aquatische Umwelt erreichen. Um die Belastung in der aquatischen Umwelt signifikant zu reduzieren, wird eine Elimination oder eine sehr effektive Reduktion benötigt. Neben der generellen Bakterienreduktion müssen vor allem auch Antibiotikaresistenzgene berücksichtigt werden, da deren Verbreitung auch unabhängig von der ursprünglichen Bakterienart erfolgen kann (Carattoli 2009). Durch den Prozess des horizontalen Gentransfers kann die Weitergabe von Antibiotikaresistenzen an Umweltbakterien erfolgen, die dadurch ihrerseits zur Antibiotikaresistenzsituation beitragen können (von Wintersdorff et al. 2016).

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass die konventionelle Abwasserbehandlung in kommunalen Kläranlagen im Hinblick auf das Eliminationsvermögen von hygienisch relevanten Bakterien nicht ausreicht (Alexander et al. 2015, Hembach et al. 2017). Auch die in größeren Kläranlagen teilweise vorhandene 4. Reinigungsstufe mit oxidativen und

adsorptiven Verfahren zur Reduktion chemischer Kontaminationen (organische Spurenstoffe) erreicht aus mikrobiologischer Sicht nur eine unzureichende Reduktion (Alexander et al. 2016). Um eine effektive Reduktion zu gewährleisten, muss ein zusätzliches Verfahren installiert werden, welches eine signifikante Reduktion der fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen auf ein akzeptables Niveau ermöglicht.

1.2 Aktuelle Situation

Neben Viren, Pilzen und Parasiten sind rund 200 Bakterienarten als fakultativ pathogene Krankheitserreger des Menschen bekannt. Diese Krankheitserreger oder fakultativ pathogenen Bakterien können über Abwasserwege oder landwirtschaftliche Abschwemmungen zu einer Kontamination von Wasserressourcen und damit indirekt oder direkt zu einer Beeinträchtigung der menschlichen Gesundheit führen (Feuerpfeil et al. 1999). Durch das Auftreten von Antibiotikaresistenzen wird das Risiko der Gesundheitsbeeinträchtigung noch weiter verstärkt.

1.2.1 Verbrauch von Antibiotika in Deutschland

In der Humanmedizin werden in Deutschland jährlich 700-800 Tonnen (t) Antibiotika verschrieben. Hiervon entfallen ca. 300 t auf sogenannte Reserveantibiotika. Dies sind Antibiotika, welche nur verschrieben werden dürfen, falls die üblichen Antibiotika nicht mehr wirken. Etwa 80-90 % der Antibiotika werden in ambulanten Behandlungen, in privaten Haushalten oder Pflegeeinrichtungen eingesetzt (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit und e.V. 2016). Zu den in der Humanmedizin am häufigsten eingesetzten Antibiotikaklassen zählen Präparate aus einer Kombination von Penicilline mit β-Lactamase-Hemmern (23,2 %), Cephalosporine der zweiten (12,9 %) und dritten (8,9 %) Generation, Carbapeneme (6,2 %), Fluorchinolone (11,3 %) und Makrolide (3,8 %) (Aghdassi et al. 2016). Im internationalen Vergleich des Verbrauchs von Antibiotika gehört Deutschland mit Ländern wie den Niederlanden, Slowenien oder Ungarn zu dem unteren Drittel.

In der Veterinärmedizin lag die Summe der eingesetzten Antibiotika im Jahr 2018 laut dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit bei ca. 722 t. Hiervon entfielen mit 271 t (38 %) ein Großteil auf der Wirkstoffklasse der Penicilline, 178 t (25 %) auf Tetracycline, 63 t (9 %) auf Sulfonamide und 59 t (8 %) auf Makrolide. Die in der Humanmedizin eingesetzten Aminoglycoside und Cephalosporine werden in der Veterinärmedizin nur in sehr geringen Mengen eingesetzt (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2019).

1.2.2 Verbreitungswege von antibiotikaresistenten fakultativ pathogenen Bakterien

Generell zeichnen sich Mikroorganismen durch eine außerordentlich hohe Anpassungsfähigkeit an vielfältigste Lebensbedingungen, auch in der aquatischen Umwelt, aus (Blaut 2012). Diese Anpassungsfähigkeit beruht auf einer großen genetischen und metabolischen Flexibilität und Vielfalt. Die genetischen Informationen zur Antibiotikaresistenz bleiben nicht nur in einer Bakterienspezies begrenzt, sondern können über mobile genetische Elemente (z.B. Integrons, Transposons, Plasmide) zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies ausgetauscht werden (horizontaler Gentransfer) (Courvalin 2008, Volkmann et al. 2004).

Bei Integrons handelt es sich um genetische Strukturen, welche bis zu sechs Genkassetten (z.B. Antibiotikaresistenzgene) aufnehmen und austauschen können (Gillings et al. 2008, Ploy et al. 2000). Sie setzen sich aus einer Rekombinationsstelle, einem Integrasegen sowie einem Promotor zusammen, welche sich über zwei konservierte und eine variable Region erstrecken (Gravel et al. 1998). Insgesamt sind fünf unterschiedliche Klassen von Integrons bekannt, welche sich durch ihr Integrasegen unterscheiden (White et al. 2001). Besonders das Integron Klasse 1 ist in Oberflächenwasser und Abwasser weit verbreitet und trägt häufig Genkassetten mit Bezug auf klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen (Zhang et al. 2009). Es ist bereits in 40-70 % aller Gram-negativen, isolierten Krankenhauspathogenen zu finden (van Essen-Zandbergen et al. 2007).

Eine weitere Art der mobilen genetischen Elemente sind Transposons. Hierbei handelt es sich um genetische Elemente, bestehend aus einem Transpositions-Gen und zwei invertierten, sich wiederholenden Sequenzen an den jeweiligen Enden des Elementes, welche fähig ist, seine Position innerhalb einer Zelle selbstständig zu verändern (Alberts et al. 2007, Gillings et al. 2008). Transposons konnten bisher in allen untersuchten Bakterienspezies nachgewiesen werden, tragen neben Substrat-spezifischen Enzymen auch Antibiotikaresistenzgene und sind mittels Integrons in der Lage, diese auszutauschen (Liebert et al. 1999, Okitsu et al. 2005).

Plasmide als weiteres mobiles genetisches Element sind zirkuläre, doppelsträngige extrachromosomale DNA, welche sich unabhängig vervielfältigen, speziesübergreifend übertragen werden, und eine Vielzahl unterschiedlicher Gene tragen können (Sørensen et al. 2005). Mit Hilfe dieser drei mobilen genetischen Elemente (Integrons, Transposons, Plasmide) sind Bakterien in der Lage sich effektiv und schnell an neue Bedingungen anzupassen.

Die Belebungsbecken der biologischen Stufe von Kläranlagen bieten passende Bedingungen für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen mittels dieser mobilen genetischen Elemente (Schluter et al. 2008, Szczepanowski et al. 2008). Jede Belebtschlammflocke besteht aus einer Vielzahl verschiedenster Bakterien. Hier können aufgrund der vorherrschenden Bedingungen (hohe Bakteriendichte, hohe Konzentrationen an Phosphat, ein breites Angebot an Nährstoffen und Selektionsdrücke wie z.B. Antibiotika in subinhibitorischen Konzentrationen) Resistenzgene von einer Bakterienzelle auf eine andere übertragen werden (Carey et al. 2016, Cheng et al. 2012, Rizzo et al. 2013). Diese Resistenzgene liegen häufig auf mobilen genetischen Elementen, die zwischen Bakterien weitergegeben bzw. ausgetauscht werden. Dies geschieht nicht nur innerhalb einer Spezies, sondern auch an „fremde“ Bakterienspezies der autochthonen Population (Cambray et al. 2010, Carattoli 2009, Grinsted et al. 1990). Über diesen horizontalen Gentransfer gelangen Resistenzgene in Bakterien, die selbst gar keinen Kontakt zu einem Antibiotikum hatten. Ein solcher Gentransfer kann über drei Mechanismen ablaufen (vgl. Abbildung 1).

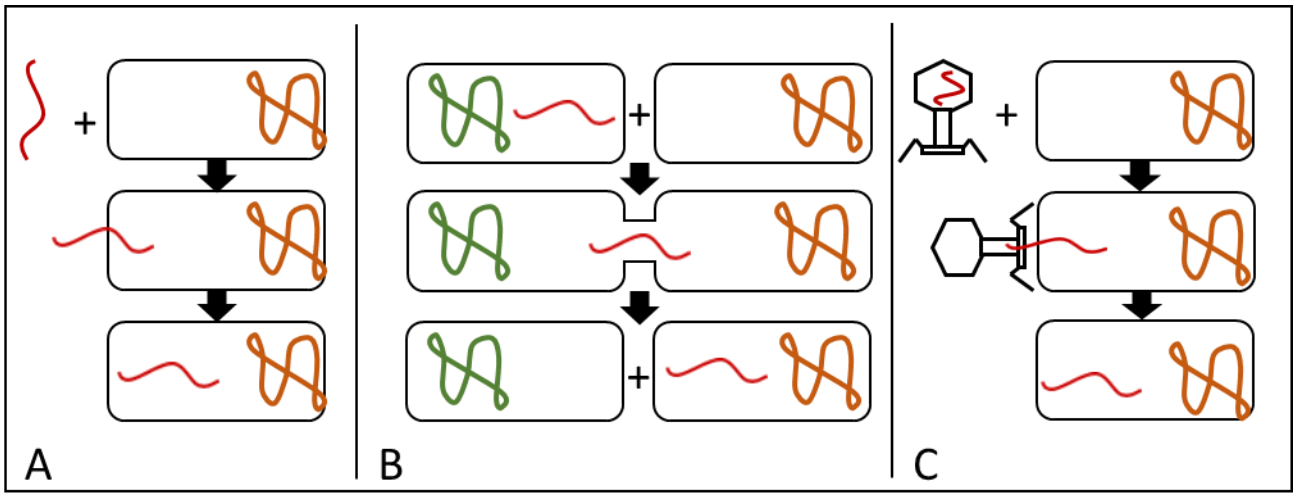

Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei Mechanismen des horizontalen Gentransfers. A: Transformation, B: Konjugation, C: Transduktion (Hartmann 2004/2005).

Bakterien können genetische Informationen durch Aufnahme von Fremd-DNA, z.B. freigesetzter DNA aus toten Bakterien, aufnehmen und in ihr Erbgut integrieren. Ein Vorgang, der als Transformation bezeichnet wird. Ist die freie DNA an Partikeln oder in Biofilmen gebunden, so ist sie zudem in der Wasserphase wesentlich stabiler sowie vor Abbau geschützt und steht dadurch länger für die Transformation zur Verfügung.

Der zweite Mechanismus, bei dem ein direkter Zell-Zell-Kontakt Voraussetzung ist, wird als Konjugation bezeichnet. Hier werden genetische mobile Elemente über Zellstrukturen direkt zwischen den Bakterien weitergegeben. Auch hier ist eine hohe Zelldichte und -diversität, wie sie in Abwassersysteme oder Biofilmen vorzufinden ist, vorteilhaft.

Die Transduktion ist der dritte Mechanismus, über den ein horizontaler Gentransfer möglich ist. Dabei spielen Phagen eine wesentliche Rolle. Teile des Erbguts einer mit Phagen befallenen Bakterienzelle werden in das Erbgut des Phagen integriert und nachträglich bei einer erneuten, zweiten Infektion einer Bakterienzelle in deren Erbgut integriert. Letztlich funktioniert der Phage als Transporter von Wirts-DNA.

Hohe Zelldichten und Zelldiversitäten und weitere bekannte abwasser- und umweltspezifische Parameter wie z.B. relevante Magnesium/Calcium Konzentrationen oder Veränderungen in der Nährstoffversorgung und Phosphatmengen begünstigen alle drei Arten von horizontalem Gentransfer (Thomas und Nielsen 2005). Da Abwasser viele dieser Voraussetzungen erfüllt, kann aufbereitetes Abwasser somit zahlreiche Bakterien enthalten, die ein neu erworbenes Resistenzgen tragen. Sie gelangen in die aquatische Umwelt, ohne dass bekannt ist, welches Risikopotential sich in Hinblick auf Vermehrung, Selektion und weiteren Gentransfer daraus ergeben kann. Die kommunale Kläranlage kann als Hotspot für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen gesehen werden (Rizzo et al. 2013).

Gleichzeitig ist sie aber auch eine der wenigen gemeinsamen Schnittstellen vieler potentieller Eintragspfade von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen, bevor diese in die Umwelt gelangen können. Kliniken, Haushalte, Pflegeeinrichtungen, öffentliche Einrichtungen, Industrie und zum Teil auch Tier- und Mastbetriebe leiten ihr Abwasser in das kommunale Abwassersystem. Bei diesen Gegebenheiten bietet sich eine zentrale erweiterte Abwasseraufbereitungsanlage mit dem Ziel der Reduktion von fakultativ pathogenen

Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen an, bevor diese in die Umwelt emittiert werden. In diesem Zusammenhang ist auch die Relevanz für die Trinkwasserversorgung zu betrachten. Der Schutz von Rohwässern der Trinkwasseraufbereitung vor Kontaminationen mit Krankheitserregern und bakteriellen Trägern von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen dient der allgemeinen Gesundheitsvorsorge, da zum jetzigen Zeitpunkt nicht abgeschätzt werden kann, von wem und unter welchen Bedingungen klinisch relevante Antibiotikaresistenzen auch auf Trinkwasserbakterien, z.B. im Verteilungssystem übertragen werden können (Allen et al. 2004, Chan et al. 2019, Schwartz et al. 2003).

1.2.3 Infektionslage mit resistenten Bakterien

Die Folgen der bisherigen Ausbreitung von antibiotikaresistenten Erregern zeigen sich an den aktuellen Fallzahlen von antibiotikaresistenten Infektionen im Gesundheitssystem. So wurden nach einer Studie des Europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) EU-weit im Jahr 2015 ca. 670.000 antibiotikaresistente Infektionen registriert, von denen 33.000 Fälle tödlich verliefen (Cassini et al. 2019). Die häufigsten Infektionsfälle mit resistenten Krankheitserregern im Gesundheitswesen stammen aus der sogenannten ESKAPE Gruppe der fakultativ pathogenen Bakterien (Tacconelli et al. 2017). Diese zuerst von Rice et al. (2008) beschriebene Gruppe besteht aus *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacteriacae.* Sie sind verantwortlich für ca. 66% aller Infektionen im Gesundheitswesen und tragen mit einem signifikanten Anteil zu der Sterblichkeitsrate in Intensivstationen bei (Lawrence und Jeyakumar 2013, Navidinia 2016, Rice 2008, Vadivoo und Usha 2018). Insbesondere antibiotikaresistente Infektionen der ESKAPE Erreger führen zu längeren Krankenhausaufenthalten und hohen Behandlungskosten (Vadivoo und Usha 2018).

Untersuchungen des Robert Koch-Instituts zeigen, dass auch in Deutschland mittlerweile bei einer Vielzahl unterschiedlicher nosokomialer Infektionen Resistenzen gegen die gebräuchlichen Antibiotika nachgewiesen werden. So sind nach dem Bericht Germap 2015 des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit ca. 30 % aller *A. baumannii* Infektionen nicht mehr sensibel gegen Carbapeneme und 14,9 % der *E. coli* Infektionen bzw. 17,4 % der *K. pneumoniae* Infektionen verfügen über Extended Spektrum β-Lactamasen (ESBL). Resistenzgene gegen das Reserveantibiotikum Colistin treten bisweilen vereinzelt auf (<1 %). Da es jedoch auf einem mobilen Plasmid vorliegt, rät das Bundesamt ihr Auftreten und Verbreitung „sorgfältig zu beobachten“ (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit und e.V. 2016).

Eine besondere Relevanz in der Sachlage der Resistenzen haben multiresistente Bakterien. Die sogenannten 3- bzw. 4-MRGN (multiresistente Gram-negative Bakterien) sind gegen drei (Acylureidopenicilline, 3. Generation Cephalosporine und Fluorchinlone) oder vier Klassen (zusätzlich Carbapeneme) von Antibiotika gleichzeitig resistent (Bundesgesundheitsblatt 2012). Nach Untersuchungen des Robert Koch-Instituts waren im Jahr 2014 3,2 % aller ambulant behandelten und 6,6 % aller stationär behandelten *P. aeruginosa* Infektionen 3-MRGN. Für 4-MRGN Infektionen lag die Resistenzrate bei 1,5 % im ambulanten und 3,2 % im stationären Bereich (Robert-Koch-Institut 2019).

1.2.4 Problematik der Grenzwerterhebung

Trotz der Verbreitung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene und des daraus resultierenden gesundheitlichen Risikos für die Gesellschaft, ist die Problematik im Bereich der Abwasserbehandlung noch nicht umfassend in Gesellschaft und Politik kommuniziert und integriert.

So sind in der Abwasserverordnung bisher keine Regelungen zur allgemeinen Überwachung oder Reduzierung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen vorhanden, obwohl die WHO als auch die UN-Vollversammlung eine Unterbrechung der Verbreitungswege fordern (Levy und Marshall 2004).

Es existieren zwar Richtlinien, welche eine Reduktion von Indikatororganismen von 3-4 Log-Stufen vorschlagen (EN12255-14:2003). Jedoch gelten diese lediglich für die direkte Verwendung der Gewässer zu Freizeitzwecken oder zur Bewässerung landwirtschaftlich oder gärtnerisch genutzter Flächen (DWA-M 205, 2013). Speziell für die Wasserwiederverwertung für die Bewässerung in der Landwirtschaft verfolgt die Europäische Union mit der aktuellen Verordnung EU 2020/741 einen vergleichbaren Ansatz, bei dem in der Gesamten behandlungskette bis zur landwirtschaftlichen Bewässerung eine Reduktion von *E. coli* um 5 Log-Stufen erfolgen muss. In dieser Verordnung sind auch zum ersten Mal Antibiotikaresistenzgene zur Überwachung vorgesehen, allerdings nur falls ihr Auftreten nicht durch andere Quellen verursacht werden kann. Weiterhin wird sich vielfach an der Badegewässerrichtlinie (2006/7/EG) orientiert, welche zum Erreichen der besten Qualitätsstufe für Binnengewässer maximal 200 Kolonie-bildende Einheiten/100 mL intestinale Enterokokken sowie 500 Kolonie-bildende Einheiten/100 mL *E. coli* erlaubt und weitere mikrobiologische Parameter nicht berücksichtigt.

In der strengeren Trinkwasserverordnung sind als mikrobiologische Parameter für die allgemeine Anforderung an Trinkwasser unter anderem *E. coli* sowie *Enterokokken* als Indikatororgansimen mit einem Grenzwert von 0 Kolonie-bildende Einheiten/100 mL aufgeführt. Krankheitserreger, darunter fallen auch Bakterien, welche eine übertragbare Krankheit verursachen können (Infektionsschutzgesetz), dürfen laut Trinkwasserverordnung nicht nachweisbar sein.

Antibiotikaresistenzgene werden in keiner der Regelung oder Richtlinie erwähnt, obwohl in den nachfolgenden Gewässern und Systemen (inkl. des Verteilungssystems des Trinkwassers) Bakterien und Biofilme existieren, welche eine Verbreitung der Antibiotikaresistenzgene ermöglichen (Szewzyk et al. 2000). Auch ist der häufige Bezug auf die beiden Indikatorbakterien *E. coli* und *Enterokokken* aus hygienischer Sicht nicht ausreichend und sollte um weitere Erreger (z.B. Biofilmbildner wie *P. aeruginosa* oder *A. baumannii*) erweitert werden, da diese ein anderes Persistenzverhalten in der Umwelt zeigen, als die genannten Indikatorbakterien. Zusätzlich zeigen diese Bakterien auch ein verstärktes Potential zur Ausbildung einer Multiresistenz. Letztlich ist das bekannte Indikatorprinzip im Hinblick auf die Bakteriendiversität nicht ausreichend, um damit ein gesamtheitliches Bild der bakteriellen Population mit Gesundheitsrelevanz abbilden zu können. Ein Kläranlagenauslauf kann der Badegewässerverordnung und damit dem Indikatorprinzip entsprechen, wäre jedoch aus mikrobiologischer Sicht als Quelle hoher mikrobiologischer Risiken für die Gesundheit einzuordnen. Dieses Beispiel unterstreicht die Spezifität der Verordnungen für vorher definierte aquatische Bereiche und die limitierende Übertragbarkeit auf erweiterte Bereiche.

Für eine allgemeingültige Regulierung der Emission von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen für Kläranlagen ist eine Risikoanalyse von zentraler Bedeutung. Fakultativ pathogene Bakterien können u.U. in der Umwelt persistieren und somit die Gesamtpopulation im Gewässer beeinflussen. Ebenso können Antibiotikaresistenzgene in der Lage sein, sobald sie in der Umwelt sind, von autochthonen Bakterien aufgenommen zu werden (Brown et al. 2019). Somit tragen auch ursprünglich harmlose Bakterien zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen bei und erschweren die Risikoanalyse (Davison 1999).

Auf nationaler Ebene gibt es in Deutschland bisher noch keine Richtlinie, welche die bestehenden Regelungen erweitert, um der Forderung der WHO und UN-Vollversammlung nachzukommen. International schlägt beispielsweise die National Blue Ribbon Commission der Vereinigten Staaten von Amerika vor, eine minimal erforderliche Reduktion des Gesamtprozesses einer Kläranlage von 6 Log-Stufen festzulegen (Kehoe et al. 2017). Diese geforderte minimale Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien wurde bei einer akzeptablen Infektionsrate von 1 Infektion je 10.000 Einwohnern gewählt. Ob eine solche Reduktion in Zukunft tatsächlich ausreichend sein wird, um die Verbreitungswege von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen vollständig zu unterbrechen, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht mit Sicherheit abgeschätzt werden. Es trägt jedoch dazu bei, die Verbreitung und damit das gesundheitliche Risiko für die Gesellschaft zu reduzieren.

1.3 Übersicht untersuchter Verfahren zur Entfernung fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene aus Abwasser

Aufgrund der Vorgaben der WHO und der UN-Vollversammlung ist es auf lange Sicht unumgänglich, kommunale Kläranlagen mit einer erweiterten Abwasseraufbereitung auszustatten, um die Verbreitung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen zu minimieren. Aus diesem Grund wurden neben der konventionellen Abwasseraufbereitung, die Verfahren der erweiterten Abwasserbehandlung:

- Pulveraktivkohlebehandlung mit nachfolgender Sandfiltration
- Ozonhandlung
- UV-Bestrahlung
- sequenzielle Ozonhandlung und UV-Bestrahlung
- nachgeschaltete Membranfiltration

hinsichtlich ihres Effekts auf die bakterielle Resistenzlage untersucht. Weitergehend wurde bei ausgewählten Verfahren der Einfluss vereinzelter Prozessparameter (z.B. Ozonkonzentration, UV-Dosis oder Fluxraten) und unterschiedliche Anordnung der Verfahren analysiert. Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht der Anordnung der unterschiedlichen Verfahren nach dem Ablauf des Nachklärbeckens.

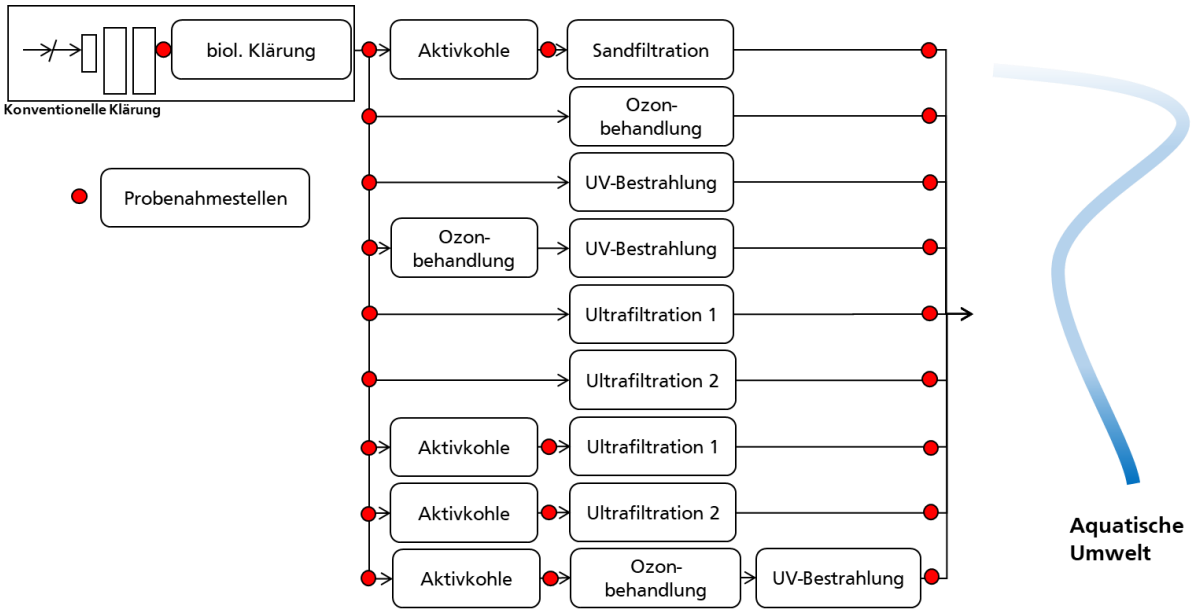

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung zur Untersuchung der weitergehenden Abwasserbehandlung. Rote Punkte: Probenahmestellen.

1.4 Intention der Untersuchungen

Ziel dieser Arbeit ist es, die mikrobielle Belastungssituation nach einer konventionellen Abwasserbehandlung zu ermitteln sowie die Reduktion von fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene durch ausgewählten nachgeschaltete Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung zu ermitteln und zu vergleichen. Es wurde ein methodischer Ansatz gewählt, der es erlaubt, über Mikrobiologie und Molekularbiologie Resistenz- und Populationsveränderungen qualitativ und quantitativ zu erfassen. Hierzu wurde in erster Linie die molekularbiologische Methode der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet, um geeignete Leitparameter im Abwasserstrom zu quantifizieren. Ergänzt wurden die molekularbiologischen Untersuchungen durch kultivierungsbasierte Experimente. Des Weiteren wurden bei den Proben des Retentats der Ultrafiltration Metagenomanalysen zur Einschätzung des mikrobiellen Risikopotentials durchgeführt. Ein Überblick über die durchgeführten analytischen Verfahren ist in Abbildung 3 dargestellt.

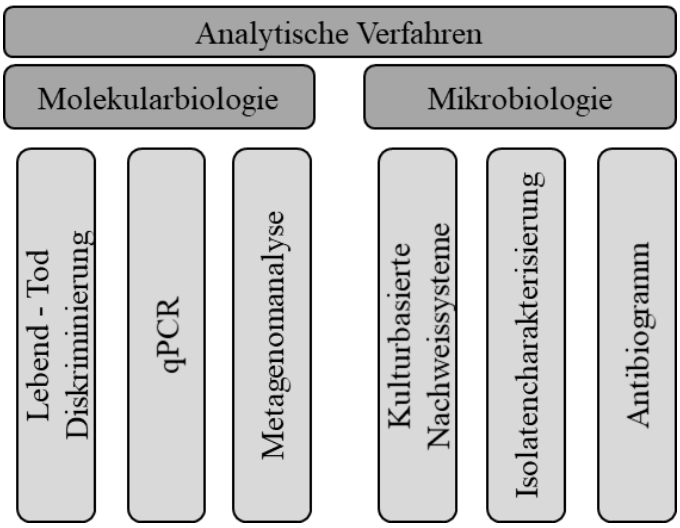

Abbildung 3: Überblick der verwendeten analytischen Verfahren.

Die Kombination unterschiedlicher Analysemethoden ermöglichen es, etwaige Unzulänglichkeiten der einzelnen Verfahren hinsichtlich ihrer mikrobiellen Reduktion zu identifizieren und weitere Handlungsoptionen aufzuzeigen. Dies erlaubt, als finales Ergebnis, eine geeignete Verfahrenskombination zur erweiterten Abwasseraufarbeitung mit dem Ziel der Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen vorzuschlagen.

1.5 Wirkungsweise der untersuchten Techniken der weitergehenden Abwasserbehandlung zur Reduzierung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen

Laut der Abwasserverordnung (Anhang 1 häusliches und kommunales Abwasser) ist es in Deutschland gesetzlich vorgeschrieben, dass abhängig von der Größe der Kläranlage Stickstoff sowie Phosphor und die Summenparameter CSB (chemischer Sauerstoffbedarf) und BSB_5 (biologischer Sauerstoffbedarf) aus dem Abwasser entfernt oder reduziert werden müssen, bevor es in den Vorfluter gelangt (l 2004). Infolgedessen verfügen eine Mehrheit der kommunalen Kläranlagen über erprobte und validierte Reinigungsstufen, welche auf vergleichbaren Prinzipien beruhen. Die Prozesskette dieser etablierten Reinigungsstufen wird konventionelle Klärung genannt. Obwohl die konventionelle Klärung nicht auf die Reduzierung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen ausgelegt ist, erreichen solche Anlagen trotzdem Reduktionen von durchschnittlich 2-3 Log-Stufen, abhängig vom beobachteten Bakterium (Hembach et al. 2017, Jager et al. 2018b).

In Bezug auf die weitergehende Abwasserbehandlung für die gezielte Eliminierung fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzen hat sich unter den Kläranlagenbetreibern noch kein Verfahren durchgesetzt. Dies ist auch auf den Mangel an gesetzlichen Regelungen zurückzuführen. Grundsätzlich steht eine Vielzahl unterschiedlicher Techniken zur Diskussion. Die meisten sind bereits aus der Trink- sowie der Abwasserdesinfektion bekannt und erprobt (Din EN 12255-14). Allerdings ist die Übertragung von der Trink- zur Abwasseraufarbeitung nicht ohne weiteres möglich, da Abwasser eine diverse Matrix ist, welche für einzelne Verfahren störende Stoffe in hohen Konzentrationen beinhalten kann (z.B. partikuläre und gelöste organische Stoffe für Ozonbehandlung oder Schwebstoffe bei der UV-Bestrahlung) (Janex et al. 1998, Tchobanoglous et al. 2003, Zucker et al. 2015). Aus diesem Grund ist es zwingend notwendig, Untersuchungen der Reduktion der fakultativ pathogenen

Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen durch Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung mit realem Abwasser durchzuführen.

1.5.1 Pulverisierte Aktivkohle mit nachgeschalteter Sandfiltration

Eine Behandlung des Abwassers mit Aktivkohle und einer nachgeschalteten Sandfiltration wird als Teil der 4. Reinigungsstufe in vereinzelten kommunalen Kläranlagen zur Spurenstoffreduktion bereits eingesetzt. Ein direkter Bezug zur Reduktion von mikrobiellen Kontaminanten wurde ursprünglich nicht beabsichtig. Der Gesamtprozess an der untersuchten Kläranlage besteht aus einem Kontaktreaktor zum Einbringen und Verteilen der pulverisierten Aktivkohle, einem Sedimentationsbecken zur anschließenden Entfernung der beladenen Aktivkohle und einer Sandfiltrationseinheit. Die nachgeschaltete Sandfiltration dient zusammen mit dem Sedimentationsbecken der Entfernung von Aktivkohlerückständen. Das Verfahren wird zur Reduzierung von Spurenstoffen (Arzneimittel, Hormone, Desinfektionsmittel usw.) bereits in großtechnischem Maßstab angewendet (Boehler et al. 2012).

Über die Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen wurden für die pulverisierte Aktivkohle noch keine ausführlichen Studien durchgeführt. Jedoch wird diskutiert, ob es Bakterien möglich ist, sich an pulverisierter Aktivkohle anzulagern (Mason et al. 2000, Morinaga et al. 2003). Dass sich biofilmbildende Bakterien innerhalb der Sandfiltration ansiedeln, ist ebenfalls bekannt und z.T. zur Biotransformation organischer Stoffe gewollt (Dalahmeh et al. 2014).

Bisherige Untersuchungen zeigen bakterielle Reduktionen zwischen 0 und 2 Log-Stufen (Hiller et al. 2019). Aber auch Zunahmen von Bakterien während einer Sandfiltration konnten z.B. für *E. coli* bereits beobachtet werden (Lu et al. 2015).

Aufgrund der bisherigen Informationsgrundlage zu der Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen über Pulveraktivkohle, sowie des nicht eindeutigen bisherigen Wissensstands bezüglich der Sandfiltration, wurden diese beiden Verfahren hinsichtlich ihrer Reduktion gegenüber bakterieller Kontaminationen untersucht.

1.5.2 Oxidative Abwasserbehandlung durch Ozon

Ozon (O_3) ist ein sehr reaktives Gas, welches aufgrund seiner stark oxidierenden Wirkung bereits seit längerer Zeit in der Trinkwasseraufarbeitung zur Desinfektion verwendet wird (Facile et al. 2000, Langlais et al. 1991). Im Vergleich zu anderen Oxidationsmitteln wie Chlor erweist sich Ozon aufgrund seines höheren elektrochemischen Potentials und daraus folgend niedrigen CT-Werten als besonders effektiv. Das CT-Konzept wird zur Beschreibung der Effizienz von Desinfektionsprozessen eingesetzt. Das Produkt der Restkonzentration mit der Kontaktzeit (c * t) ergibt den CT-Wert in mg pro min/L. Dieser lässt sich mit einer Log-Stufen Reduktion korrelieren und erlaubt einen direkten Vergleich der Reduktionen unterschiedlicher Oxidationsverfahren (Zhang et al. 2013). So ist, nach vereinfachten Abschätzungen, Ozon (CT_{99}-Wert: 0.02) viermal effektiver bei der Reduzierung von Bakterien als Chlor (CT_{99}-Wert: 0.04-0.08). Die exakten CT-Werte sind hierbei von den Eigenschaften der untersuchten Bakterien abhängig (WHO 2008).

In einigen Kläranlagen sind bereits großtechnische Anlagen zur Ozonbehandlung verbaut. Diese dienen jedoch vorrangig der Spurenstoffreduktion und sind dementsprechend hinsichtlich der Elimination von Spurenstoffen optimiert. So wird z.B. in der Schweiz an einer

Kläranlage mit 105.000 Einwohneräquivalenten eine großtechnische Ozonanlage mit 0,55 g Ozon pro g gelöstem organischen Kohlenstoff (Disolved Organic Carbon/DOC) betrieben (Bourgin et al. 2018). In der Trinkwasseraufbereitung wird Ozon zur Desinfektion dagegen in Konzentrationen zwischen 0,2 und 2 g Ozon/g DOC verwendet (Auckenthaler und von Gunten 2010). Zur Reduktion von Bakterien im wurden Abwasser bisher hauptsächlich Ozonkonzentrationen zwischen 0,125 und 1 g Ozon/g DOC untersucht (Czekalski et al. 2016, Iakovides et al. 2019, Jager et al. 2018a).

Die desinfizierende Wirkung von Ozon basiert auf zwei unterschiedliche Prozessen:

1: Der direkten Reaktion von Ozon mit organischen Bestandteilen der Mikroorganismen.

2: Der indirekten Reaktion über OH· Radikale.

Der Mechanismus, welcher für die desinfizierende Wirkung als hauptverantwortlich angesehen wird, ist der Criegee-Mechanismus, durch welchen C=C Doppelbindungen aufgespalten werden (Criegee 1975, Geletneky und Berger 1998). Er ermöglicht Ozon durch das Aufspalten ungesättigter Fettsäuren in der Zellwand und Zellmembran eine direkte Zelllyse (Scott und Lesher 1963). Neben der direkten Reaktion von Ozon geht bei der indirekten Reaktion über OH· Radikale der Zerfall von Ozon-Molekülen in Wasser voraus. Dieser Verfallsprozess (Peroxon-Prozess) ist sehr komplex und in der Fachliteratur noch nicht vollständig beschrieben. Allgemein wird der vorgeschlagene Reaktionsweg als Hauptweg unter pH-neutralen Bedingungen angesehen (Staehelin und Hoigne 1982). Die entstehenden OH· Radikale sind wesentlich reaktiver (CT:$0{,}8 \times 10^{-5}$) und weniger selektiv als eine direkte Reaktion von Ozon mit der Zielsubstanz und sind verantwortlich für die Mehrheit der Oxidationsprozesse (Cho et al. 2003). Aufgrund der stark diversen Matrix mit multiplen Kontaminationen ist eine genaue Charakterisierung der zugrundliegenden Reaktionen bei der Hygienisierung des Abwassers jedoch nicht möglich. Hohe Ozonkonzentrationen haben eine vermehrte Bildung des karzinogenen Stoffes Bromat und weiterer unerwünschter Neben- und Abbauprodukten zur Folge, sodass es in der Spurenstoffreduktion vermieden wird, solch hohe Konzentrationen einzusetzen (Czekalski et al. 2012, Hubner et al. 2015, Luddeke et al. 2015, Somensi et al. 2010).

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass eine Ozonbehandlung mit bis zu 1 g Ozon/g DOC Reduktionen von 2 Log-Stufen von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen erreichen kann (Alexander et al. 2016, Czekalski et al. 2016). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Reduktion abhängig von der Ozonkonzentration und der Kontaktzeit, den physikalisch/chemischen Eigenschaften (Temperatur, Wasserhärte etc.), der genauen Zusammensetzung der Matrix (DOC, anorganische Spurenstoffe) und Biozönose sind. So ist eine leicht saure Umgebung für eine Ozonbehandlung mit dem Ziel der Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien besser geeignet, als eine neutrale oder basische Umgebung (Zuma et al. 2009). Eine steigende Temperatur hat einen sowohl positiven Effekt auf den Phasenübergang von der Gasphase in die Flüssigphase von Ozon als auch einen förderlichen Aspekt bei der Selbstzersetzung von Ozon in OH· Radikale (Farooq et al. 1977, Savoye et al. 2001). Ebenfalls hat sich erwiesen, dass bei gleicher Ozondosis ein hoher TOC zu einer schlechteren Reduktion von Bakterien führt (Farooq et al. 1977). Hierbei ist besonders die Präsenz von Biofilmen ein wesentlicher Punkt, welcher die Eliminationsleistung durch Zehrung der Ozonmoleküle mindert (Ford 1999). Als Folge dessen, sind biofilmbildende Bakterien wie *Pseudomonas* spp. und

Acinetobacter spp. aufgrund ihrer EPS besonders widerstandsfähig gegen die Ozonbehandlung und bergen somit auch ein großes Risiko für eine Wiederverkeimung in nachfolgenden Systemen (Alexander et al. 2015). Analog zum TOC führt ebenfalls ein erhöhter DOC bei gleichbleibender Ozondosis zu einer Verringerung der Reduktion von Bakterien durch die vermehrte Reaktion von Ozon mit anderen organischen Bestandteilen des Abwassers (Hijnen et al. 2004a).

Ein weiterer Faktor für die Robustheit von Bakterien gegen Ozon ist der Anteil der Basen Guanin und Cytosin in der bakteriellen DNA, welche aufgrund der verringerten Geschwindigkeitskonstanten von Ozon zu diesen Basen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit aufweisen (Alexander et al. 2016). So ist *P. aeruginosa* mit einem GC-Gehalt > 60% robuster gegen eine Ozonbehandlung als Enterokokken, welche einen GC-Gehalt < 40% aufweisen (Brede et al. 2011, Chen et al. 2013, Hyatt et al. 2010, Kristich et al. 2007, Lam et al. 2012, Lee et al. 2006).

Das Zusammenspiel der oben erwähnten Faktoren hat zur Folge, dass in der Abwasserbehandlung verlängerte Kontaktzeiten, und damit einhergehend erhöhte CT-Werte mit erhöhten hydraulischen Verweilzeit und Konzentrationen nötig sind, um dieselbe Reduktion von Bakterien zu erzielen, (Auckenthaler und von Gunten 2010, Burleson et al. 1975).

1.5.3 Bestrahlung mit UV

Wie die Ozonbehandlung ist auch die UV-Bestrahlung eine bekannte und bereits seit 1980 in der Trinkwasseraufarbeitung großtechnisch eingesetzte Methode zur Desinfektion (Kruithof et al. 1992). Das zu behandelnde Wasser wird hierbei mit UV-C (100-280 nm Wellenlänge) bestrahlt. In der Regel werden Niederdruckstrahler als „collimated beam device“ (Parallelstrahler) mit einer Emissionswellenlänge von 254 nm eingesetzt. Die desinfizierende Wirkung tritt aufgrund der absorbierenden Eigenschaft von DNA, RNA und Proteinen bei dieser Wellenlänge auf (Jungfer et al. 2007, Suss et al. 2009). Durch die Absorption kommt es bei der DNA zur Bildung von Thymin-Dimeren, welche eine Auftrennung der DNA-Doppelhelix zur Replikation oder Transkription und damit die Proliferation verhindert (Von Sonntag et al. 2003). Neben DNA werden auch RNA, Proteine und im speziellen Enzyme angegriffen, sodass neben der Vermehrung auch der Metabolismus der Zellen gestört wird.

Die Desinfektionsleistung ist neben der Dosis (Joule/m²) und Dauer der UV-Bestrahlung (CT-Konzept) auch durch die Zusammensetzung der Wassermatrix maßgeblich beeinflusst. Neben abfiltrierbaren Stoffen und der damit einhergehenden sinkenden Transmission, wird die Reduktion von Bakterien auch durch die Physiologie und Diversität der Biozönose beeinflusst (Janex et al. 1998, Jolis et al. 2001, Whitby und Palmateer 1993).

Mögliche Schattierungseffekte durch partikuläre Substanzen im Abwasser oder durch Aggregatbildung von Bakterien sind weiterhin Faktoren, die eine effektive Inaktivierung von Bakterien durch UV-Bestrahlung einschränken. Da Untersuchungen bereits gezeigt haben, dass antibiotikaresistente Bakterien oftmals an partikuläre Bestandteile eines Abwassers gebunden sind, kann dies als relevanter Faktor für die Abwasserbehandlung berücksichtigt werden (Brown et al. 2019, Madge und Jensen 2006, Qualls und Johnson 1983, Whitby und Palmateer 1993). Hierbei spielen größere Partikel eine ausgeprägtere Rolle als kleinere Partikel (Darby et al. 1993). Allerdings korrelieren abfiltrierbare Stoffe nicht direkt mit der desinfizierenden Wirkung von UV (Brahmi et al. 2009, Madge und Jensen 2006).

Auch hat die UV-Bestrahlung bei Mikroorganismen in der Wachstumsphase eine größere Effizienz als bei Mikroorgansimen in der stationären Phase oder bei Dauerformen (Hijnen et al. 2004b, Malley 2004, Mofidi et al. 2002, Sommer et al. 1996). Bereits innerhalb einer Bakterienspezies kann sich die Effizienz der abtötenden Wirkung einer UV-Bestrahlung unterscheiden wie an *P. aeruginosa* bereits gezeigt wurde (Brahmi et al. 2009). Physikalische und chemische Eigenschaften des Wassers wie Temperatur oder der pH-Wert haben hingegen keinen Einfluss (Epa 2003, Severin et al. 1983).

Die Anwendung einer UV-Behandlung in der Abwasserbehandlung zur Elimination von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen ist aufgrund der Matrix (z.T. hohe Zellzahl, abfiltrierbare Stoffe, Bakterien in Dauerformen) schwieriger als in der Trinkwasseraufarbeitung bei der häufig UV-Dosen von ca. 400 J/m² verwendet werden (Roeske und Ritter 2007, von Gunten 2005). So wurde bereits beobachtet, dass Bakterien in der Abwassermatrix UV-resistenter sind, als dieselben Organismen in Reinkultur (Hijnen et al. 2006, Maya et al. 2003). Auch einzelne Bakterienspezies werden durch die UV-Bestrahlung unterschiedlich beeinflusst. So ist für eine Reduktion von 3 Log-Stufen *E. coli* und Streptokokken aus Abwasser (im Ablauf des Nachklärbeckens) eine UV-Intensität von 100 J/m² über 10 Sekunden (Sek.) nötig, während *P. aeruginosa* bei gleicher Behandlung lediglich um eine Log-Stufe reduziert wird (Hassen et al. 2000). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei einer Verlängerung der Bestrahlung auf 10 Minuten (Min.) bereits 35 J/m² für 3 Log-Stufen Reduktion von Coliformen und Streptokokken ausreichen können (Lazarova et al. 1998).

Ein besonderer Fokus bei der UV-Behandlung ist der Blick auf einzelne Antibiotikaresistenzgene. So wird zwar DNA durch UV dimerisiert, jedoch besitzen Zellen mehrere Reparaturmechanismen, welche UV-bedingte Schäden beheben können (Von Sonntag et al. 2003). Diese Reparaturmechanismen sind maßgeblich am Effekt der Wiederverkeimung beteiligt. Fakultativ pathogene Bakterien sind direkt nach der UV-Behandlung beschädigt und nicht mehr vermehrungsfähig (sog. viable but not culturable state, VBNC) und können somit durch gängige kulturbasierte Nachweisverfahren nicht direkt nachgewiesen werden. Nach einiger Inkubationszeit können sich die VBNC-Bakterien wieder regenerieren und in ihren vermehrungsfähigen Zustand übergehen. In der Umwelt sind sie dann wieder aktiv und tragen zur allgemeinen Kontaminationslage bei, ohne vorher bei mikrobiologischen Kontrollen z.B. an der Kläranlage entdeckt zu werden (Hijnen et al. 2006, Jungfer 2006). Es wurde bereits veröffentlicht, dass UV-Bestrahlung auch das Auftreten von horizontalem Gentransfer verstärken und damit zu einer Verbreitung von Antibiotikaresistenzen beitragen kann (Aminov 2011).

1.5.4 Sequentielle Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung

Ein sequentieller Ansatz einer Ozonbehandlung gefolgt von UV-Bestrahlung kann sich hinsichtlich der Komplexität der Abwassermatrix unter unterschiedlichen Einflüssen als zielführend erweisen, um fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene aus Abwasser zu entfernen. So basieren die Reduktionen von Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung auf zwei unterschiedlichen Mechanismen, welche sich von der Wirkungsweise her sinnvoll ergänzen können (vgl. Kapitel 1.5.2 und 1.5.3). Bei einer Prozessabfolge beider Verfahren bricht Ozon die Zellwand bzw. Membran der Bakterien auf, sodass eine nachfolgende UV-Bestrahlung die DNA besser erreichen kann. Dies hat den Vorteil, dass durch die Ozonbehandlung freigesetzte DNA durch die UV-Bestrahlung

inaktiviert wird und nicht weiterhin für den horizontalen Gentransfer zur Verfügung steht. Von diesem sequentiellen Verfahren wird eine höhere und nachhaltigere Reduktion erwartet, als für beide Verfahren im Einzelnen. Bakterien, die ozonresistenter sind, werden durch die UV-Behandlung reduziert und umgekehrt (Chen et al. 2005). Obwohl aufgrund der sequentiellen Anordnung die Reduktion von fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im gleichen Umfang durch die selben Faktoren beeinflusst ist, wie die alleinstehenden Verfahren (Kapitel 1.5.2 und 1.5.3), verbessert die Ozonbehandlung die Transmission vom Abwasser um 20-40 %, wodurch wiederum die Reduktion von Bakterien durch die UV-Bestrahlung verbessert wird (Sheldon und Brown 1986, Xu et al. 2002). Bisherige Studien haben gezeigt, dass die sequenzielle Anwendung von Ozon (1-2 g Ozon/L) gefolgt von UV-Bestrahlung (bis 20 J/m²) bereits Reduktionen von *E. coli* bis zu 3 Log-Stufen erreichen kann (Blatchley III et al. 2012).

1.5.5 Nachgeschaltete Ultrafiltration

Die Membranfiltration ist eine vielversprechende Technik, um biologische Kontaminationen aus dem Abwasserstrom zu entfernen, bevor dieser in die Umwelt geleitet wird. Die Ultrafiltration verwendet Membranen mit einem Porendurchmesser zwischen 0,01 und 0,1 µm (20-100 kDA), welche aufgrund ihrer Porengröße Bakterien (durchschnittlicher Durchmesser 1 µm) zurückhalten. Treibende Kraft für die Filtration ist der Druckunterschied zwischen beiden Seiten der Membran (Transmembrandruck). Dieser Transmembrandruck liegt bei Ultrafiltrationen zwischen 0,5 und 10 bar (Pinnekamp und Friedrich 2006). Das Wasservolumen, welches die Membran passieren kann, wird als Flux (l/m²h) angegeben und ist, neben der Viskosität des Mediums und dem Widerstand der Membran bzw. der Deckschicht, maßgeblich vom Transmembrandruck abhängig (Van Den Berg 1990). Membranen werden üblicherweise in zwei unterschiedlichen Membranformen eingeteilt. Es existieren Schlauch- sowie Flachmembranen, welche wiederum in einer Vielzahl unterschiedlicher Modulformen (Rohr-, Kapillar-, Hohlfaser-, Wickel-, Kissen-, Platten und Scheiben-Rohr-Modul) verbaut werden können. Bisher werden in der Abwasserbehandlung als nachgeschaltete Filtration zur Entfernung von Bakterien häufig Kapillar- und Kissenmodule untersucht und eingesetzt (Pinnekamp und Friedrich 2006).

Während die Ozon- sowie UV-Behandlung DNA und andere Zellstrukturen angreifen, hält die Ultrafiltration Bakterien und andere partikuläre Kontaminationen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaft zurück. Auch freie DNA und damit Antibiotikaresistenzgene können durch eine Ultrafiltration zurückgehalten werden, da diese in Abwasser nicht als einzelner DNA Strang vorliegt, sondern zu einem großen Teil an weiteren Partikeln assoziiert sind (Breazeal et al. 2013, Romanowski et al. 1991, Saeki et al. 2010). Einen direkten Einfluss auf die Effizienz von Ultrafiltrationsmembranen haben suspendierte Partikel, wie abfiltrierbare Stoffe oder Bakterien, welche eine Deckschicht (sog. Fouling) auf der Membran ausbilden (vgl. Abbildung 4).

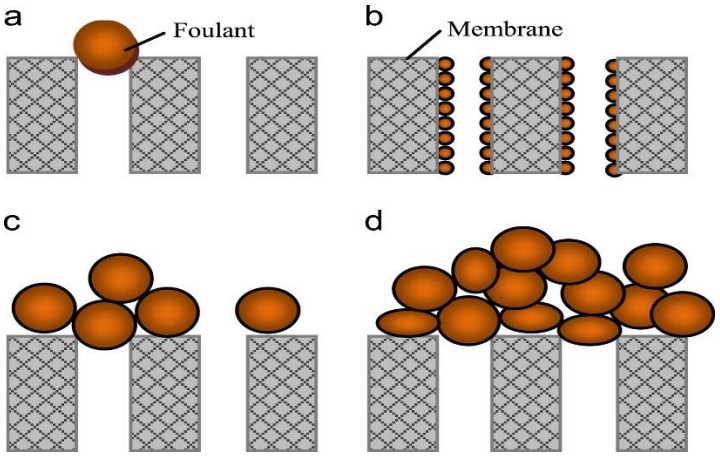

Abbildung 4: Blockungsmethoden einer Ultrafiltrationsmembran a: Porenverblockung; b: Adsorption; c: Deckschicht; d: Biofilm (Qu et al. 2014).

Bei einer ausgeprägten Deckschicht muss entweder der Transmembrandruck und damit der Energieverbrauch erhöht werden, um einen stabilen Flux zu gewährleisten, oder bei gleichbleibendem Transmembrandruck ein verringerter Flux in Kauf genommen werden (Goosen et al. 2005). Die Ausbildung der Deckschicht ist durch eine Vielzahl von Parametern bestimmt, von denen bisher keine als hauptverantwortlicher Prozess identifiziert werden kann. Unter anderem sind das Material, die Beschaffenheit der Membranoberfläche sowie die unterschiedlichen hydrodynamischen Kräfte, hauptsächlich die Zugkraft der Permeation (Drag force), Scherkräfte und DLVO-Kräfte der Querstromfiltration relevante Parameter (Eshed et al. 2008, Kang et al. 2004). Um diese Deckschicht zu entfernen, muss in regelmäßigen Abständen eine Reinigung der Membran durch Rückspülung durchgeführt werden. Da die Bildung der Deckschicht im Wesentlichen von der Qualität des Zulaufes der Membranfiltration abhängt, ist es sinnvoll, ein weiteres, weniger anfälliges System wie ein zusätzliches Sedimentationsbecken mit langsamen Fließgeschwindigkeiten oder eine Sandfiltration vorzuschalten, um somit eine maximale Betriebsdauer und Kosteneffizienz zu erreichen (Crozes et al. 1997). Weitere potenzielle Einflussfaktoren auf die Reduktion von Bakterien durch eine Ultrafiltration wurden bisher noch nicht systematisch untersucht (Hiller et al. 2019).

Trotz des Prinzips des Größenausschlusses und ein um den Faktor 10 kleinerer Porendurchmesser als die durchschnittliche Bakteriengröße, kann bei diesem Verfahren nicht von einer vollständigen Hygienisierung des Abwassers ausgegangen werden (Bourgeous et al. 2001). Trotzdem erreichen Ultrafiltrationseinheiten in der Abwasseraufbereitung mit einer bakterielle Reduktion von ca. 6 Log-Stufen hohe Reduktionen (Futselaar et al. 2003, Hembach et al. 2019, Mannapperuma und Santos 2004).

Ein gemeinsames Problem aller Membranfiltrationen ist, dass bedingt durch ihre Wirkungsweise, die zurückgehaltenen Kontaminanten in einem kleineren Volumen konzentriert werden. Dieses Retentat kann je nach Feststoffanteil des Abwassers zwischen 5 und 15 % des filtrierten Volumens ausmachen (Auckenthaler und von Gunten 2010).

Für den finalen Verbleib und die konkreten Behandlungsmöglichkeiten des Retentats gibt es mehrere Ansätze. Einige Kläranlagen, welche eine Membranfiltration als hygienisierende Stufe verwenden, führen das Retentat direkt in die Belebungsbecken zurück. Weiterhin kann eine zusätzliche Ozonbehandlung des Retentats vor der Rückführung in die biol. Klärung erfolgen (Ferella et al. 2013). Auch eine alternative Verwendung des Retentats z.B. in der

Biogasherstellung ist möglich (Luo et al. 2011). Die derzeit gängige Methode der direkten Rückführung des Retentats in die Belebungsbecken ist aus mikrobiologischer Sicht mit Blick auf die Resistenzlage nicht uneingeschränkt zu empfehlen, da neben Bakterien auch Antibiotikaresistenzgene zurückgeführt werden. Dies kann durch das verstärkte Auftreten von horizontalem Gentransfer im Belebtschlamm zu einer verstärkten Verbreitung dieser Resistenzgene führen (Calero-Cáceres et al. 2014). Die genauen mikrobiologischen Auswirkungen einer direkten Rückführung des Retentates sind bisher noch nicht tiefergreifend untersucht. Da das verbleibende Volumen jedoch ein sehr hohes mikrobiologisches Risiko beinhaltet, ist die Fragestellung der langfristigen mikrobiologischen Auswirkung auf den Klärschlamm jedoch zwingend zu klären, bevor eine großtechnische Membrananlage in Betrieb genommen wird (Hembach et al. 2019).

1.5.6 Weitere Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung zur gezielten Bakterienreduktion

Neben den beschriebenen Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung existieren noch weitere Verfahren, welche zur bakteriellen Reduktion in der Abwasseraufbereitung getestet werden. Deren zugrundeliegender Mechanismus ist in vielen Fällen mit den beschriebenen Verfahren identisch, wird jedoch mithilfe unterschiedlicher Prozesse erreicht.

So kommt die Oxidation auch bei der Abwasserbehandlung mit Chlor und Wasserstoffperoxid zur Anwendung. Bei der weltweit eingesetzten Chlorung wird die oxidierende Wirkung durch Chlor selber ausgelöst. Aufgrund der geringeren oxidierenden Wirkung ist im Vergleich zu Ozon mehr Chlor nötig, um ein vergleichbares Ergebnis zu erzielen (Hoff 1986). Bei der Verwendung von Wasserstoffperoxid wirken ebenfalls OH· Radikale als Oxidationsmittel, jedoch ist hier ein zusätzlicher Aktivierungsschritt zur Bildung der Radikale nötig. Diese Aktivierung kann z.B. durch die Bestrahlung mit UV-A und der Zugabe von Fe^{2+} oder einer Kombination von beidem ausgelöst werden (Fenton/Photo-Fenton/UV basierende Photolyse) (Andreozzi et al. 1999, Chong et al. 2012). Da Fe^{2+} und H_2O_2 die gleichen Wellenlängenbereiche (200-400 nm) absorbieren, wie Hydroxyl-Derivate und Aromate, kann es bei erhöhten Kontaminationen von Aromaten und Hydroxyl- Derivaten zu einer Reduzierung der Effizienz durch die geminderte Bildung von OH· Radikalen kommen. Obwohl bei der Verwendung von Ozon dieser zusätzliche Aktivierungsschritt wegfällt, hat Wasserstoffperoxid den Vorteil, dass es lagerfähig ist und als Flüssigkeit leichter dosierbar ist als das gasförmige Ozon.

Einen gänzlich anderen Mechanismus nutzt das Verfahren der Ultraschallbehandlung. Mittels Piezoelementen werden bei niedrigen Ultraschallfrequenzen (20-50 kHz) Kavitationsblasen im Wasser generiert (Gelate et al. 2000, Suslick 1994). Die desinfizierende Wirkung wurde bereits an Coliformen nachgewiesen und wird durch die Implosion der Kavitationsblasen und der damit einhergehenden Scherkräfte sowie Temperatursprünge erreicht (Mahvi et al. 2005a, Mahvi 2009, Mahvi et al. 2005b). Das Verfahren hat den großen Vorteil, dass das weder Trübstoffe noch gelöste Substanzen die Eliminationsleistung beeinträchtigen. Jedoch geht diese Methode mit einem hohen Energieverbrauch einher (Mahvi 2009, Mason und Lorimer 2002).

1.6 Nachweis von Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen

Um fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene im Abwasser nachzuweisen, werden eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden eingesetzt. Diese lassen sich grundsätzlich in zwei grundlegende Gruppen einteilen:

1. Mikrobiologischer Ansatz
2. Molekularbiologischer Ansatz

Mit dem mikrobiologischen Ansatz erfolgt der Nachweis von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen anhand ihrer phänotypischen Ausprägung. So kann zwar eine Antibiotikaresistenz nachgewiesen werden, jedoch ist es nicht möglich, den genauen Resistenzmechanismus (z.B. Effluxpumpen oder Veränderung des Antibiotikatargets) zu ermitteln. Weiterhin ist es möglich in einer Untersuchung nach zwei Merkmalen zu selektieren (z.B. Antibiotikaresistenz und Taxonomie). Der molekularbiologische Nachweis von Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen unterscheidet sich von dem mikrobiologischen Ansatz darin, dass nicht phänotypische, sondern genotypische Merkmale nachgewiesen werden. Hierfür wird die DNA von Bakterienisolaten oder von der Gesamtpopulation einer Probe extrahiert und anschließend einzelne Resistenzgene nachgewiesen, die für den Resistenzmechanismus kodieren. Zusätzlich ist es auch möglich eine spezielle Bakteriengruppe anhand spezieller konservierter taxonomischer Markergene nachzuweisen. Dazu ist keine vorherige selektive Anreicherung durch Kulturnährmedien notwendig. Eine Aussage über Funktionalität (aktiv oder nicht aktiv) des nachgewiesenen Gens ist mittels molekularbiologischer DNA-basierter Methoden allerdings nicht möglich.

1.6.1 Kulturabhängiger Nachweis mittels Agarosesystemen

Eine mikrobiologische, phänotypische Nachweismethode ist die Kultivierung mittels Agaroseplatten. Hierbei wird ein bestimmtes Volumen einer Probe auf eine mit geeignetem Nährboden gefüllte Petrischale ausgebracht und abhängig vom nachzuweisenden Bakterium bei entsprechender Temperatur inkubiert (37° bei Humanisolaten oder 42° C bei Umweltproben). Einzelne Organismen vermehren sich auf dem Nährboden und bilden so eine makroskopisch sichtbare Kolonie. Um auf jeder Platte eine aussagekräftige Anzahl an Kolonien (20-100 KBE) zu erhalten, werden Verdünnungen einer konzentrierten Probe, oder größere Volumina einer Probe mit geringerer Konzentration filtriert. Dieses iterative Vorgehen hat zur Folge, dass bei einer Probe mit unbekannter Bakterienkonzentrationen eine Messreihe mit einer zeitintensiven Verdünnungsreihe durchgeführt werden muss, damit mindestens zwei Verdünnungen eine auszählbare Anzahl an Kolonien bilden. Anhand der Anzahl der Kolonien und dem ausplattierten Probenvolumen, lässt sich die absolute Konzentration des kultivierbaren Bakteriums in der Probe kalkulieren. Eine wichtige Methode des Nachweises durch Agaroseplatten basierte Systeme ist, dass mittels selektiver Nährböden nur Organismen mit einer bestimmten Eigenschaft nachgewiesen werden können oder die Kolonie bildende Einheit (KBE) bestimmter Bakteriengruppen (z.B. Coliforme) erfassbar sind (Hembach et al. 2019). Hierfür wird in dem Nährboden ein Selektionsdruck aufgebaut, bei dem sich nur die gewünschten Bakterien proliferieren können (z.B. Antibiotika, essentielle Nährstoffe). Auch eine Kombination mehrerer Selektionsmerkmale ist möglich. Ein weiterer Vorteil dieser Methode, ist die Möglichkeit der Isolierung einer einzelnen Kolonie, um diese durch

Folgeuntersuchungen (Antibiogramme oder Isolatencharakterisierung mittels Sequenzierung) weiter zu identifizieren.

Eine wichtige Beschränkung der Kultivierung ist jedoch, dass durch die Verwendung definierter Nährböden, Temperatur, Inkubationsdauer und Atmosphäre nur die Organismen nachgewiesen werden können, welche sich unter diesen Umständen vermehren können. Bakterien, welche sich an eine andere Umgebung adaptiert haben als die gewählten Kultivierungsbedingungen, bilden keine sichtbaren Kolonien und sind somit auch nicht nachzuweisen (falsch-negative Ergebnisse) (Alain und Querellou 2009). Des Weiteren ist es, besonders bei stark mikrobiell belasteten, diversen Proben wie Abwasser möglich, dass ein Bakterium unter den gegebenen Bedingungen nur sehr langsam wächst und durch ein anderes, sich schneller proliferierendes Bakterium, überdeckt wird (Kämpfer 1997). Es ist bereits beobachtet worden, dass Organismen, die einer Stresssituation ausgesetzt waren, innerhalb der Inkubationszeit, die standardmäßig für diese Organismen ausreichend ist, keine sichtbaren Kolonien gebildet haben und damit nicht nachgewiesen werden konnten (Jager et al. 2018a).

Der Kultivierungsansatz ist somit geeignet, um spezifische und bekannte oder erwartete Organismen, sowie deren phänotypische Resistenzen qualitativ oder semiquantitativ nachzuweisen. So sind zum Beispiel die Untersuchungen der Trink- und Badegewässer nach DIN- Norm, mittels Kulturverfahren von Indikatorbakterien durchzuführen (ISO7899 1997).

Für den durchgeführten Vergleich unterschiedlicher Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung wird der kulturabhängige Nachweis ergänzend zu weiteren quantitativen Methoden (qPCR) verfolgt. Er dient der Verifizierung des Nachweises vermehrungsfähiger Bakterien im Ablauf der Verfahren zur erweiterten Abwasserbehandlung und zeigt die Abundanz von Antibiotikaresistenzen in fakultativ pathogenen Bakterien (z.B. bei Vancomycin resistenten Enterokokken).

1.6.2 Nachweis mittels Polymerase Kettenreaktion

Eine weit verbreitete Methode des Nachweises von spezifischen Bakterien und Genen ist die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) (Lazcka et al. 2007). Neben extrahierter DNA werden für diesen Nachweis unter anderem noch zwei Ziel-spezifische kurze Gensequenzen (Primer) benötigt, die sich jeweils in 5‘→3‘ Orientierung im Gegenstrangprinzip an den nachzuweisenden Genabschnittes anlagern. Während der PCR lagern sich die Primer an die denaturierte, einzelsträngige Ursprungs-DNA an und erlauben einer DNA-Polymerase, ausgehend vom Primer die nachfolgende Sequenz des nachzuweisenden Gens als doppelsträngige DNA zu synthetisieren. Die doppelsträngige DNA wird anschließend wieder dissoziiert und erneut durch die Primeranlagerung und DNA-Polymerisierung vervielfältigt. Dieser Ablauf wird durch definierte Temperaturveränderungen gesteuert und mehrfach wiederholt. Mit jedem Wiederholungszyklus verdoppelt sich die Menge der nachzuweisenden Ziel-DNA (Amplikon) in dem Reaktionsansatz. Nach der gewünschten Anzahl an Zyklen wird das Reaktionsgemisch mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese auf die korrekte Amplikonlänge überprüft. Die Detektion der entstehenden DNA-Banden erfolgt durch einen Farbstoff, der mit der doppelsträngigen DNA interkaliert. Bei der Verwendung eines DNA-Ladders, der bekannte Fragmentlängen enthält, kann die Spezifität des Amplifikats anhand der Fragmentlängen-abhängigen Position im Agarosegel überprüft werden.

Eine besondere Variante der PCR, die quantitative PCR (qPCR), ermöglicht eine direkte, genaue Quantifizierung des Zielgens. Der Ablauf und das Prinzip der Reaktion ist identisch

mit dem der konventionellen PCR. Der wesentliche Unterschied ist, dass der Reaktion ein Fluoreszenzfarbstoff oder eine fluoreszenzmarkierte Sonde zugegeben wird. Am Ende eines jeden Verdopplungszyklus wird das Fluoreszenzsignal des Farbstoffes oder der Sonde, die mit der neu synthetisierten DNA interagiert, detektiert. Die Intensität des Signals ist damit proportional zu der Menge des Zielgens und lässt somit unter Einbeziehen der verwendeten Zyklen eine Rückrechnung auf die Anzahl des Zielgens in dem ursprünglichen DNA-Extrakt zu (Cady et al. 2005). Die Länge des Amplifikats kann anschließend ebenfalls mittels einer Agarosegelelektrophorese überprüft werden. Für eine schnellere Verifizierung der Amplifikation kann bei der Verwendung eines interkalierenden Fluorophors eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Dieses Verfahren erlaubt es ein, oder im Falle einer multiplex PCR- mehrere Gene einer Probe in einer Reaktion reproduzierbar zu detektieren und zu quantifizieren.

Alle PCR Verfahren haben den Vorteil, dass sich auch Bakterien, die nicht kultivierbar sind (wie VBNC Stadien), nachweisen lassen (Kibbee und Örmeci 2017). Jedoch wird eine genauere Vorkenntnis über die zu detektierenden Bakterien und Antibiotikaresistenzgene benötigt. Da die Primer spezifisch für ein einziges Gen sein müssen, muss das Genom oder wenigstens die gesuchte Gensequenz, bekannt sein.

Auf Basis der qPCR-Analysen wurden fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene im Zu- und Ablauf der Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung quantifiziert und schlussendlich die Verfahren untereinander verglichen.

1.6.3 Sequenzierung

Ein weiteres molekularbiologisches Verfahren ist die Sequenzierung, hierbei wird die gesamte Nukleotidabfolge der DNA einer Probe bestimmt. Hierfür existiert eine breite Auswahl an unterschiedlichen Methoden. Aktuell ist die von Illumina entwickelte Technologie der Next-Generation Sequenzierung (NGS) eine zeitgemäße Synthese basierte Sequenziermethode (Shokralla et al. 2012). Hierbei wird während des Synthetisierens des Doppelstranges einer PCR-Reaktion, fluoreszenzmakierten dNTP verwendet, welcher beim Einbau ein entsprechendes Fluoreszenzsignal abgibt (Liu et al. 2012, Mardis 2008). Zusammen mit dem Einsatz bioinformatischer Methoden und Datenbanken kann dadurch ein hohes Maß an Tiefe und Qualität der Analyse von Zusammensetzung und Funktion einer mikrobiellen Gemeinschaft erreicht werden.

Bei dieser NGS kann zwischen Amplikon- und vollständiger (Shotgun) metagenomischer Sequenzierung eines DNA-Extraktes unterschieden werden. Bei der Amplikonsequenzierung wird ein Teil mittels einer PCR amplifiziert und das entstehende Amplikon anschließend sequenziert. So kann z.B. mittels des 16S rRNA Gens und dazugehörigen Primersystemen eine Populationsänderung, oder mit entsprechenden Primersystemen auch funktionellen Genen erfassen werden. Bei der vollständigen Metagenomsequenzierung wird die metagenomische DNA ohne eine vorherige PCR Reaktion sequenziert. Dies erlaubt, sowohl taxonomische als auch funktionelle sowie genomische Eigenschaften einer bakteriellen Probe zu bestimmen (Eloe-Fadrosh et al. 2016). Ein großer Vorteil dieser Sequenzierung ist, dass keine eingrenzenden Vorabbedingungen definiert werden und dadurch ein umfassenderes Abbild einer bakteriellen Gesamtpopulation im Hinblick auf Zusammensetzung und Funktion erstellt werden kann. Dieses Vorgehen macht NGS-Methoden vor allem dann attraktiv, wenn eine Charakterisierung der gesamten Population einer Probe gefordert ist. Sie bilden ein

vollständiges Bild ab und erlaubten so eine ausführlichere Risikobewertung. Als limitierend wird allerdings immer noch die Sequenziertiefe angesehen, d.h. Gentargets mit geringer Abundanz werden oftmals nicht mehr erfasst.

1.7 Forschungsfragen

Mit der dargelegten Arbeit soll deutlich werden, in welchem Umfang kommunale Kläranlagen als Barriere für fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene geeignet sind. Die Hypothese lautet, dass zusätzliche Verfahren, oder Verfahrenskombinationen an der Kläranlage erfolgreich sind, um mikrobiologische Kontaminationen in ausreichendem Maße zu reduzieren.

Von der zentralen Forschungsfrage, mit welchen Verfahren die Ausbreitung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in die Umwelt an kommunalen Kläranlagen effektiv verhindert werden kann, lassen sich mehrere Folgefragen und auch Hypothesen ableiten:

- Ist die konventionelle Klärung an kommunalen Kläranlagen geeignet, um fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene zu reduzieren?
- Sind die mikrobiologischen Kontaminationen, welche nach einer konventionellen Klärung die Umwelt erreichen, in Kategorien der Abundanz oder eines gesundheitlichen Risikos einteilbar?
- In welchem Maße, tragen die untersuchten Verfahren der erweiterten Abwasserbehandlung (Aktivkohlebehandlung mit Sandfiltration, Ozonbehandlung, UV-Bestrahlung, Ultrafiltration) zur Reduktion mikrobieller Kontaminationen bei?
- Sind chemisch oxidative Verfahren (Ozonbehandlung) und physikalische Verfahren (Ultrafiltration) in gleichem Maße für die Reduktion mikrobieller Kontaminationen geeignet?
- Weisen einzelne weiterführende Verfahren zu Abwasserbehandlung Limitierungen auf?
- Ist es möglich solche Limitierungen durch eine Kombination von Verfahren zu umgehen?
- Wie kann eine zukünftige Abwasserreinigung aus mikrobiologischer Sicht aussehen?

2 Material und Methoden

2.1 Experimentelle Übersicht

2.1.1 Überblick aller beprobten Kläranalgen zur Feststellung der allgemeinen mikrobiellen Belastungssituation

Insgesamt wurden sieben unterschiedliche Kläranlagen mit unterschiedlichen Ausbaugrößen und vergleichbaren konventionellen Reinigungsstufen beprobt um deren mikrobielle Belastungssituation zu erfassen. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Eckdaten der Kläranlagen gelistet.

Tabelle 1: Ausbaugröße, gereinigte tägliche Abwassermenge, genutzte technische Stufen und Anzahl der Probenahmen aller sieben beprobten Kläranlagen. * = Berechnet nach Angaben zur jährlich behandelten Wassermenge [m³] der Kläranlagenbetreiber.

	Ausbaugröße [EW]	Durchschnittliche behandelte Wassermenge [m³/d] *	Technische Stufen	Probenahmen
Kläranlage 1	23.500	699	Rechen, Sand-/Fettfang, Biologie, P-Fällung, Nachklärung	3
Kläranlage 2	46.000	3.496	Rechen, Sand-/Fettfang, Biologie, P-Fällung, Nachklärung	3
Kläranlage 3	26.000	1.341	Rechen, Sand-/Fettfang, Biologie, P-Fällung, Nachklärung	3
Kläranlage 4	45.000	1.430	Rechen, Sand-/Fettfang, Biologie mit Bio-P, P-Fällung, Nachklärung	3
Kläranlage 5	210.000	30.527	Rechen, Sand-/Fettfang, Vorklärung, Biologie, P-Fällung, Nachklärung	3
Kläranlage 6	8.000	480	Rechen, Sand-/Fettfang, Biologie, P-Fällung, Nachklärung	3
Kläranlage 7	440.000	110.000	Rechen, Sand-/Fettfang, Biologie mit Bio-P, optionale P-Fällung, Nachklärung	7

Die breite Auswahl der unterschiedlichen Größenklassen der Kläranlagen von 8.000 bis 440.000 Einwohnerwerten (EW), ermöglicht eine Abschätzung der durchschnittlichen Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen von Kläranlagen.

Auf dem Gelände von Kläranlage 7 wurde das Versuchsfeld mit den Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung der Ozonbehandlung, Aktivkohleadsorption mit nachfolgender Sandfiltration, UV-Bestrahlung und Ultrafiltration installiert.

2.1.2 Übersicht des Versuchsfeldes für weitergehende Abwasserbehandlungsverfahren

Das Untersuchungsfeld für die weitergehende Abwasserbehandlung befand sich an einer großtechnischen Kläranlage im Südwesten von Deutschland. Die Kläranlage behandelt das Abwasser von ca. 440.000 Einwohnerwerten, was je nach Niederschlag, einem Wasservolumen von 80.000 bis 225.000 m³/d entspricht. Im Einzugsgebiet waren, neben den angrenzenden Gemeinden, mehrere Krankenhäuser sowie Industrie angesiedelt.

Die Kläranlage verfügte über eine, in zwei Straßen aufgeteilte, mechanische sowie biologische Klärung, welche nach dem Prinzip des Phoredox Prozess arbeitet. Diese Art der Prozessführung erlaubt die Entfernung von Stickstoff und Phosphor in mehreren unterschiedlich belüfteten Becken und damit variierendem Sauerstoffgehalt.

In Tabelle 2 sind die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung über ein Jahr kontinuierlich überwachter Parameter im Ablauf des Nachklärbeckens zusammengefasst. Die Mittelwerte basieren auf stündlich erhobenen Messungen.

Tabelle 2: Mittelwert sowie Standardabweichung stündlich erhobener Parameter im Ablauf des Nachklärbeckens (Zulauf der weitergehenden Abwasserbehandlungsverfahren) von Kläranlage 7 über den Zeitraum von einem Jahr.

pH-Wert	Temperatur [°C]	Leitfähigkeit [µS]	SAK [1/m]	Phosphat [mg/L]	DOC [mg/L]	TNb
7,3 ± 0,8	15,9 ± 3,3	817,3 ± 203	9,3 ± 1,8	0,3 ± 0,2	4,3 ± 1,1	4,6 ± 1,2

Für dieses Projekt sind zwei dieser Parameter, aufgrund ihres Einflusses auf Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung von besonderem Interesse. Bei dem spektralen Absorptionskoeffizienten (SAK) handelt es sich um den Absorptionskoeffizienten von filtriertem (Porengröße: 0,45 µm) Wassers bei 254 nm (SAK_{254}). Er wird als Maß für organische, gelöste Wasserinhaltstoffe wie Huminstoffe oder andere aromatischen Verbindungen aufgrund ihrer UV absorbierenden Eigenschaften herangezogen wie (Metcalf et al. 2014). Der zweite relevante Summenparameter ist der gelöste organische Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon/ DOC). Im Gegensatz zum SAK_{254} ist der DOC nicht auf die Erfassung lichtabsorbierender Stoffe beschränkt, sondern umfasst alle gelösten, organischen Kohlenstoffverbindungen.

2.1.2.1. **Aktivkohle mit nachgeschalteter Sandfiltration**

Zusätzlich zu dieser konventionellen Klärung war eine Prozess-Straße mit einer zusätzlichen adsorptiven Reinigungsstufe mit Pulveraktivkohle (PAK) ausgestattet. Die adsorptive Reinigung besteht aus einem Kontaktreaktor, einem zusätzlichen Sedimentationsbecken und nachgeschalteter Sandfiltration. Die Kapazität der ausgebauten Prozess-Straße reicht aus, um im normalen Betrieb (kein Regenereignis) das anfallende Abwasser vollständig zu behandeln.

2.1.2.2. **Ozonbehandlung**

Die beprobte Ozonanlage war eine halbtechnische Anlage mit einer Kapazität von bis zu 7 m³/h (OCS-GSO30, WEDECO, Herford, Germany). Die Anlage bringt das Ozon mittels eines Diffusers entgegen der Fließrichtung in einen Blasensäulenreaktor ein. Nach der Blasensäule folgt ein weiteres Kompartiment ohne Ozoneintragung, um eine ausreichende Kontakt- und Reaktionszeit des Ozons zu gewährleisten. Die durchschnittliche Verweilzeit des

Wassers im Ozon-Kontaktreaktor betrug im Normalbetrieb 8 Minuten und die zugeführte Ozonmenge lag bei 1 g Ozon/g DOC. Am Tag der Probenahme wurde die Ozonanlage in Betrieb genommen und die Konzentration manuell in Bezug auf den DOC des jeweiligen Zulaufs eingestellt. Die Probenahme erfolgte direkt im Anschluss an den Ozon-Kontaktreaktor über ein Probenahmeventil in gereinigten, sterilen Gefäßen.

2.1.2.3. UV-Bestrahlung

Die UV-Behandlung erfolgte durch einen Parallelstrahler mit einer Niederdruck Quecksilberlampe (254 nm Wellenlänge/Typ NLR2036, Xylem Services GmbH, Herford, Germany) im Labormaßstab direkt auf dem Gelände der Kläranlage. Die mit UV zu behandelnden Wasserproben wurden in gereinigten Gefäßen gesammelt und im Anschluss mit 400 J/m² bzw. 600J/m² in 1 L Batch-Verfahren für 1 Sekunde bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte in einem kontinuierlich durchmischten Glasgefäß mit einem Wasserstand von 5 cm.

2.1.2.4. Ultrafiltration

Die untersuchten Ultrafiltrationsanlagen waren im halbtechnischen Maßstab auf dem Gelände der Kläranlage stationiert. Beide Anlagen basierten auf der Technik des Hohlfasermoduls als Kapillarmodul und verwendeten organische Membranen. Ultrafiltrationsanlage 1 wurde von INGE GmbH, Greifenberg, Germany gestellt und Ultrafiltrationsanlage 2 von MICRODYN-NADIR GmbH, Wiesbaden, Germany.

Die Ultrafiltration 1 verfügte über eine Membranoberfläche von 80 m² mit einem Porendurchmesser von 20 nm und wurde im inside/out-Modus betrieben. Der durchschnittliche Durchflussrate (Flux) lag bei einem Betriebsdruck <1 bar bei 70 L/m²h. Die Ultrafiltrationseinheit 2 wurde im outside/in Modus betrieben, verfügte über eine Porengröße von 25 nm. Die Anlage wurde bei einem Betriebsdruck <1 bar mit einem Flux von 35 L/m²h betrieben. Die Rückspülung beider Einheiten zur Reinigung der Membran und zur Vermeidung von Fouling erfolgte mit Wasser und Wasser/Luft Gemisch alle 20 Min. Beide Ultrafiltrationseinheiten verfügten über einen Vorfilter mit einer Porengröße von 400 µm.

Zusätzlich wurde vor Inbetriebnahme der Pilotanlage eine chemische Reinigung mit 30 % Natronlauge, 5 % Natriumhypochlorid und 30 % Salzsäure durchgeführt, um in verstärkter Weise ein Fouling an den Membranen zu entfernen. Die Anlagen wurden einen Tag vor den Probenahmen in Betrieb genommen.

2.1.2.5. Abänderung der Prozessparameter von Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Betriebsparametern von Ozonkonzentration, Verweilzeit sowie UV-Dosis im Normalbetrieb wurde die Wirkung der Kombination von Ozon und UV mit abgeänderten Parametern überprüft. Die Ozonkonzentrationen wurde von 1 g/g DOC auf 1,5 bzw. 2 g Ozon/g DOC erhöht und jeweils mit 0, 400 und 600 J/m² UV bestrahlt. Weiterhin wurde bei einer Ozonkonzentration von 1 g Ozon/g DOC die Verweilzeit im Ozon-Kontaktreaktor von 8 Minuten auf 30 Minuten und auf 60 Minuten verlängert. Auch hier erfolgte eine nachgeschaltete, optionale UV-Bestrahlung mit 400 J/m². Alle Versuche mit dieser erweiterten Kombination wurden sowohl mit dem Ablauf des Nachklärbeckens als auch mit dem Ablauf des Sedimentationsbeckens des Aktivkohlekontaktreaktors als Zulauf durchgeführt.

Der Betriebsparameter Flux der Ultrafiltration wurde ebenfalls in weiterführenden Versuchen verändert. Die Ultrafiltration 1 wurde mit Fluxraten von 12,5 L/m²h, 50 L/m²h und 90 L/m²h anstatt 70 L/m²h und die Ultrafiltration 2 anstatt mit 35 L/m²h mit 12,5 L/m²h und 50 L/m²h betrieben. Baulich bedingt konnte die Ultrafiltration 2 nicht mit 90 L/m²h betrieben werden. Beide Ultrafiltrationseinheiten wurden neben dem Ablauf des Nachklärbeckens, auch mit dem Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung betrieben.

Ein Überblick über alle untersuchten Parametereinstellungen ist in Abbildung 5 zusammengefasst.

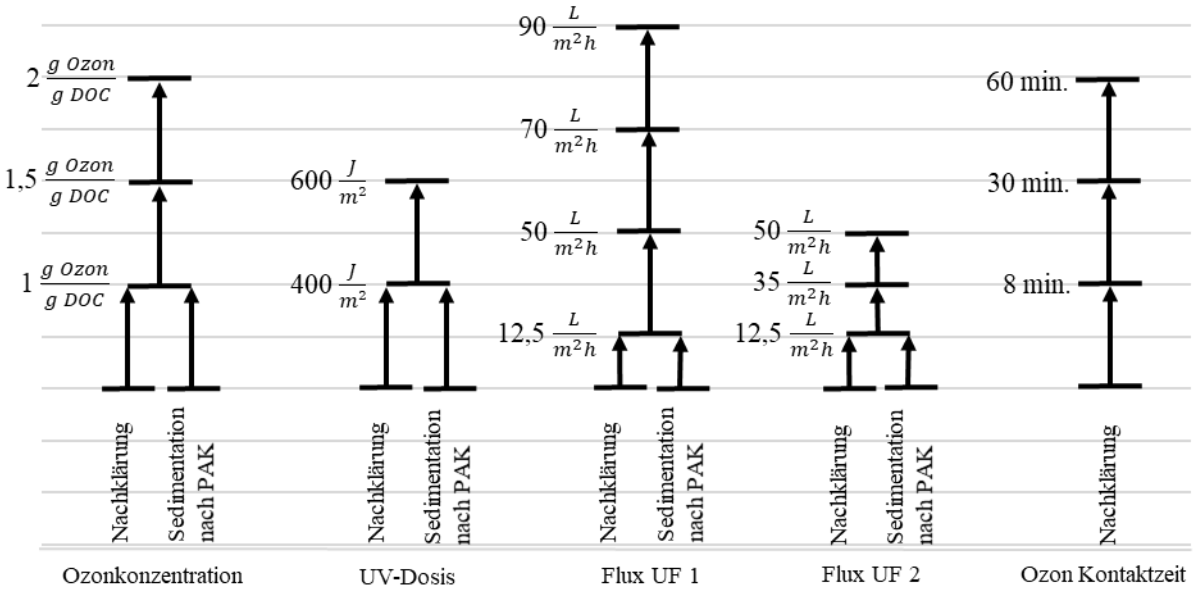

Abbildung 5: Überblick über die untersuchten Parametereinstellungen der unterschiedlichen Abwasserbehandlungsverfahren.

2.1.3 Ablauf der Probenahmen

Der allgemeine Ablauf der Untersuchungen nach der Probenahme ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Grundsätzlich wird zwischen molekularbiologischen und mikrobiologischen Untersuchungen, mit jeweils anderen Methoden Probenaufarbeitung, unterschieden. Weiterhin kann zwischen Probenaufarbeitung vor Ort im Labor am Klärwerk und Probenaufarbeitung und Analysen im Labor des KIT unterschieden werden. Um eine Änderung der Biozönose der Proben während des Transportes vom Klärwerk zum Labor zu vermeiden, wurden alle Proben bereits vor Ort am Klärwerk vorbehandelt (siehe Abbildung 6).

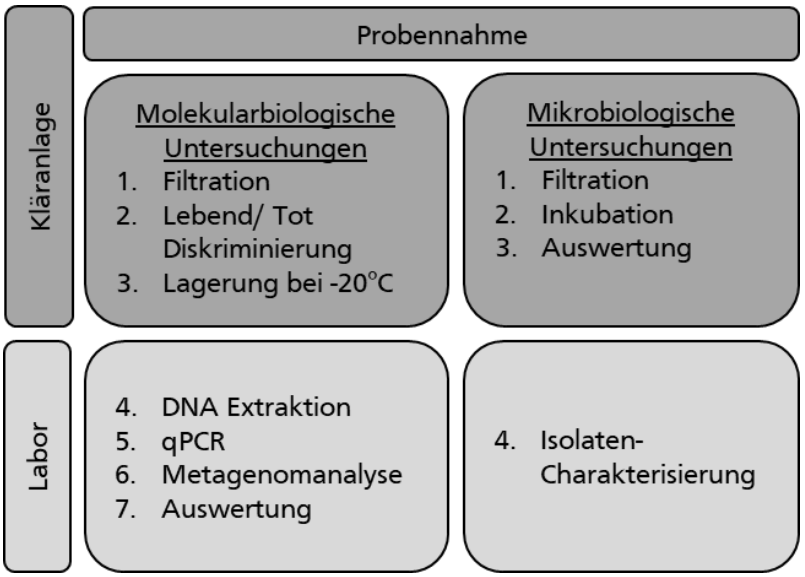

Abbildung 6: Überblick der Versuchsabläufe und Durchführungsort der entsprechenden Methoden.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden Stichproben vor Ort am Klärwerk durch eine Polycarbonat-Membran (0,2 µm, Whatman PC MB 47mm, VWR, Bruchsal, Deutschland) filtriert. Das filtrierte Volumen variierte abhängig von dem Anteil an suspendierten Stoffen in der Probe und lag zwischen 50 mL für den Zulauf der biologischen Klärung und bis zu 10 L für den Ablauf der Ultrafiltration. Das Wasser jeder Probenahme und -stelle wurde als Triplikat durch Polycarbonat-Membranen filtriert und die Triplikate getrennt weiterbehandelt. Die beladenen Membranen wurden anschließend einer Propidium Monoazid-Behandlung (PMA) unterzogen (BLU-V viability PMA-Kit, Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland), um freie DNA sowie DNA von beschädigten Bakterien, welche sich auf der Membran befanden, zu komplexieren und damit für eine nachfolgende PCR-analyse zu blockieren (siehe Kapitel 2.1.5). Die behandelten Membranen wurden anschließend bei -20°C zum Transport in das Labor am KIT gelagert. Dort erfolgte eine mechanische Extraktion der genomischen DNA aus der filtrierten Gesamtpopulation (Fast DNA™ Spin Kit for Soil und FASTPREP® Instrument, MP Biomedicals, Santa Ana, CA). Die DNA-Extrakte der drei Membranen einer Probenahmestelle wurden nach DNA-Extraktion vereinigt und im Folgenden als Ausgangsmaterial für molekularbiologische Nachweismethoden (qPCR, Metagenomsequenzierung) verwendet.

Die mikrobiologischen Untersuchungen über Kulturverfahren erfolgten ausschließlich am Ort der Probenahme im Labor des Klärwerks. Drei unterschiedliche Probenvolumen wurden jeweils durch eine Nitrozellulose-Membran (0,45 µm; GE Healthcare Life sciences, Solingen, Deutschland) filtriert und anschließend auf den entsprechenden Selektivnährboden überführt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit jedes Selektivagars, wurden die entstandenen Kolonien mit der spezifischen Morphologie ausgezählt (siehe Kapitel 2.3).

2.1.4 Umfang der Probenahmen am Untersuchungsfeld für Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung

Für die Untersuchungen im Zeitraum von Herbst 2016 bis Sommer 2018 fanden insgesamt 10 unabhängige Probenahmeperioden am Klärwerk statt. Die einzelnen Probenahmen lassen sich in unterschiedliche Probenkampagnen zusammenfassen und fanden als Stichproben statt. Die Anzahl der Probenahmen bei jeder Probenkampagne ist Tabelle 3 zu entnehmen. Während der

Probenkampagne „Weitergehende Abwasserbehandlungsverfahren“ wurde im Normalbetrieb der Ablauf des Nachklärbeckens als Zulauf zu den erweiterten Verfahrensprozessen sowie deren Ablauf (Ozonbehandlung, UV-Bestrahlung, sequentielle Ozon-UV-Behandlung Aktivkohle mit nachgeschalteter Sandfiltration, Ultrafiltration1 und Ultrafiltration 2) beprobt. Die Probenkampagne der „Erweiterte Ozon-UV Kombination“ enthielt Probenahmen mit erhöhter Ozon- und UV-Konzentration (1,5 und 2 g Ozon/g DOC und 600 J/m² UV). Die Probenkampagne „Verweilzeitänderung Ozonbehandlung“ fasst Probenahmen zusammen, bei welchen die Verweilzeit von Ozon auf 30 bzw. 60 Minuten verlängert wurde. Die Probenkampagne, der „Fluxvariation“ erfasst die Probenahmen an denen die Fluxraten (12,5, 50, 90 L/m²h) der Ultrafiltration verändert wurden (vgl. Kapitel 2.1.2).

Tabelle 3: Anzahl an Probenahmen während der unterschiedlichen Probenkampagnen.

Probenkampagne	Zulauf	Anzahl der Probenahmeperioden
Weitergehende Abwasserbehandlungsverfahren	Nachklärung	4
Erweiterte Ozon-UV Kombination	Nachklärung	3
	Sedimentationsbecken der Aktivkohlebehandlung	2
Verweilzeitänderung Ozonbehandlung	Nachklärung	3
Fluxvariation der Ultrafiltration	Nachklärung	2
	Sedimentationsbecken der Aktivkohlebehandlung	2

Die Probenkampagnen der weitergehenden Abwasserbehandlungsverfahren sowie der Fluxvariation fanden nach Daten des Deutschen Wetterdienstes (DWD) bei Trockenwetter (0 L/m² Niederschlag) statt. Die Probenkampagnen der erweiterten Ozon/UV Kombination und der Verweilzeitänderung der Ozonbehandlung fanden bei geringem Niederschlag von 0,1-0,4 L/m² statt. Bei allen Probenahmen wurde neben der eigentlichen Probe parallel und im selben Zeitraum (1h) eine Referenzprobe des Zulaufes (Ablauf Nachklärung oder adsorptive Reinigung) des untersuchten Verfahrens als Bezugsgröße gezogen.

2.1.5 PMA-Behandlung und DNA-Extraktion

Direkt im Anschluss an die Probenahme und Filtration erfolgte eine PMA-Behandlung nach Jäger et al. zur Komplexierung freier DNA (Jager et al. 2018a). PMA ist eine zweifach positiv geladene Substanz und kann deshalb nicht in Zellen mit einer intaktem Membranpotential eindringen. In tote bzw. membrangeschädigte Zellen dringt PMA jedoch ein und lagert sich in die DNA ein. Durch Bestrahlung mit Licht von einer Wellenlänge von 464 nm bildet sich eine kovalente Bindung zwischen dem PMA und der DNA aus. DNA, die auf diese Weise modifiziert ist, steht für nachfolgende molekularbiologische Analysen nicht mehr zur Verfügung (vgl. Abbildung 7).

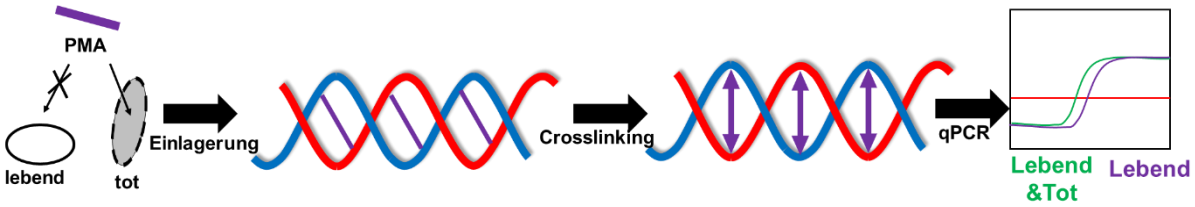

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Wirkprinzips von PMA. PMA gelangt durch geschädigte Zellmembran in eine Zelle, interkaliert in der DNA und erzeugt nach einem UV-induzierten Quervernetzung kovalente Bindungen, welche die DNA für nachfolgende PCR-Reaktionen blockiert. Abbildung nach Jäger et. al. (2018a).

Die PMA-Behandlung erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Filtration der Probe durch die Polycarbonatmembran. Erst nach Komplexierung der DNA toter Bakterien wurde die Probe für den Transport bei -20° C eingelagert. Die beladene Polycarbonatmembran wurde in ein UV-durchlässiges Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µL 25 µM PMA vollständig benetzt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei 4° C im Dunkeln erfolgt anschließend das Crosslinking mittels 15-minütiger Bestrahlung (PhastBlue Aktivator). Da die Lebend/Tod Diskriminierung mit PMA auf der Veränderung des Membranpotentials bzw. Schädigung der Membran beruht, ist sie bei Desinfektionsmethoden wie UV-Bestrahlung, welche die Membranen nicht direkt beeinflusst, nicht zwingend erforderlich. (Nocker et al. 2007).

Die Extraktion der metagenomischen DNA geschah mittels eines optimierten Protokolls des Fast DNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) und FASTPREP® Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, USA). Die Extraktion basiert auf dem mechanischen Aufschließen der Zellen durch Glas- und Keramik-Kugeln. Ein anschließendes Fällen und Abzentrifugieren von Proteinen sowie einer abschließenden Aufreinigung der DNA über das Binden an eine Silicia-Matrix fand im Anschluss statt. Als finaler Schritt wurde die DNA mit Wasser aus der Silicia-Matrix eluiert. Das vollständige, angepasste Protokoll zur DNA-Extraktion ist in Anhang 7.1 aufgeführt.

2.1.5.1. Bestimmung der DNA-Konzentration

Im Anschluss der DNA-Extraktion wurde die DNA-Konzentration im Eluat mittels des Quibit®Fluorometers durchgeführt (Qubit 4, Thermofischer Scientific, Waltham, USA). Mit dem verwendeten Qubit® dsDNA High Sensitivity Assay können mittels eines interkalierenden Farbstoffes DNA-Konzentrationen ≤ 0,01 ng/µL detektiert werden. Hierbei wird die resultierende Fluoreszenz bei 502 nm/532 nm detektiert und mittels einer 2-Punkt Kalibrierung ausgewertet. Dieses Verfahren mittels interkalierenden Fluorophor hat gegenüber der DNA-Konzentration Bestimmung durch UV den Vorteil, dass die Bestimmung weniger anfällig gegenüber Proteinverunreinigungen ist. Dies ist besonders bei einer stark diversen Ursprungsmatrix der Probe wie das verwendete Abwasser vorteilhaft.

2.2 Nachweis fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene

2.2.1 Untersuchte Parameter

Repräsentativ für fakultativ pathogene Bakterien wurden sechs Vertreter dieser Bakteriengruppe ausgewählt: Enterokokken spp., *Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii* und *Escherichia coli*. Hierbei

handelt es sich zum überwiegenden Teil um die Erreger, welche als ESKAPE-Gruppe von der WHO gelistet sind (siehe Kapitel 1.2.3) und einen signifikanten Anteil an klinischen Infektionen tragen (vgl. Tabelle 4) (Aghdassi et al. 2016).

Tabelle 4: Klinische Relevanz der untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien und deren prozentualer Anteil an den klinischen Infektionen im Jahr 2016 nach Daten des Nationalen Referenzzentrum für die Überwachung von nosokomialen Infektionen (Aghdassi et al. 2016).

fakultativ pathogene Bakterien	Relevanz
Enterokokken	14,3 % aller klinischen Infektionen
E. faecalis	6,9 % aller klinischen Infektionen
P. aeruginosa	5,8 % aller klinischen Infektionen
K. pneumoniae	4,5 % aller klinischen Infektionen
A. baumannii	5 % aller klinischen Infektionen
E. coli	16,6 % aller klinischen Infektionen

Enterokokken sind ein gängiger Indikator für fäkale Kontaminationen in wasserführenden Systemen. Die Gram-positiven Erreger sind vor allem für Harnwegs-, sowie Wundinfektionen verantwortlich (Aghdassi et al. 2016).

Insbesondere *E. faecalis* ist widerstandsfähig gegenüber Flächendesinfektionen und kann bis zu 30 Monate auf Oberflächen überdauern. Er ist für 23 % aller postoperativen Wundinfektionen verantwortlich (Bundesgesundheitsbl. 2018).

P. aeruginosa ist ein aquatisches fakultativ pathogenes, Gram-negatives Bakterium, das im besonderen Maße fähig ist, Biofilme zu bilden. Dadurch ist dieses Bakterium nur schwerlich aus kontaminierten Systemen zu entfernen, da Biofilme ein hohes Resistenzpotential gegenüber Desinfektion haben. Des Weiteren wurden bei ihm eine hohe Antibiotika-Resistenzlage gegen Carbapeneme, Aminoglycoside und Polymyxinen gefunden, was häufig zu Multiresistenzen führt (Lepper et al. 2002, Neuhauser et al. 2003).

Das Gram-negative *K. pneumoniae* bildet generell sehr schnell neue Resistenzen aus und gibt diese über den horizontalen Gentransfer an bisher sensible Bakterien weiter. So wurde die erste nachgewiesene Quelle von Plasmid assoziierten Carbapenemasen in einem *K. pneumoniae*-Stamm isoliert (Hassani 2014, Walsh 2010).

Infektionen mit dem ebenfalls Gram-negativen Bakterium *A. baumannii* haben in den letzten Jahren eine steigende Mortalität aufgezeigt. Der Erreger ist durch Dauerformen sehr widerstandsfähig gegen die gängigen Sterilisationsverfahren. Seit 2008 sind vereinzelt erste Infektionen mit Pan-resistenten *A. baumannii*-Stämmen beobachtet worden (Eliopoulos et al. 2008).

E. coli wird in vielen Bereichen als Gram-negativer Indikator bakterieller Verunreinigungen verwendet. Dieses Bakterium hat vor allem im Klinikbereich eine hohes Risikopotential durch die hohe Abundanz von Extended Spektrum β-Lactamasen (ESBL) und ist daher als kritisch zu bewerten.

Um die Antibiotikaresistenzlage zu erfassen, wurden insgesamt 13 unterschiedliche Antibiotikaresistenzgene sowie ein mobiles genetisches Element ausgewählt. Die Auswahl der

Resistenzgene basiert auf korrespondierenden Antibiotikaklassen mit überwiegend klinischer Relevanz oder aufgrund ihrer nachgewiesenen Abundanz zur Ermittlung von Reduktionen mikrobieller Kontaminanten der eingesetzten erweiterten Technologien am Klärwerk (vgl. Kapitel 1.2.1). Die Resistenzgene und deren assoziierten Antibiotikaklassen sind in Tabelle 5 gelistet.

Tabelle 5: Auswahl der untersuchten Antibiotikaresistenzgene und deren Antibiotikaklasse der vermittelten Resistenz.

Resistenzgen	Betreffende Antibiotikaklasse
*erm*B	Makrolid Antibiotika, Erythromycin
*int*I1	Integron Typ 1 mobiles genetisches Element
*tet*M	Tetracykline
*bla*TEM	Penicilline
*sul*1	Sulfonamide
*bla*CTX-M	Cephalosporin der 2. Generation
*bla*CTX-M-32	Cephalosporin der 2. Generation
*bla*Oxa-48	Carbapeneme
*bla*CMY-2	Cephalosporin der 2. Generation
*bla*VIM	Carbapeneme, Imipenem
*van*A	Glykopeptide, Vancomycin
*mec*A	Penicilline, Methicillin
mcr-1	Zyklisches Peptid, Colistin
*bla*NDM	Vielzahl von Lactam-Antibiotika, Carbapeneme

Die große Gruppe an Resistenzen gegen β-Lactam Antibiotika wird unter anderem durch *bla*TEM repräsentiert. Das Gen kommt vor allem in *E. coli* und *K. pneumoniae* vor. Es verursacht ca. 90 % aller beobachteten Ampicillinresistenzen in *E. coli* und gilt als Vorläufer von β-Lactamasen mit erweitertem Wirkspektrum (ESBL) (Emery und Weymouth 1997). *bla*CTX-M sowie *bla*CTX-M-32 sind die weltweit am häufigsten nachgewiesenen Resistenztypen von ESBL produzierenden Bakterien. Eine besondere Rolle bei den β-Lactam Antibiotika hat die Klasse der Carbapeneme, da diese bisher noch gegen ESBL resistente Erreger wirken. Obwohl das *bla*CMY-2 Gen hauptsächlich Resistenzen gegen Cephalosporine der 2. Generation vermittelt, so vermittelt das auf einem Plasmid gelegene Gen ebenfalls eine niedrigschwellige Resistenz gegen Carbapeneme (Bauernfeind et al. 1996). Eine Resistenz gegen das Carbapenem Imipenem wird durch das mobile Resistenzgen *bla*VIM hervorgerufen. Das Gen ist bei *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* bereits weit verbreitet, liegt auf dem Transposon Tn402 und ist somit genetisch hoch mobil. Ebenfalls Plasmid-lokalisiert ist das Resistenzgen *bla*Oxa-48, welches neben Resistenzen gegen Carbapeneme auch Resistenzen gegen Cephalosporine vermittelt ist (Poirel et al. 2012). Als weitere, besondere kritisch zu bewertendes Resistenzgen ist das *bla*NDM Gen ausgewählt. Dieses Gen ist auf einem mobilen codierenden Plasmid lokalisiert, welches unter anderem auch Resistenzgene gegen eine

Vielzahl von β-Lactam Antibiotika kodiert. Dadurch wird die Behandlung klinischer Infektionen weiterhin erschwert (Nordmann et al. 2011).

Neben den in der Humanmedizin weit verbreiteten Resistenzen wurden auch noch das MRSA assoziierte *mec*A Gen von *Staphylococcus aureus* sowie das Resistenzgen gegen Glykopeptid-Antibiotika v*an*A in Enterokokken und das 2015 erstmals beschriebene mobile *mcr*-1 Gen, welches eine Resistenz gegen das zyklische Peptid Polymyxin (Colistin, ein Reserveantibiotikum) vermittelt, untersucht (Skov und Monnet 2016).

Repräsentativ für Resistenzen gegen auch in der Veterinärmedizin genutzten Antibiotika wurden die Resistenzgene *sul*1 und *tetM* als Parameter ausgewählt. Insbesondere von Tetrazyklin ist bekannt, dass es als relativ altes Breitbandantibiotikum immer noch in relevanten Konzentrationen im Zulauf von Kläranlagen nachgewiesen werden kann (Gao et al. 2012).

Eine Sonderstellung in der Liste hat das Integrase-Gen des Klasse 1 Integrons (*int*I1), da dieses Gen keine direkte Antibiotikaresistenzen vermittelt, sondern ein verbreitetes mobiles genetisches Element darstellt, welches eine Vielzahl unterschiedlicher Antibiotikaresistenzen inkorporieren und innerhalb verschiedener Bakterienspezies transferieren kann (Soledad Ramírez et al. 2009, Xia et al. 2013).

2.2.2 Molekularbiologische Quantifizierung

Die Abundanzen der untersuchten Gene wurden mittels der quantitative-Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) bestimmt, die es erlaubt eine quantitative Analyse spezifischer Gene oder DNA-Abschnitte einer Probe durchzuführen. Durch einen interkalierenden Fluorophor, welcher mit der amplifizierten Doppelstrang-DNA nach jedem DNA-Amplifizierungsschritt interagiert, wird ein messbares Fluoreszenzsignal erzeugt, welches proportional zur Menge der gebildeten doppelsträngigen DNA ist. In dieser Arbeit wurde der Mastermix „Maxima“ von Thermo Fischer (Waltham, USA) für die qPCR verwendet, der das Fluorophor SYBR Green enthält.

Der SYBR Green Farbstoff emittiert nach einer Anregung mit 500 nm bei 520 nm. Ein Vorteil dieser Methode ist ihre einfache Handhabung und vielfältige Anwendung. Da der Farbstoff in die doppelsträngige DNA interkaliert, kann er in allen qPCR-Reaktionen und mit unterschiedlichen Amplikons, angewandt werden. Diese Eigenschaft ist jedoch auch eine relevante Limitierung. Auch Produkte eines Primermissmatches oder Nebenprodukte, wie eventuell auftretende Primerdimere, ermöglichen eine Interkalation des Farbstoffs und erzeugen somit ein Signal, welches nicht von dem Signal des zu detektierenden Gens zu unterscheiden ist. Um das Risiko einer falsch-positiven Detektion zu minimieren, wurde direkt im Anschluss an die qPCR–Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Während dieser Analyse wird der gesamte PCR–Reaktionsmix inklusive der amplifizierten DNA schrittweise in 0,5° C Abständen von 65° C auf 95° C erhitzt. Dies führt zur schrittweisen Auftrennung des DNA Doppelstrangs der Amplikons und damit auch zur proportionalen Abnahme des Fluoreszenzsignals. Um das Verhalten unterschiedlicher Fragmente während der Schmelzkurvenanalyse zu vergleichen, wurde die Schmelztemperatur T_M als Kennzahl verwendet. Die Schmelztemperatur ist definiert als die Temperatur, bei welcher die DNA zu 50% als Einzelstrang vorliegt. Diese ist abhängig von der Länge des DNA-Fragments sowie deren Basenzusammensetzung. Guanin und Cytosin haben jeweils drei Wasserstoffbrückenbindungen und Adenin sowie Thymin lediglich zwei. Dies resultiert darin,

dass Fragmente mit einem höheren Anteil an Guanin und Cytosin eine höhere Schmelztemperatur haben als solche mit einem höheren Anteil an Adenin und Thymin.

In dieser Arbeit wurden alle qPCR mit einem CFX real-time System von Biorad (München, Deutschland) durchgeführt. Der Reaktionsansatz für eine Reaktion setzt sich aus 10 µL Maxima SYBR Green Mastermix (Thermo Fisher, Waltham, USA), jeweils 0,8µL einer 5µM Stammlösung der Primer (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland), 7,2 µL PCR-Wasser. Der Maxima Mastermix enthält die Polymerase, alle benötigten dNTPs sowie einen 2x konzentrierten Puffer. 19 µL des vorbereiteten Reaktionsansatzes wurden in jede Reaktionskammer einer 96-Well Platte überführt und 1 µL der extrahierten DNA im Anschluss zugegeben. Für die Detektion der Imipenemresistenz, die über das Gen *bla*VIM vermittelt wird, konnte kein Detektionssystem mit dem Maxima Mastermix etabliert werden, sodass zur Detektion dieses Gens eine sondenbasierte PCR durchgeführt werden musste. Der entsprechende Mastermix hatte eine abweichende Zusammensetzung. Dazu wurde für jede Reaktion 10 µL Polymerasen-Mastermix (Taq-Man universal PCR Mastermix, applied biosystems, USA), 0,4 µL einer 5 µM FAM-markierten Sonde (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland), jeweils 0,6 µL der 5 µM Primer (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland), 7,4 µL PCR-Wasser und 1 µL der Probe verwendet. Das gesamte Reaktionsvolumen einer Sonden-PCR-Reaktion betrug 20 µL.

Nach der Versiegelung der Platte mit Folie und dem Abzentrifugieren der Flüssigkeit auf den Boden des Reaktionsraumes wurde die Platte zur Durchführung des PCR- Temperaturprofils in einen Fluoreszenz -Thermocycler gegeben (siehe Tabelle 6). Lediglich zur Detektion des *bla*CMY-*2* Gens, welches eine Resistenz gegen Cephalosporine der 2. Generation vermittelt, musste die Temperatur des 1-minütigen Annealing- (Anlagerung der Primer) und Elongationschrittes (Erstellung des PCR-Produktes) auf 62°C erhöht werden.

Tabelle 6: Temperaturprofil der qPCR mit anschließendem Temperaturprofil zur Schmelzkurvenanalyse.

Zeit	Temperatur	
10min	95°C	
10 sec	95°C	39 Zyklen
60 sec	60°C	
	65°C	Erhöhung um 0,5°C alle 5 sec.
	95°C	

Die erhaltenen Daten wurden mit der CFX-Manager-Software der Firma BioRad ausgewertet. Der resultierende C_T-Wert ist definiert als die Anzahl der PCR-Zyklen ab welcher das Fluoreszenzsignal in exponentiellem Maße über das Grundrauschen (Basislinie) ansteigt. Die Anzahl der benötigten Zyklen ist bei konstanten Reaktionsbedingungen, lediglich abhängig von der Konzentration des Zielgens in der Probe. Hierbei gilt, je mehr Kopien des Zielgens in der Probe vorhanden sind, desto geringer ist der resultierende C_T Wert (vgl. Abbildung 8).

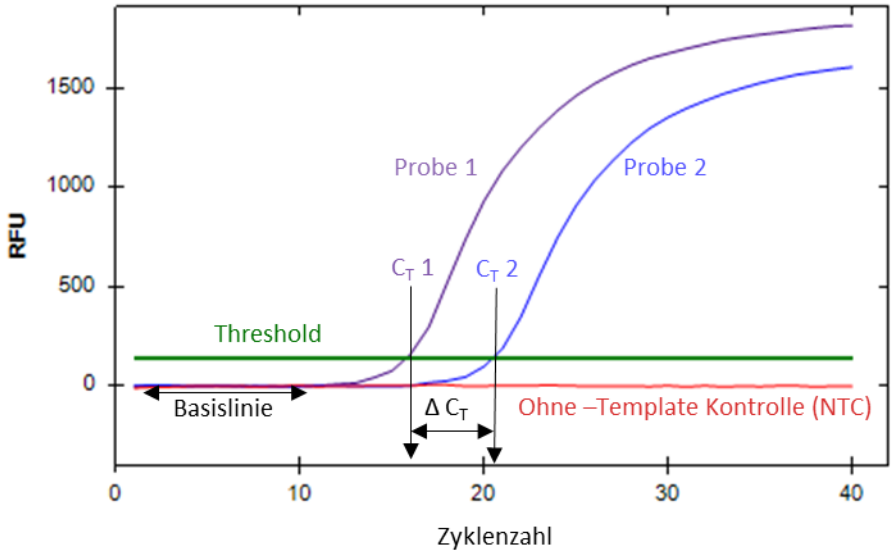

Abbildung 8: Prinzip der qPCR Quantifizierung. Die Fluoreszenzintensität (RFU) nimmt auf Grund der PCR-Amplifizierung mit jedem Zyklus fortlaufend zu. Sobald der Schwellenwert (Threshold) überschritten und signifikant über dem Hintergrundsignal liegt, wird der C_T Wert aufgezeichnet. Je größer der C_T Wert, umso geringer ist die Anzahl der Genkopien in der untersuchten Probe.

Die Etablierung von qPCR basierten Nachweisverfahren für klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene und fakultativ pathogene Bakterien ist ein wesentlicher Teil dieser Dissertation. Von daher ist die Auflistung der Nachweissysteme mit Primersequenzen und Effizienzwerten ein Teil des Ergebnisses (siehe Tabelle 8) und ist nicht in Material und Methoden eingefügt.

2.2.2.1. Kalibriergerade

Um aus einem C_T-Wert der qPCR die Anzahl an vorhandenen Zelläquivalente in der Ursprungsprobe zu kalkulieren, wurden Geradengleichungen mittels Kalibrierexperimenten der Antibiotikaresistenzgene und fakultativ pathogenen Bakterien mit Hilfe von ausgewählten Referenzbakterien erstellt (siehe Tabelle 8). Hierfür wurden die Referenzbakterien über Nacht in Nährmedien kultiviert und auf eine optische Dichte von 1,0 bei einer Wellenlänge von 600 nm verdünnt. Anschließend wurde die genomische DNA extrahiert, eine Verdünnungsreihe über insgesamt 7 Log-Stufen erstellt und die DNA-Konzentrationen mittels Qubit-Analyse bestimmt. Jede Verdünnungsreihe wurde anschließend mit den entsprechenden Primern und mit qPCR vermessen. Die resultierenden C_T-Werte wurden mithilfe der DNA-Konzentration, der durchschnittlichen Genomgröße, der Avogardo-Konstanten und dem durchschnittlichen Molekulargewicht der Basen mit folgender Formel einer definierten Anzahl an Zelläquivalente zugeordnet und einer halblogarithmischen Geradengleichung der Formel $F_{(x)}$=mx+n erstellt.

Formel 1: Formel zur Kalkulation der Anzahl von Zelläquivalente ausgehend von der durchschnittlichen Genomgröße und DNA-Gewichts.

$$\text{Zelläquivalente} = \frac{(DNA\ Menge\ [ng]) * 6{,}022 * 10^{23}}{(Durchschnittliche\ Genomgröße[bp]) *\ 10^{9} * 650}$$

Nach dieser Formel ist ein Zelläquivalent eine Zelle, welche eine vergleichbare Genomgröße hat, wie die Bakterienzellen, welche für die Generierung der Kalibriergeraden genutzt wurden (Referenzbakterien) und die das entsprechende taxonomische Marker-Gen bzw. das entsprechenden Antibiotikaresistenzgen tragen. Das Verwenden von Zelläquivalente ist nötig, da bei den untersuchten Proben nicht gewährleistet sein kann, dass das Zielgen nur in einer Spezies vorhanden ist, welche gleichzeitig als Referenzbakterien verwendet wurde. Dieser Ansatz wurde der direkten Gleichstellung von ausgezählter Zellzahl mit dem C_T-Wert der Kalibriergerade vorgezogen, um eventuell mehrfach vorliegende Kopien eines Gens im Referenzbakterium zu kompensieren.

Die Verwendung einer Kalibriergerade für mehrere unabhängige Messungen ist zwar ungenauer als die individuelle Erstellung einer neuen Kalibriergeraden für jede durchgeführte Messung, reduziert aber den Zeit- sowie Kostenaufwand um mehr als ein Viertel. Bei 20 molekularbiologischen Parametern und über 160 unabhängigen Proben (bei der Verwendung von technischen Triplikaten ca. 10.000 Einzelreaktionen) hätte eine zusätzliche Erstellung von individuellen Kalibriergeraden für jede 96-well Platte, zusätzlich zu den obligatorischen Kontrollen (Positiv und negativ-Kontrolle), die für dieses Projekt zur Verfügung stehenden Mittel überschritten.

Die Reproduzierbarkeit ist auch bei der Verwendung von Standartkalibriergeraden gegeben. Studien haben gezeigt, dass die Differenz bei der Verwendung von individuellen Kalibriergeraden gegenüber deren Wiederverwendung bei einer durchschnittlichen Abweichung von ca. 0,05 Log-Stufen liegt (Lai et al. 2005). Studien von Rocha et al. haben weiterhin erweisen, dass bei der angewandten Methodik die Abweichung der Quantifizierung von 16 S rRNA sogar zwischen unterschiedliche Arbeitsgruppen bei lediglich 3 – 8 % liegt (Rocha et al. 2018).

2.2.2.2. Auswertung der qPCR

Basierend auf den erhaltenen C_T-Werten der analysierten Proben wurde die tatsächliche Anzahl der Zelläquivalente mittels der Geradengleichung der Kalibrierkurven nach Formel 2 berechnet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass eine Quantifizierung lediglich im linearen Bereich der Kalibriergeraden möglich ist.

Formel 2: Gleichung zur Berechnung von Zelläquivalente je Reaktion einer qPCR. m: Steigung, n: y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden.

$$\text{I} \qquad \frac{Zelläquivalente}{Reaktion} = 10^{\frac{'CT-Wert'-n}{m}}$$

Nach dem Einbeziehen des eingesetzten Volumens der DNA Extraktion V_R, dem filtrierten Abwasservolumen V_A und dem Volumen nach DNA Extraktion V_E ergeben sich die Zelläquivalente/100 mL Wasserprobenvolumen (absolute Normierung) nach Formel 3.

Formel 3: Formeln zur Berechnung von Zelläquivalente/100 mL Probe ausgehend vom Ct-Wert der qPCR.

$$\text{II} \qquad \frac{Zelläquivalente}{\mu L\ Extraktionseluat} = 10^{\frac{'CT-Wert'-n}{m}} / V_R$$

$$\text{III} \qquad \frac{Zelläquivalente}{100\ mL\ Probe} = \frac{Zellequivalente * V_E}{V_A} * 100\ mL$$

2.3 Kultivierung auf Selektivnährböden

Zur Verifizierung, ob die durch molekularbiologische Methoden nachgewiesenen antibiotikaresistenten Bakterien lebend und aktiv sind, wurden zusätzliche kulturbasierte Untersuchungen durchgeführt.

Für den kulturbasierten Nachweis von fakultativ pathogenen Bakterien und resistenten Mikroorganismen wurden, abhängig von der zu erwarteten Kontaminationslage, drei unterschiedliche Volumina über eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm, GE Healthcare Life sciences, Solingen, Deutschland) filtriert und die Membran mit der beladenen Seite nach oben auf eine Agarplatte mit Selektivnährmedium überführt. Die verwendeten Selektivagarplatten zur Kultivierung einer Auswahl an hygienische relevanter Bakterien wurden zum Teil als Fertigplatten für *Acinetobacter* spp., Slanetz Bartley und Galle Äskulin Platten für intestinale Enterokokken sowie ESBL-, VRE- und MRSA-Selektive Platten (MAST Diagnostics, Reinfeld, Deutschland) und zum Teil selbst aus Fertigmedium angesetzt (mFC für *E. coli*/Coliforme, Sigma Aldrich, München, Deutschland und Cetrimid für Pseudomonaden, VWR, Darmstadt, Deutschland).

Die beladenen Platten wurden, soweit möglich, nach Herstellerangaben inkubiert und anschließend die koloniebildenden Einheiten (KBE) aller drei Platten pro Probenahme und Plattensystem ausgezählt. Bei den verwendeten Antibiotikaresistenzplatten für ESBL, MRSA und VRE musste nach ersten Vorversuchen die Inkubationstemperatur von 36° C auf 42° C erhöht werden, da auf den, ursprünglich für klinische Isolate konzipierten, kommerziellen Selektivplatten bei der Verwendung von Abwasser eine starke Begleitflora aus Bakterien auftrat, die oftmals die nachzuweisenden Bakterien überwachsen haben. Die Temperaturanhebung unterdrückt dieses unspezifische Wachstum, sodass eine Auswertung mit eingeschränkter Quantifizierung möglich wurde. Das Auftreten von unspezifischem Wachstum bei der Verwendung von Selektivplatten zur klinischen Analyse bei der Untersuchung von Abwässern ist eine bekannte Unzulänglichkeit der Selektivplatten (Müller et al. 2018, Savin et al. 2020).

Die bewachsenen Membranen der Slanetz Bartley Platten für Enterokokken wurden zusätzlich nach der Inkubation auf Galle Äskulin Platten zur genaueren Identifizierung der Zielorgansimen überführt. Nach einer erneuten kurzen Inkubation auf Galle Äskulin Agarplatten wurden die braun-schwarz färbenden Kolonien ausgezählt. Die einzelnen Inkubations-Parameter und die Morphologie der spezifischen Kolonien der einzelnen Systeme sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Verwendete Inkubationsparameter und Morphologie der gebildeten spezifischen Kolonien der mikrobiologischen Untersuchungen.

Nachgewiesene Organismen	Plattensystem	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur [°C]	Spezifische Kolonien
E. coli	mFC	24 h	37° C	Blau bis violett
Intestinale Enterokokken	Slanetz Barley	48 h	37° C	-
	Galle Äskulin	30 Min.	44° C	Schwarz
Pseudomonaden	Cetrimid	48 h	42° C	Blau/grün,
Acinetobacter spp.	CHROMagar™ Acinetobacter	48 h	37° C	Hellrot
ESBL-Erreger	CHROMagar™ ESBL	24 h	42° C	Dunkelpink bis lila, blau-türkis bis blau, bräunlich bis dunkelgelb, transparent bis gelb, weiß bis cremefarben
MRSA	CHROMagar™ MRSA	48 h	42° C	Rose bis malve
VRE	CHROMagar™ VRE	48 h	42° C	Pink bis malve

Die resultierenden spezifischen koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden auf 100 mL normiert und im Anschluss der Mittelwert der drei Verdünnungen gebildet.

Aufgrund der von den Vorgaben der Plattenhersteller abweichenden Inkubationsbedingungen der Resistenzselektivplatten, wurden zur Überprüfung der Selektivität der Resistenzplatten einzelne Isolate weitergehend typisiert und analysiert.

Zur Generierung einzelner Isolate wurden von den inkubierten Nitrocellulose-Membranen der Antibiotikaresistenz-selektiven Platten (ESBL-, VRE-und MRSA-selektiven Platten) insgesamt 40 einzelne Kolonien aufgenommen und auf Blutagar-Platten isoliert. Diese Isolate wurden anschließend vom Projektpartner an der Universitätsklinik Bonn via MALDI-TOF genauer typisiert. Von fakultativ pathogenen Bakterien dieser ursprünglich 40 Isolate wurde im Anschluss, ebenfalls vom Projektpartner an der Universitätsklink Bonn, ein Antibiogramm angefertigt

2.4 Metagenomanalyse

Genomische-DNA aus dem zurückgehaltenen biologischen Material beider Ultrafiltrationseinheiten (Retentat) wurden von Eurofins GATC Biotech GmbH (München, Deutschland) im Auftrag auf taxonomischer und funktioneller Ebene sequenziert (Metagenom-Analyse) und mit einer mikrobiologischen Virulenz-Datenbank (MvirDB) sowie dem Integrated Reference Catalogue (IGC) abgeglichen (Langmead et al. 2009, Li et al. 2014,

Zhou et al. 2007). Eine taxonomische Klassifizierung der Population erfolgte mittels der „Kraken“ und „Mikrokraken“ Datenbank (Wood und Salzberg 2014).

Die durchgeführte Sequenzierung der Retentate ergab 22.545.798 Reads für Ultrafiltration 1 und 23.480.814 Reads für Ultrafiltration 2. Hiervon konnten für 3.387 (0,02 %) bzw. 3.428 (0,01 %) erfolgreiche Abgleiche in der MvirDb Datenbank erzielt werden und 173.487 (0,77 %) Reads von Ultrafiltration 1 und 153.226 (0,65 %) Reads von Ultrafiltration 2 wurden erfolgreich mit Einträgen des IGC abgeglichen. Ein taxonomischer Abgleich ergab 739.418 (3,28 %) klassifizierte Reads für Ultrafiltration 1 und 596.486 Reads (2,52 %) für Ultrafiltration 2.

Die Rohsequenzen können als „*.fastq“ Datei in der NCBI Datenbank mit der Bioprojekt Nummer PRJNA524456 abgerufen werden.

2.5 Auswertung und Statistik

Zur Erhebung der Abundanz eines Parameters in einer Probe wurden die qPCR-Untersuchungen mindestens als Duplikat (z.T. als Triplikat) durchgeführt. Der Mittelwert der ermittelten C_T-Werte wurde anschließend verwendet, um unter Berücksichtigung der Kalibriergeraden die Zelläquivalente in 100 mL Wasser zu kalkulieren.

2.5.1 Signifikanz und Varianz

Die Signifikanz der Änderungen der Konzentrationen von Antibiotikaresistenzgenen und fakultativ pathogenen Bakterien wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des nicht-parametrischen, einseitigen Mann-Whitney-U Tests durchgeführt. Dieser wurde dem verbreiteterem t-Test vorgezogen, da die Anzahl der Probenahmen der einzelnen Probenkampagnen zu gering war, um die für den t-Test geforderte Normalverteilung zu belegen.

Zur Beschreibung der Streuung der einzelnen Probenahmen wurde die Standardabweichung des Mittelwertes ($S_{\bar{X}}$) nach Formel 4 verwendet.

Formel 4: Formel zur Berechnung der Standardabweichung des Mittelwerts ($S_{\bar{X}}$).

$$S_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} \quad (n \geq 2)$$

2.5.2 Verwendete Darstellung in Diagrammen

Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurden mehrere Arten von Diagrammen verwendet:

Zur vergleichenden Darstellung der Einzelparameter im Zulauf als auch im Ablauf wurde eine kombinierte Darstellung von Balken und Säulendiagramm verwendet. Blaue Balken zeigen die Abundanz des entsprechenden Gens im Zulauf vor der erweiterten Abwasserbehandlung und die Säule nach entsprechender Behandlung. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Für die gleichzeitige Darstellung mehrerer Parameter wurde ein Punktwolkendiagramm verwendet. Die Abundanzen der einzelnen Parameter sind als farbige Punkte dargestellt und der Mittelwert des Clusters als blauer Balken in der Punktwolke.

3 Ergebnisse und Diskussion

Es wurden zunächst 7 Kläranlagen mit unterschiedlichen Einflussgebieten und Größenordnungen hinsichtlich ihrer Reduktion von ausgewählten fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen untersucht, um einen Überblick über die mikrobielle Belastungssituation an kommunalen konventionell betriebenen Kläranlagen zu erlangen. Die Auswirkung unterschiedlicher weiterführender Abwasserbehandlungsmethoden auf die Reduktion fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen wurde im Anschluss an einer kommunalen großtechnischen Kläranlage untersucht. Hier wurde eine Ozonbehandlung sowie zwei unterschiedliche Ultrafiltrationseinheiten im halb-technischen Maßstab (Pilotanlage) installiert und betrieben. Zusätzlich erfolgte direkt auf dem Gelände der Kläranlage eine UV-Behandlungen im Labormaßstab (1 L Batch-Verfahren). Die untersuchte adsorptive Reinigung mittels pulverisierter Aktivkohle und Sandfiltration konnte wiederum im großtechnischen Maßstab untersucht werden. Obwohl die Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen der einzelnen Verfahren von einer Vielzahl unterschiedlicher Parameter abhängig ist, konnten die Untersuchungen erfolgreich mit realem Abwasser durchgeführt werden. Die entwickelte Herangehensweise mit entsprechend optimierten Protokollen kann zwar zwischen den einzelnen Probenahmen hinsichtlich der genauen abwasserspezifischen Parameter variieren, erlaubt aber eine Abschätzung der Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im realen Betrieb und den dazugehörigen Schwankungen in Bezug auf die Zusammensetzung des Abwassers.

3.1 Validierung der molekularbiologischen Detektionssysteme

Nach der Optimierung der Parameter und Kontrolle der Spezifität durch Überprüfung der Amplikongröße des PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse, wurden die Kalibriergeraden mit Hilfe der entsprechenden Kontrollorganismen, d.s. fakultativ pathogenen Bakterien und Trägerorganismen der ausgewählten Antibiotikaresistenzgene, erstellt. Die einzelnen Kalibriergeraden sowie deren Schmelzkurvenanalysen sind im Anhang 7.2 abgebildet. Des Weiteren sind alle verwendeten Primersequenzen, Gleichungen der Kalibriergeraden, spezifische Amplikongrößen, Effizienzen sowie Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden, Detektionslimits und verwendeter Referenzstämme in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Liste aller verwendeten Primer mit Sequenzen, Geradengleichungen der Kalibrierung, Amplikongrößen, Effizienzen der Amplifikation, Korrelationkoeffizient der Kalibriergeraden (R^2), Detektionslimits (LOD), Angaben zu Kontrollstämmen und Referenzliteratur.

Target	Primersequenz	Gleichung der Kalibriergeraden	Amplikon-größe	Effizienz	R^2	LOD	Kontrollstamm	Referenz
fakultativ pathogene Bakterien								
Enterokokken spp.	Fwd: AGAAATTCCAAACGAACTTG Rev: CAGTGCTCTACCTCCATCATT	F(x)= -3,585x+35,283	93 bp	90,1 %	1,000	65	*E. faecium* DSM20477	(Frahm und Obst 2003)
E. faecalis	Fwd: CACCTGAAGAAACAGGC Rev: ATGGCTACTTCAATTTCACG	F(x)= -3,472x+35,447	475 bp	94,1 %	0,999	6	*E. faecalis* ATCC51299	(Depardieu et al. 2004)
P. aeruginosa	Fwd: AGCGTTCGTCCTGCACAAGT Rev: TCCACCATGCTCAGGGAGAT	F(x)= -3,282x+35,276	81 bp	101,7 %	0,999	3	*P. aeruginosa* DSM1117	(Clifford et al. 2012)
K. pneumoniae	Fwd: ACGGCCGAATATGACGAATTC Rev: AGAGTGATCTGCTCATGAA	F(x)= -3,387x+38,844	68 bp	97,4 %	0,998	18	*K. pneumoniae* DSM30104	(Clifford et al. 2012)
A. baumannii	Fwd: GTTGTGGCTTTAGGTTTATTATACG Rev: AAGTTACTCGACGCAATTCG	F(x)= -3,380x+35,679	94 bp	97,6 %	1,000	31	*A. baumannii* DSM30007	(Clifford et al. 2012)
E. coli	Fwd: GCATCGTGACCACCTTGA Rev: CAGCGTGGTGGCAAAA	F(x)= -3,361x+35,797	59 bp	98,4 %	0,994	4	*E. coli* DSM1103	(Clifford et al. 2012)
Antibiotikaresistenzgene								
*erm*B	Fwd: TGAATCGAGACTTGAGTGTGCAA Rev: GGATTCTACAAGCGTACCTT	F(x)=-3,328x+35,901	71 bp	100 %	1,000	16	*S. hyointestinalis* DSM20770	(Alexander et al. 2015)
*Int*I1	Fwd: GCCTTGATGTTACCCGAGAG Rev: GATCGGTCGAATGCGTGT	F(x)= -3,472x+34,720	196 bp	94,1 %	1,000	126	*E. coli* pNORM	(Rocha et al. 2018)
*tet*M	Fwd:GGTTTCTCTTGGATACTTAAATCAATC Rev: CCAACCATAAATCCTTGTTCRC	F(x)=-3,424x+38,747	88 bp	95,9 %	0,998	4	*E. coli* DH5α	(Peak et al. 2007)
*bla*TEM	Fwd: TTCCTGTTTTTGCTCACCCAG Rev: CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG	F(x)=-3,303x+38,559	112 bp	100,8 %	0,999	80	*E. coli* pNORM	(Rocha et al. 2018)
*sul*1	Fwd: CGCACCGGAAACATCGCTGCAC Rev: TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG	F(x) -3,387x+39,802	161 bp	97,6 %	0,999	80	*E. coli* pNORM	(Rocha et al. 2018)
*bla*CTX-M	Fwd: CGCTTTGCGATGTGCAG Rev: ACCGCGATATCGTTGGT	F(x)= -3,504x+34,255	551 bp	92,9 %	1,000	93	*E. coli* pNORM	(Paterson et al. 2003, Rocha et al. 2018)
*bla*CTX-M-32	Fwd: CGTCACGCTGTTGTTAGGAA Rev: CGCTCATCAGCACGATAAAG	F(x)= -3,517x+37,800	155 bp	92,5 %	1,000	235	*E. coli* pNORM	(Rocha et al. 2018)
*bla*OXA-48	Fwd: TGTTTTTGGTGGCATCGAT Rev: GTAAMRATGCTTGGTTCGC	F(x)= -3,540x+36,913	177 bp	91,6 %	0,998	92	*K. pneumoniae* TGH Isolate 2	(Monteiro et al. 2012)

Target	Primersequenz	Gleichung der Kalibriergeraden	Amplikon-größe	Effizienz	R^2	LOD	Kontrollstamm	Referenz
*bla*CMY-2	Fwd: CGTTAATCGCACCATCACC Rev: CGTCTTACTAACCGATCCTAGC	F(x)= -3,591x+34,026	172 bp	90,0 %	0,998	71	*K. pneumoniae* NRZ-01013	(Kurpiel und Hanson 2011)
*bla*VIM	Fwd: GAGATTCCCACGCACTCTCTAGA Rev: AATGCGCAGCACCAGGATAG Sonde: ACGCAGTGCGCTTCGGTCCAGT	F(x)= -3,829x+40,868	61 bp	82,5 %	0,999	118	*P. aeruginosa* PA49	(van der Zee et al. 2014)
*van*A	Fwd: TCTGCAATAGAGATAGCCGC Rev: GGAGTAGCTATCCCAGCATT	F(x)= -3,541x+33,078	376 bp	91,6 %	1,000	43	*E. faecium* B7641 vanA	(Klein et al. 1998)
*mec*A	Fwd: CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA Rev: TGGTCTTTCTGCATTCCTGGA	F(x)=-3,327x+34,887	91 bp	99,8 %	1,000	11	*S. Aureus* A1	(Volkmann et al. 2004)
mcr-1	Fwd: GGGCCTGCGTATTTTAAGCG Rev: CATAGGCATTGCTGTGCGTC	F(x)=-3,386x+35,349	183 bp	97,4 %	0,999	8	*E. coli* NRZ-14408	(Hembach et al. 2017)
*bla*NDM	Fwd: TTGGCCTTGCTGTCCTTG Rev: ACACCAGTGACAATATCACCG	F(x)= -3,293x+35,877	82 bp	101,2 %	0,999	66	*K. pneumoniae* ATCC BAA-2146	(Monteiro et al. 2012)

Bei allen Detektionssystemen konnte durch eine halblogarithmische Auftragung eine lineare Kalibriergerade erzeugt werden, welche einen Korrelationskoeffizienten (R^2) von mindestens 0,99 aufwiesen. Die Effizienz der Amplifizierungen lagen zwischen 90 % und 102 %. Damit waren alle Kalibriergeraden geeignet, um eine verlässliche Quantifizierung zu gewährleisten. Eine Ausnahme in der Effizienz bildete das Imipenemresistenzgene *bla*VIM mit einer Effizient von 82,5 %. Jedoch ist bei dem verwendeten Primersystem eine gute Qualität des Nachweises trotz der geringeren Effizienz gewährleistet (van der Zee et al. 2014). Die Detektionslimits für fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene lagen mit 3 (*P. aeruginosa*) bis 235 (blaCTX-M-32) Zelläquivalenten je PCR-Reaktion im akzeptablen niedrigen Bereich, gerade wenn bei Proben mit zu erwartender geringer Belastung entsprechend größere Probenvolumina filtriert wurden.

Eine Herausforderung bei der molekularbiologischen Quantifizierung ist die gewählte Bezugsgröße für PCR-basierte Ergebnisse. Es gibt zwei unterschiedliche Bezugsgrößen, die jeweils ihre eigenen Anwendungsgebiete und Interpretationspotentiale haben. Einerseits die absolute Normierung auf ein definiertes Wasservolumen und andererseits die relative Normierung auf eine bestimmte DNA-Menge oder Bakterienzahl. Der Hauptunterschied zwischen diesen beiden Normierungsmethoden für die Bewertung von Reduktionen ist in Abbildung 9 verdeutlicht.

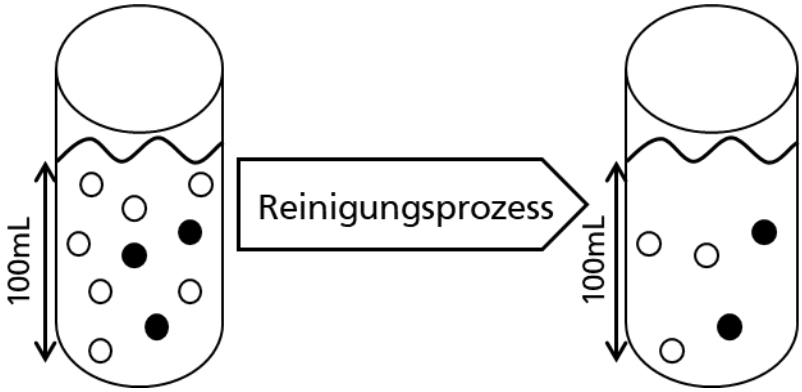

Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Eliminationsprozesses in definiertem Wasservolumen zur Verdeutlichung unterschiedlicher Normierungsmethoden. Weiße Kreise: negative Ereignisse, schwarze Kreise: positive Ereignisse. Absolute Normierung: 33 % Reduzierung bezogen auf das Gesamtvolumen, relative Normierung: 10 % Anstieg des positiven Ereignisses bezogen auf die Gesamtpopulation.

So sind in der dargestellten Ausgangsprobe drei Bakterien bzw. 30 % aller Bakterien positiv und enthalten das gesuchte Gen (schwarze Kreise). Nach der Behandlung befinden sich noch zwei positive Bakterien in der Probe, was bezogen auf die Gesamtpopulation der Bakterien (schwarze und weiße Kreise) jedoch 40 % entspricht. Es hat also eine relative Anreicherung stattgefunden. Mittels der absoluten Normierung sind zu Beginn der Behandlung drei positive Bakterien in der Probe vorhanden; nach der Behandlung lediglich zwei positive Bakterien im selben Wasservolumen. Es findet also eine Reduktion um 33 % statt. Derselbe Effekt wird durch die unterschiedlichen Normierungen anders beurteilt. Jedoch haben beide Methoden ihre Aussageberechtigung.

In der Thematik der Abwasserbehandlung verdeutlicht die relative Normierung auf 100 ng DNA oder auf Genkopien der 16S rRNA die Veränderungen innerhalb der noch bestehenden Bakterienpopulation. Eine absolute Normierung auf 100 mL Wasservolumen erlaubt es, zu

bewerten, in welchen Mengen ein Target oder Bakterium in die Umwelt gelangt. Obwohl die absolute Normierung einen schnelleren Einblick in die Eliminationsleistung gibt, erfasst sie keine Selektionsereignisse.

In dieser Arbeit wurde eine absolute Normierung auf 100 mL verwendet, da diese gemeinhin verständlicher ist und es im Wesentlichen um die Reduktion der Prozesse geht, um die Emission von Bakterien in die Umwelt zu beschreiben.

3.2 Emission von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen durch verschiedene kommunale Kläranlagen

Um einen Überblick über die mikrobielle Belastungssituation an Klärwerken mit konventioneller Abwasserreinigung zu erlangen, wurde der Ablauf des Nachklärbeckens von sieben Kläranlagen unterschiedlicher Ausbaugröße analysiert. Es wurden fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzen untersucht, sowie deren Reduktion durch die konventionelle Abwasseraufbereitung erfasst. Ausgangspunkt zur Beurteilung der Reduktion von mikrobiologischen Kontaminanten war der Ablauf der mechanischen Klärung. Die Erfassung der Reduktionen gibt einen Richtwert an, in welchem Ausmaße fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzen von Kläranlagen mit vergleichbarer konventioneller Klärung in die Umwelt emittiert werden.

In Tabelle 9 sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der untersuchten Parameter aller sieben untersuchten Kläranlagen dargestellt. Die Einzelwerte an den jeweiligen drei Probenahmetagen sind im Anhang Kapitel 7.24 aufgeführt.

Tabelle 9: Mittelwert von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL aus drei einzelnen Probenahmen im Ablauf des Nachklärbeckens der sieben untersuchten Kläranlagen (n=3).MW: Mittelwert, S_x: Standardabweichung, LOD: Detektionslimit.

	KA 1		KA 2		KA 3		KA 4		KA 5		KA 6		KA 7	
	MW	S_x	MW	S_x	MW	S_x	MW	S_x	MW	S_x	MW	S_x	MW	S_x
Enterokokken	1,14E+03	6,48E+02	3,28E+03	1,60E+03	4,26E+03	3,11E+03	4,43E+03	1,64E+03	8,10E+03	1,28E+03	4,84E+03	6,40E+02	1,80E+04	2,02E+04
E. faecalis	<LOD	-	2,30E+01	1,11E+01	2,31E+00	3,27E+00	4,05E+01	7,15E+00	5,32E+01	1,51E+01	6,44E+01	2,61E+01	4,28E+01	3,88E+01
P. aeruginosa	1,47E+02	4,76E+01	6,40E+02	4,01E+02	5,08E+01	7,18E+01	1,19E+03	8,05E+01	1,17E+02	2,24E+01	6,88E+02	2,38E+02	5,32E+02	6,62E+02
K.pneumoniae	4,69E+03	1,99E+03	6,23E+04	8,41E+04	1,58E+04	1,98E+04	6,06E+03	4,34E+03	1,36E+04	2,75E+03	6,48E+03	2,45E+03	1,79E+04	1,63E+04
A. baumannii	3,00E+02	1,46E+02	1,39E+03	7,30E+02	3,73E+02	2,07E+02	2,77E+02	1,15E+02	1,71E+02	1,94E+01	1,20E+03	9,41E+02	1,95E+03	1,38E+03
E.coli	6,46E+03	2,26E+02	4,26E+04	6,02E+04	4,59E+03	6,49E+03	2,00E+04	9,44E+03	1,48E+04	1,91E+02	1,48E+04	4,81E+03	6,29E+04	6,62E+04
*erm*B	4,69E+04	4,34E+03	5,85E+04	1,77E+04	2,12E+05	3,99E+04	8,61E+04	5,93E+04	5,09E+04	4,21E+04	8,62E+04	6,19E+04	2,36E+05	2,68E+05
*Int*I1	1,46E+06	4,53E+05	1,33E+07	1,07E+07	4,49E+06	4,76E+06	5,14E+06	1,16E+06	8,57E+05	5,58E+05	1,76E+06	1,61E+06	3,45E+06	3,54E+06
tetM	5,85E+04	9,35E+03	1,11E+05	1,28E+04	8,19E+04	7,81E+04	8,63E+05	5,31E+05	5,91E+04	7,41E+04	4,91E+04	2,64E+04	1,47E+05	1,72E+05
*bla*TEM	3,84E+04	1,44E+04	9,91E+04	3,46E+04	1,31E+05	9,93E+04	1,26E+05	4,72E+04	8,07E+04	4,78E+04	2,90E+04	6,67E+03	6,54E+05	6,62E+05
*sul*1	5,83E+06	1,19E+06	8,56E+07	9,96E+07	6,93E+06	4,31E+06	2,18E+07	4,85E+05	4,54E+06	2,78E+06	1,82E+07	1,21E+07	1,16E+07	1,06E+07
*bla*CTX-M	1,21E+03	3,72E+02	1,58E+03	1,84E+03	5,87E+03	6,63E+03	1,29E+04	1,06E+04	8,11E+02	6,03E+02	1,56E+03	2,20E+03	2,68E+03	2,74E+03
*bla*CTX-M-32	6,80E+03	4,42E+03	9,47E+03	8,42E+03	1,06E+04	9,99E+03	9,91E+03	4,06E+03	5,26E+03	3,28E+03	8,37E+03	1,00E+04	3,25E+04	2,49E+04
*bla*OXA-48	6,08E+03	1,99E+03	1,59E+04	3,08E+03	1,09E+04	1,24E+04	9,52E+04	1,26E+05	3,88E+03	3,42E+03	6,04E+04	4,16E+04	5,24E+04	7,29E+04
*bla*CMY-2	2,19E+02	1,43E+02	1,09E+03	6,76E+02	1,67E+02	1,60E+02	1,07E+04	7,02E+03	2,63E+02	2,71E+02	1,83E+02	2,49E+02	5,20E+03	6,21E+03
*bla*VIM	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	1,16E+04	1,06E+04
*van*A	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	6,43E+00	9,09E+00	8,53E-01	1,21E+00
*mec*A	3,76E+01	1,99E+01	2,22E+01	3,14E+01	7,88E+01	1,11E+02	6,06E+01	8,57E+01	5,41E+00	7,65E+00	<LOD	-	2,84E+01	2,88E+01
mcr-1	1,48E+02	2,09E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
*bla*NDM	<LOD	-	<LOD	-	3,07E+02	4,35E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-

Es konnten sowohl alle untersuchten fakultativ pathogene Bakterien aus der ESKAPE-Gruppe (WHO Prioritätenliste) als auch Antibiotikaresistenzgene im Ablauf von Kläranlagen mit unterschiedlichen Abundanzen nachgewiesen werden.

Die untersuchten Antibiotikaresistenzgene lassen sich in drei unterschiedliche Cluster oder Kategorien, basierend auf der Größenordnung ihrer Abundanzen im Ablauf des Nachklärbeckens, aufteilen. Diese Cluster waren bei allen untersuchten Kläranlagen nachweisbar und zeigen die gleiche Zuordnung der Antibiotikaresistenzgene (vgl. Tabelle 10).

Tabelle 10: Nachweis der fakultativ pathogenen Bakterien und Kategorisierung der nachgewiesenen Antibiotikaresistenzgene anhand deren Abundanz im Ablauf aller sieben untersuchten Kläranlagen unterschiedlicher Ausbaugröße.

fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	10^1-10^4 Zelläquivalente in 100 mL
	E. faecalis	
	P. aeruginosa	
	K. pneumoniae	
	A. baumannii	
	E. coli	
häufig vorkommende Resistenzgene	*ermB*	10^4-10^7 Zelläquivalente in 100 mL
	*intI*1	
	*tet*M	
	*bla*TEM	
	*sul*1	
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	10^2-10^4 Zelläquivalente in 100 mL
	*bla*CTX-M-32	
	*bla*OXA-48	
	*bla*CMY-2	
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	0-10^2 Zelläquivalente in 100 mL
	*van*A	
	*mec*A	
	mcr-1	
	*bla*NDM	

Häufig vorkommende Resistenzgene, welche im Ablauf der Kläranlagen in Konzentrationen von 10^4-10^7 Zelläquivalente/100 mL nachgewiesen werden konnten, bilden die erste Gruppe. In diesem Cluster befinden sich die veterinär assoziierten Antibiotikaresistenzgene *sul*1 und *tetM*, dass bereits weit verbreitete *bla*TEM β-Lactam Resistenzgen sowie das Resistenzgen *ermB* gegen Erythromycin. Auch das Gen des Integron Klasse 1 (*int*I1), das als Indikator für einen horizontalen Gentransfer in der Population gilt, fällt in dieses Cluster. In diese Kategorie fallen neben Resistenzgenen gegen veterinär genutzte Antibiotika (*sul1* und *tetM)*, auch Resistenzgene gegen Antibiotika, welche aufgrund ihrer lang anhaltenden Verwendung bereits weitflächig in der Umwelt nachgewiesen werden können (Huerta et al. 2013). Das

Resistenzgen *sul*1 weist mit Abundanzen zwischen $3{,}93x10^6$ Zelläquivalente/100 mL bei KA 3 und $8{,}56x10^7$ Zelläquivalente/100 mL bei KA 2 die höchsten Abundanzen aller untersuchten Kläranlagen auf. Da das Sulfonamid Resistenzgen *sul*1 unter anderem in der konservierten Region des mobilen genetischen Element *int*l1 liegt, wurde die weite Verbreitung dieses Gens bereits mehrfach beobachtet (Czekalski et al. 2012, Gravel et al. 1998, Pärnänen et al. 2016). Dieses Cluster ist aus klinischer Sicht von geringerer Relevanz, allerdings können mit ihrer Hilfe signifikant hohe Reduktionen mikrobieller Kontaminationen durch technische Verfahren zuverlässig detektiert werden, da die Abundanz dieser Parameter auch bei einer Reduktion um mehrere Log-Stufen nicht unter das Detektionslimit reduziert werden.

Das Cluster der *intermediär vorkommenden Resistenzgene* ist im Ablauf der Nachklärbecken in Konzentrationen von 10^2-10^4 Zelläquivalente/100 mL im Abwasser vorhanden. Darunter fallen mit den Resistenzgenen *bla*CTX-M, *bla*CTX-M-32, *bla*OXA-48 und *bla*CMY-2 Vertreter der ESBL vermittelnden Gene (Extended-Spektrum-β-Lactamasen) und Vertreter der Gruppe der klinisch bedeutsameren Carbapenemasen.

Selten vorkommende Resistenzgene bilden das letzte Cluster der Antibiotikaresistenzgene. Diese aus den Genen *van*A, *mec*A, *mcr*-1 und *bla*NDM bestehende Kategorie konnte im Ablauf der Nachklärbecken bereits in einigen Fällen mit maximal 10^2 Zelläquivalente/100 mL detektiert werden. Die Resistenzgene dieses Clusters vermitteln Resistenzen gegen Reserveantibiotika. So wurde das mobile Colistin-Resistenzgen *mcr*-1 im Ablauf des Nachklärbeckens von KA 1 mit $1{,}48x10^2$ Zelläquivalenten/ 100 mL detektiert. Mit *bla*NDM erreichen auch Resistenzen gegen Carbapeneme mit bis zu $2{,}07x10^2$ Zelläquivalenten/ 100 mL (KA 3) die Umwelt. Das Resistenzgen *bla*VIM vermittelt ebenfalls eine Carbapenemresistzenz (Imipenem) und wurde in einer Großkläranlage detektiert. Das MRSA assoziierte Resistenzgen *mec*A konnte mit Ausnahme von KA 6 im Ablauf aller untersuchten Kläranlagen nachgewiesen werden. Dies folgt dem Trend des mit 27% weiterhin hohen MRSA (methicillinresistenter *Staphylococcus aureus*) -Anteil an *S. aureus* Infektionen in Deutschland (Meyer et al. 2014). Eine Ausbringung dieser hygienisch kritischen Resistenzgene ermöglicht eine weitere Verbreitung dieser Resistenzen in der Umwelt durch horizontalen Gentransfer, auch auf Umweltbakterien (Carattoli 2009, Pruden et al. 2006, von Wintersdorff et al. 2016). Diese Resistenzgene sind aus klinischer Sicht als kritisch einzustufen, da auftretende Resistenzen im Infektionsfall zu schweren Komplikationen führen. Ihr Auftreten kann als im hohen Maße kritisch angesehen werden. Eine Emission der Resistenzgene dieses Clusters sollte zwingend vermieden werden, um eine Ausbreitung in der Umwelt und dem damit möglichen verbundenen Expositionsrisiko des Menschen vorzubeugen.

Neben den unterschiedlichen Clustern der Antibiotikaresistenzgene kann auch die Gruppe der fakultativ pathogenen Bakterien als eigenes Cluster betrachtet werden. Es werden mit 10^1-10^4 Zelläquivalente/100 mL Abundanzen mit einer hohen Streuung nachgewiesen, jedoch bilden diese als Risikokeime in der Krankenhaushygiene eine Kategorie (Bundesgesundheitsbl. 2020). Fakultativ pathogene Bakterien konnten im Ablauf aller Kläranlagen in Konzentrationen zwischen 10^1 und 10^4 Zelläquivalente/ 100 mL nachgewiesen werden. Hiervon erwiesen sich *E. coli* Kontaminationen und *K. pneumoniae* als diejenigen fakultativ pathogenen Bakterien mit den höchsten Abundanzen in allem Kläranlagen. Die hohen Abundanzen von dem Fäkalindikatorkeim *E. coli* mit durchschnittlich $2{,}37x10^4$ Zelläquivalente/ 100 mL sind für den Ablauf von Kläranlagen zu erwarten. Die, im Vergleich zu den übrigen fakultativ pathogenen Bakterien, hohe Belastung mit $1{,}81x10^4$

Zelläquivalenten/ 100 mL von *K. pneumoniae* ist hinsichtlich der hohen Affinität neue Resistenzgene auszubilden und weiter zu verbreiten als besonders kritisch anzusehen (Hassani 2014).

Bei der Betrachtung der einzelnen Kläranlagen unter Berücksichtigung ihrer Ausbaugröße (siehe Tabelle 1 in Kapitel 2.1.1), erwies sich KA 7, mit 440.000 EW, als größte untersuchte Kläranlage, als diejenige, welche am häufigsten (8 von 20 Parametern) die höchsten Belastungssituationen nach dem Nachklärbecken aufwies. Kläranlage 5 mit der zweitgrößten Ausbaugröße (210.000 EW) zeigte jedoch wiederum bei 11 der 20 untersuchten Parametern die niedrigste oder gar keine Belastung. Auch bei den übrigen untersuchten Kläranlagen konnte, in Übereinstimmung mit weiteren Untersuchungen, keine Korrelation zwischen der Ausbaugröße und der Belastungssituation im Ablauf der Kläranlage festgestellt werden (Alexander et al. 2020). Trotz unterschiedlicher Einzugsgebiete, Ausbaugrößen und leicht variierender technischer Stufen (P-Fällung oder biologische P-Entfernung/vgl. Tabelle 1), schwankte die Belastung mit einzelnen fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen an den sieben untersuchten Kläranlagen um maximal 2 Log-Stufen. Auffällig war das in KA 1 während keiner Probenahme *E. faecalis* nachgewiesen werden konnte, obwohl diese sowohl vom Einzugsgebiet als auch von den vorhanden technischen Stufen keine Sonderstellung einnahmen. Mit einer Ausbaugröße von 23.500 EW und einer täglich behandelten Wassermenge von durchschnittlich 699 m^3/d zählte sie jedoch zu den kleineren der untersuchten Kläranlagen.

Anhand dieser Clusterung kann die Relevanz weitergehender Abwasserbehandlungsverfahren verdeutlicht werden. So enthält das Cluster der *häufig vorkommenden Resistenzgene* Resistenzen, welche seit Jahrzehnten bekannt sind, und in dieser Zeit lediglich durch eine konventionelle Klärung nur teilweise zurückgehalten wurden. Als Folge dessen sind die Gene dieses Clusters mittlerweile in der Umwelt und vereinzelt sogar schon im Grundwasser nachweisbar (Chee-Sanford et al. 2001, Su et al. 2014). Diese weite Verbreitung dieser älteren Antibiotikaresistenzgene erlaubt einen Ausblick auf die zu erwartenden Abundanzen der *intermediär* und *selten vorkommenden Resistenzen* in der Umwelt, falls keine zusätzlichen weitreichenden und effektiven Maßnahmen zum Rückhalt der Antibiotikaresistenzgene getroffen werden.

Die durchschnittliche Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen, welche die konventionellen Klärungen der Kläranlagen 1-7 erreichen, sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Abundanzen jedes Parameters im Zulauf von Kläranlage 1-7 sind im Anhang in Kapitel 7.3 aufgeführt. Die genauen p-Werte zur statistischen Bewertung der Reduktionen von mikrobiellen Kontaminanten stehen ebenfalls im Anhang 7.4.

Tabelle 11: Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Log-Stufen der Kläranlagen 1-7 sortiert nach der Ausbaugröße der Kläranlagen in EW. Die jeweils höchsten und niedrigsten Reduktionen eines Parameters sind grün resp. orange hinterlegt. Die Signifikanz der mikrobiellen Reduktionen ist mit Sternen gekennzeichnet: *: p≤0,1, **: p≤0,05. Parameter bei denen aufgrund ausbleibender Detektion im Zulauf keine Reduktion ermittelt werden konnte sind mit – gekennzeichnet.

		KA 6	KA 1	KA 3	KA 4	KA 2	KA 5	KA 7
	EW in Tsd.	8	23,5	26	45	46	120	440
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	2,3**	2,2**	2,0**	2,2**	2,1**	2,3**	2,5**
	E. faecalis	2,3**	3,1**	2,4**	2,1**	1,6**	2,3**	2,5**
	P. aeruginosa	1,2**	1,4**	2,0**	0,4**	0,5**	1,6**	1,4**
	K. pneumoniae	2,1**	1,9**	1,3**	1,7**	0,7	2,0**	2,0**
	A. baumannii	1,9**	2,9**	1,8**	2,7**	1,9**	2,8**	3,0**
	E. coli	1,7**	1,7**	1,6**	1,6**	0,9**	1,9**	2,1**
häufig vorkommende Resistenzgene	*ermB*	1,9*	2,4**	1,8**	2,1**	1,7**	2,5**	2,9**
	*intI*1	0,9	1,4**	1,2**	0,7**	0,2	1,7*	1,6
	*tet*M	2,1**	2,2**	1,6**	1,1**	1,9**	1,7**	2,3**
	*bla*TEM	2,0**	2,4**	1,9**	1,8**	2,4**	2,3**	2,4**
	*sul*1	0,6	1,5**	1,3**	0,8**	0,1	1,1**	1,5**
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	2,2**	1,7**	0,7**	1,6**	1,3**	1,9**	1,8**
	*bla*CTX-M-32	1,7*	2,0**	1,2**	2,2**	2,4**	1,9**	2,0**
	*bla*OXA-48	1,9**	2,0**	1,5**	1,6	2,8**	2,3**	0,5**
	*bla*CMY-2	0,9*	1,5**	1,7**	1,9	2,5**	1,9**	2,2**
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	-	-	-	-	-	-	2,5**
	*van*A	-	2,8*	0,4	-	-	2,3**	3,0**
	*mec*A	2,7**	1,0**	0,8	0,8*	1,5**	2,4**	2,2**
	mcr-1	-	1,8	1,9	3,9	2,7	3,2	4,5**
	*bla*NDM	-	-	0,3	-	-	-	-

Die dargestellten Reduktionen mikrobieller Kontaminationen in den untersuchten Kläranlagen zeigen, dass obwohl ein Großteil der untersuchten Parameter noch im Ablauf der Kläranlagen detektiert werden kann, sie eine teilweise Reduktion durch die Kläranlage erfahren. Fakultativ pathogene Bakterien konnten bis zu 3,1 Log-Stufen (mindestens 0,4 Log-Stufen), *häufig vorkommende Resistenzgene* um maximal 2,4 Log-Stufen und mindestens 0,2 Log-Stufen reduziert werden. *Intermediär* und *selten vorkommende Resistenzgene* erfuhren eine maximale Reduktion von 2,8 bzw. 4,5 Log-Stufen. Die minimal erreichte Reduktion lag bei 0,7 Log-Stufen bei den *intermediär vorkommenden Resistenzgenen* und betrug 0,8 Log-Stufen bei den *selten vorkommenden Resistenzgenen*. Die durchschnittliche Reduktion aller untersuchten Parameter lag bei 1,8±0,6 Log-Stufen. Vergleichbare bakterielle Eliminationsleistungen von 1-3 Log-Stufen durch eine konventionellen Abwasserbehandlung konnten auch bereits international nachgewiesen werden (Koivunen et al. 2003, Paluszak et al. 2003).

Es konnte keine direkte Korrelation der Reduktion mit der Ausbaugröße von 440.000 EW (KA 7) bis 8.000EW (KA 6) oder der durchschnittlichen täglichen behandelten Wassermenge beobachtet werden (vgl. Tabelle 11).

Die Kläranlage KA 2 (46.000 EW) wies bei sechs Parametern die geringste Reduktion auf, erreichte aber gleichzeitig bei 4 weiteren Parametern im Vergleich die höchste Reduktion. So wurde das mobile genetische Element *int*I1, sowie das unter anderem in diesem Integron konservierte Sulfonamidresistenzgen *sul*1, durch die konventionelle Reinigung an KA 2 um unzureichende 0,2 und 0,1 Log-Stufen reduziert. Es konnte im Zulauf und im Ablauf mit vergleichbarer Abundanz nachgewiesen werden. Auch die fakultativ pathogenen Bakterien *P. aeruginosa, K. pneumoniae* und *E. coli* wurden weniger als 1 Log-Stufe reduziert. Die Reduktion dieser fakultativ pathogenen Bakterien in den übrigen Kläranlagen lag zwischen 1 und 2 Log-Stufen. Auffällig ist, dass die *intermediär vorkommenden Resistenzgene* gegen Cephalosporine (*bla*OXA-48 und *bla*CMY-2) durch KA 2 um 2,5 bzw. 2,8 Log-Stufen reduziert werden konnten, während die anderen Kläranlagen lediglich eine Reduktion von 1,2 bis 2 Log-Stufen erreichten. Ebenfalls wurde eine starke Varianz in der Reduktion der *selten vorkommenden Resistenzgene* in den Kläranlagen 1 bis 7 festgestellt. Die niedrigste lag bei 0,3 Log-Stufen (*bla*NDM, KA 3) und die höchste Reduktion mit 4,5 Log-Stufen wurde für *mcr*-1 festgestellt (KA 7).

Die hohe Streuung der Reduktion kann durch unterschiedlichste Faktoren verursacht werden. Neben unterschiedlichen Abwasserreinigungseffizienzen der einzelnen Kläranlagen, und Zusammensetzung des zu behandelten Abwassers (häusliches Abwasser, Industrieabwasseranteil, Fremdwasseranteil), spielt die Ausgangskonzentration eines Parameters eine wichtige Rolle. Stark variierende Konzentrationen der entsprechenden Gene im Zulauf der Kläranlagen sind daher ausschlaggebend für die Reduktionsspannweite eines Parameters. Wenn die entsprechenden Gene nicht oder nur vereinzelt nachgewiesen werden können, ist eine verlässliche Einschätzung der Reduktion nicht möglich. Besonders auffällig ist dies bei dem *mcr*-1 Resistenzgens gegen Colistin. Die zum Teil sehr starke Reduktion kann lediglich bei Kläranlage 7 als signifikant gewertet werden, da dort *mcr*-1 über mehrere Probenahmen im Zulauf detektiert wurde. Die hohe Varianz aller *selten vorkommenden Resistenzgene* im Zulauf der Kläranlagen kann durch die unterschiedlichen Einzugsgebiete verursacht werden. So ist bei Kläranlagen, welche z.B. Krankenhäuser oder vergleichbare Pflegeeinrichtungen im Einzugsgebiet haben, der Einfluss von Reserveantibiotika im Abwasser dominanter und als Folge dessen, ist die Ausprägung der Resistenzlage gegen solche Präparate stärker (Lepper et al. 2002).

Das Auftreten der hygienisch relevanten und z.T. auch kritischen Antibiotikaresistenzgene im Ablauf aller untersuchten Kläranlagen, unabhängig von ihrer Ausbaugröße und trotz signifikanter Reduktion, verdeutlicht, dass die bisherige konventionelle Klärung Antibiotikaresistenzgene und auch fakultativ pathogene Bakterien nicht ausreichend aus dem Wasser entfernen kann. So erreichen, auch bedingt durch die Ausbaugrößen (vgl. Tabelle 1 in Kapitel 2.1.1), an jeder untersuchten Kläranlage jeden Tag zwischen $8{,}90 \times 10^{10}$ (KA 1) und $1{,}11 \times 10^{14}$ (KA 7) fakultativ pathogene Bakterien und $5{,}21 \times 10^{13}$ (KA 1) bis $1{,}78 \times 10^{16}$ (KA 7) Antibiotikaresistenzgene die Umwelt. Allgemein können diese von Kläranlagen in die Umwelt ausgebrachte Antibiotikaresistenzgene zu der fortwährenden Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen in der Umwelt beitragen (Knapp et al. 2010). Folglich sind

weiterführende Maßnahmen nötig, um das Ziel der Unterbrechung der Verbreitungswege zu erreichen (Levy und Marshall 2004, Organization 2014).

Zur Vermeidung des Gesundheitsrisikos und der allgemeinen Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen innerhalb der beeinflussten aquatischen Umwelt ist es nach dem Vorsorgeprinzip unumgänglich, die Verbreitung dieser Risikopotentiale wirksam und nachhaltig zu unterbinden. Für eine solche weitergehende Abwasserbehandlung sind bereits unterschiedliche Methoden in internationaler Diskussion (Hembach et al. 2019, Hiller et al. 2019, Luddeke et al. 2015). Die detaillierte Reduktion von fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen durch ausgewählte weitergehende Abwasserbehandlungsverfahren im kontinuierlichen Betrieb an einer Kläranlage werden im folgenden Kapitel 3.3 verglichen.

3.3 Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung

Die Probenahme für die Untersuchungen der weitergehenden Abwasserbehandlungsverfahren zur Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen wurde im Zeitraum von 2016 bis 2018 durchgeführt. Insgesamt wurden 5 Verfahren bzw. Verfahrenskombinationen zur weitergehenden Abwasserbehandlung untersucht, wobei der Ablauf des Nachklärbeckens als Bezugspunkt für den Vergleich zwischen konventioneller und erweiterter Abwasserklärung verwendet wurde. Die adsorptive Behandlung mit pulverisierter Aktivkohle (PAK) und nachfolgender Sandfiltration war als großtechnische Anlage mit einer Kapazität für 440.000 EW an der Kläranlage bereits realisiert. Die Verfahren der Ozonbehandlung sowie beide Ultrafiltrationseinheiten waren als halbtechnische Anlagen im Pilotmaßstab in den kontinuierlichen Betrieb der Kläranlage als Bypass nach dem Nachklärbecken integriert. Die UV-Bestrahlung sowohl mit dem Ablauf des Nachklärbeckens, als auch mit dem Ablauf der Ozonbehandlung wurde im Labormaßstab als 1 L Batch-Verfahren in Kooperation mit der Firma Xylem GmbH (Herford) durchgeführt.

3.3.1 Aktivkohle mit nachgeschalteter Sandfiltration

Das Verfahren der adsorptiven Reinigung mit Pulveraktivkohle (PAK) und nachfolgender Sandfiltration konnte im großtechnischen Maßstab (440.000 EW) an der Kläranlage untersucht werden. Der Kontaktreaktor der PAK-Stufe wurde mit dem Ablauf des Nachklärbeckens betrieben. Anschließend folgte eine Sedimentation und abschließend eine Sandfiltration zum Abtrennen der Kohlepartikel (vgl. Abbildung 10).

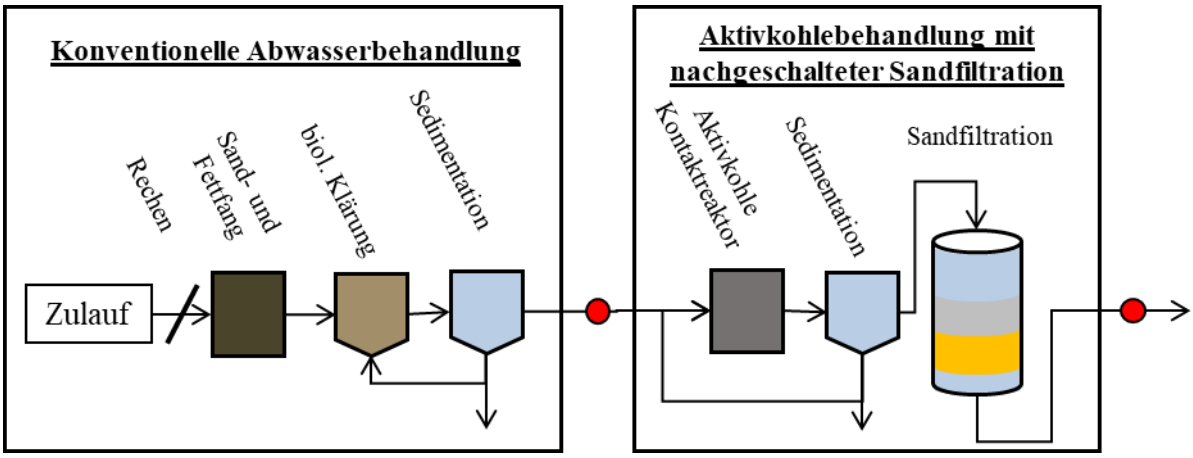

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Anordnung der unterschiedlichen Reinigungsstufen für die weitergehende Behandlung durch Aktivkohle mit nachgeschalteter Sandfiltration (adsorptive Reinigung). Rote Punkte: Probenahmestellen.

Nach dem Aktivkohlekontaktreaktor mit PAK und nachfolgender Sandfiltration konnte keine allgemeine, signifikante Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen gemessen werden (vgl. Abbildung 11). Die genauen Abundanzen, Standardabweichungen und p-Werte sind im Anhang 7.5 tabellarisch dargestellt. Die Abundanzen der einzelnen Probenahmetage sind im Anhang in Kapitel 7.24 gelistet.

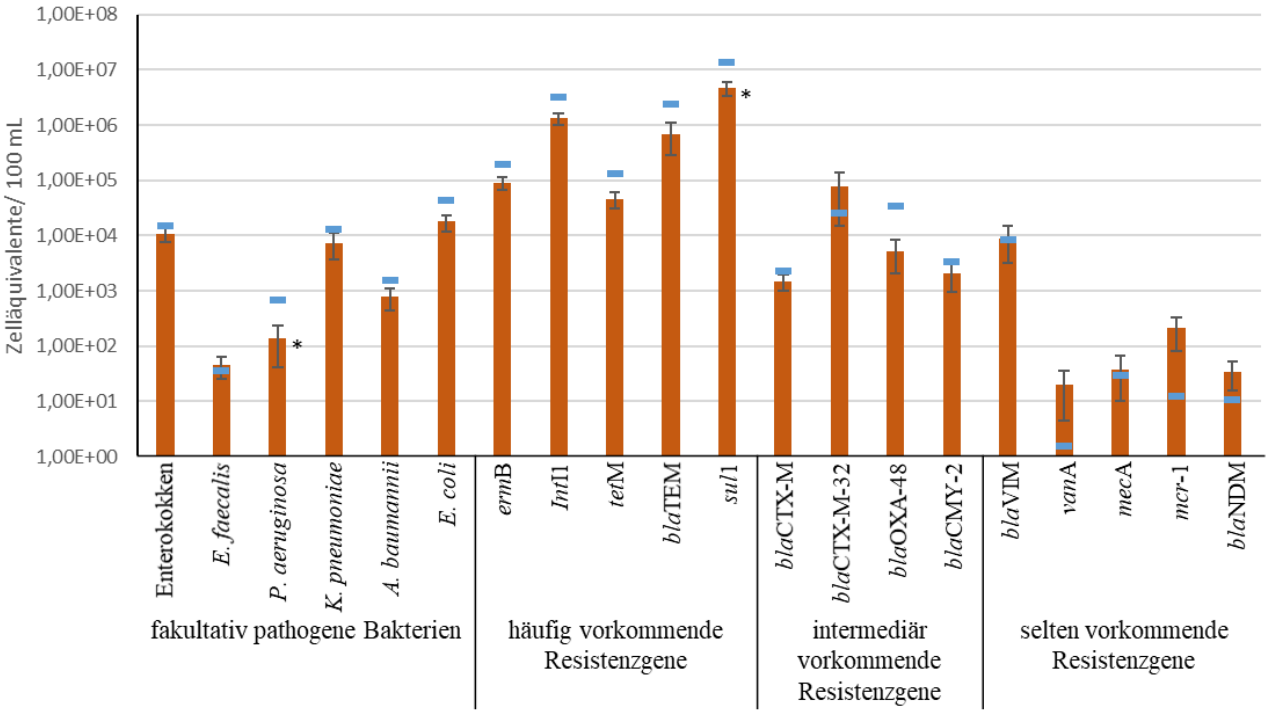

Abbildung 11: Zelläquivalente/100 mL im Zulauf der Aktivkohleadsorption (blauer Balken) und Ablauf der Sandfiltration (orange Säulen). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Abundanzen im Ablauf (n=4). Signifikante Reduktionen sind mit Sternen gekennzeichnet: *: p≤0,1; **: p≤0,05; ***: p≤0,01.

Fakultativ pathogene Bakterien wurden mit einer Reduktion von maximal 0,5 Log-Stufen (*K. pneumoniae, A. baumannii*) zurückgehalten, sodass nachfolgend ein Wiederaufwachsen

nicht ausgeschlossen werden kann. Auch bei den Resistenzgenen wurde lediglich eine geringe Reduktion von weniger als 1 Log-Stufe beobachtet. Die höchste Reduktion konnte bei dem häufig vorkommenden Resistenzgen *sul*1 gemessen werden. Es wurde, neben *P. aeruginosa* als einziger Einzelparameter, von $1{,}37 \times 10^7$ auf $4{,}73 \times 10^6$ Zelläquivalente/100 mL, signifikant reduziert.

Im Cluster der selten vorkommenden Resistenzgene konnte bei den Resistenzgenen *bla*VIM, *van*A, *mec*A, *mcr*-1 und *bla*NDM sogar eine Zunahme der Abundanz beobachtet werden. Besonders das mobile *mcr*-1 Colistinresistenzgen wurde durch das Verfahren ausgehend von $1{,}26 \times 10^1$ auf $2{,}08 \times 10^2$ Zelläquivalente/100 mL ($p=0{,}044$) deutlich angereichert. Zusätzlich ist auch das Vorkommen des Vancomycin-Resistenzgens *van*A von $1{,}59 \times 10^0$ auf $1{,}98 \times 10^1$ Zelläquivalente/100 mL angestiegen. Beide Resistenzgene sind aus klinischer Sicht mit einem hohen Risikopotential im Infektionsfall belegt.

Die geringe Reduktion der Aktivkohlebehandlung steht in Übereinstimmung mit weiteren Studien (Hiller et al. 2019). Besorgniserregend ist allerdings der Anstieg einzelner Resistenzgene um das bis zu 12-fache der Ausgangsituation (*vanA*) ausgehend vom Zulauf bis zum Ablauf des Gesamtprozesses. Da es sich hierbei mehrheitlich um Antibiotikaresistenzgene gegen Reserveantibiotika handelt, ist deren verstärkte Verbreitung aus Sicht der Gesundheitsfürsorge als besonders kritisch anzusehen.

Der genaue Ursprung des Anstiegs innerhalb des Gesamtprozesses konnte nicht final bestimmt werden. Eine Aufgliederung in die Einzelverfahren des Aktivkohlekontaktreaktors mit nachfolgender Sedimentation und der Sandfiltration erbrachte keine eindeutige Ursache im Hinblick auf mögliche Anreicherungsprozesse (vgl. Anhang 7.6). Es fanden sowohl beim Verfahren des Aktivkohlekontaktreaktors mit nachfolgender Sedimentation (hier: *E. faecalis*, *bla*NDM, mcr-1) als auch in der Sandfiltration (hier: *van*A, *mec*A, *bla*CTX-M-32) Anreicherungen einzelner Antibiotikaresistenzgene und fakultativ pathogener Bakterien statt.

Ein Grund für den Anstieg könnten ausgeprägte Biofilme im System des Kontaktreaktors, des Sedimentationsbeckens oder der Sandfiltration sowie den dazugehörigen Rohrsystemen sein (vgl. Kapitel 1.5.1). Im Falle der Aktivkohle kommen auch noch Bakterien hinzu, welche sich an die pulverisierte Aktivkohle anlagern und durch die Rezyklierung der Aktivkohle eine verlängerte Aufenthaltsdauer im Verfahren haben (Morinaga et al. 2003). Im Biofilm gebundene als auch an der Aktivkohle angelagerte Bakterien können diese kritischen Antibiotikaresistenzgene tragen, durch horizontalen Gentransfer weitergeben und/oder Bakterien freisetzen, welche diese Gene tragen. Ein Teil des Anstieges kann weiterhin durch eine Änderung der Zusammensetzung des Abwassers verursacht sein, da die untersuchten Proben des Ablaufes nicht zeitlich korrespondierend zum Zulauf, sondern lediglich in vergleichbaren Zeiträumen von 1 Stunde genommen wurden. Der unabhängige Anstieg unterschiedlicher Resistenzgene sowohl in der Sandfiltration als auch in der Aktivkohlebehandlung (Kontaktreaktor und nachfolgendes Sedimentationsbecken) zeigt, dass beide untersuchten Einzelverfahren mit einem Risiko der zusätzlichen Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen einhergehen.

In Übereinstimmung mit den vorherigen Erwartungen und der ursprünglichen Intention der Spurenstoffreduktion, ist eine Aktivkohleadsorption mit Sedimentationsbecken und anschließender Sandfiltration aus mikrobiologischer Sicht nicht als abschließendes Verfahren

einer erweiterten Abwasserbehandlung mit dem Ziel der Reduktion von Antibiotikaresistenzgenen und fakultativ pathogenen Bakterien geeignet.

3.3.2 UV-Bestrahlung mit 400 J/m²

Die Behandlung des Abwassers durch UV-Bestrahlung wurde im 1 L Batch-Verfahren im Labor der Kläranlage durchgeführt. Hierzu wurde der Ablauf des Nachklärbeckens beprobt und anschließend sukzessive mit einem Colimated Beam device (CBD) für 1 Sek. bestrahlt. Der untersuchte Versuchsaufbau ist in Abbildung 12 dargestellt.

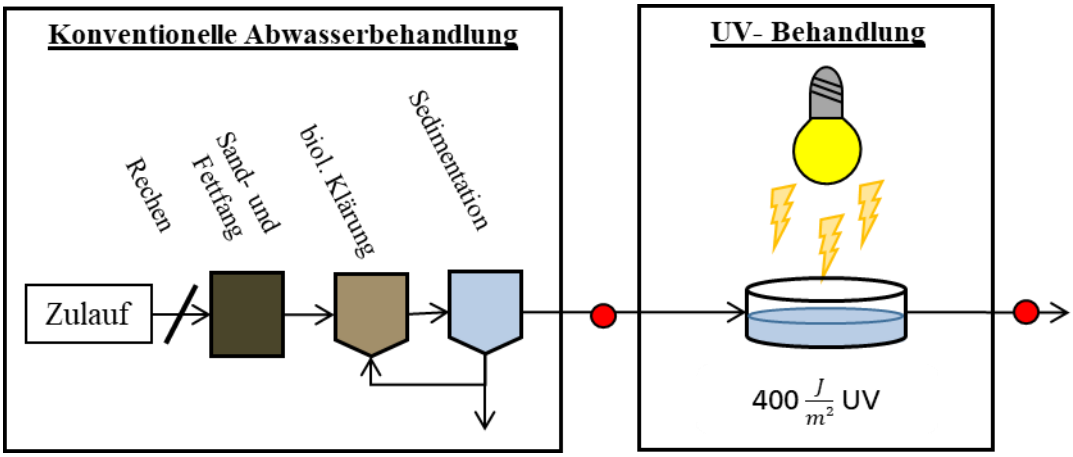

Abbildung 12: Schematische Darstellung der einzelnen Prozesse und Probenahmestellen zur Technik der UV Bestrahlung. Rote Punkte: Probenahmestellen.

Der durchschnittliche spektraler Absorptionskoeffizent (SAK) im Ablauf des Nachklärbeckens lag während des Probenahmezeitraums bei durchschnittlich 9,3 1/m ± 1,8 1/m. Der SAK_{254} dient als Richtwert für den Gehalt gelöster Stoffe des zu behandelten Wassers, welche aufgrund ihrer absorbierenden Eigenschaften bei 254 nm, die UV-Behandlung beeinflussen können (Jolis et al. 2001). Nach einer UV-Bestrahlung mit einer, an die Abwasserdesinfektion angelehnte Intensität von 400 -800 J/m² konnte keine signifikante Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen im realen Abwasser nach der biologischen Stufe beobachtet werden (vgl. Abbildung 13). Die im Diagramm dargestellten Abundanzen sind in tabellarischer Form im Anhang 7.7 zu finden. Die zugrundeliegenden Abundanzen an den unterschiedlichen Probenahmetagen befinden sich im Anhang in Kapitel 7.24.

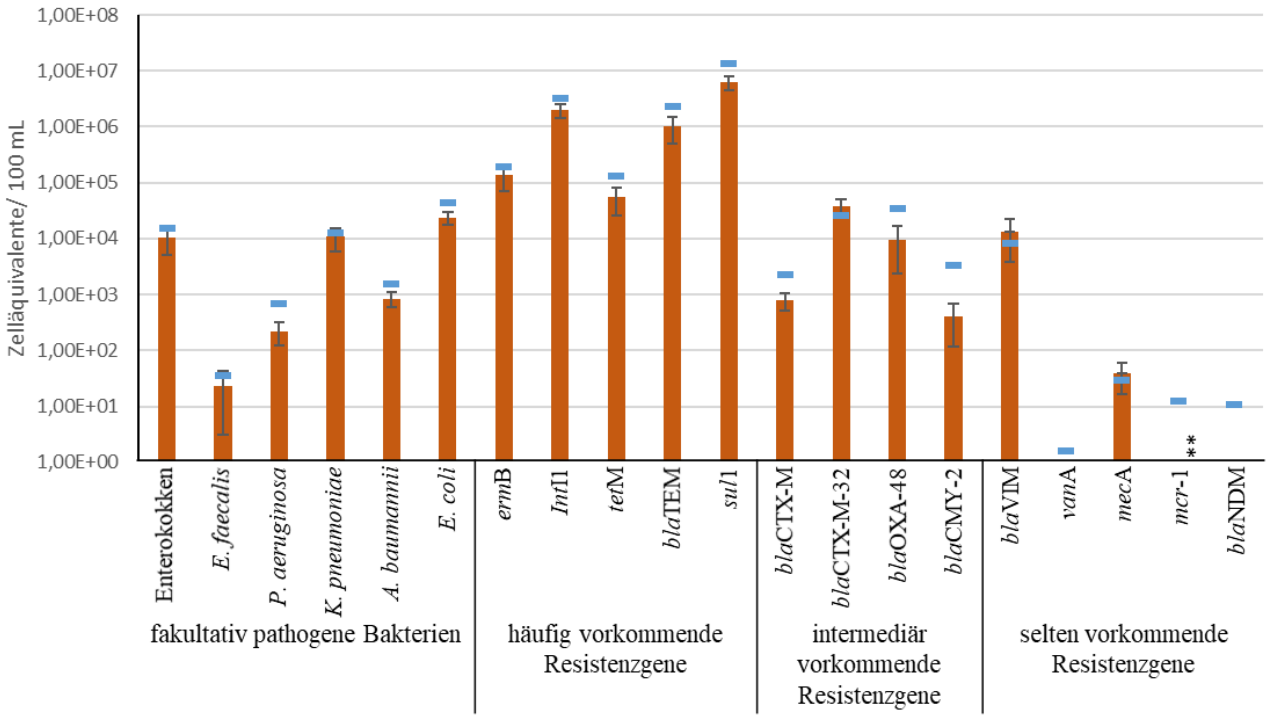

Abbildung 13: Zelläquivalente/100 mL vor (blaue Balken) und nach UV-Bestrahlung mit 400 J/m² für 1 Sekunde (orange Säulen). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Abundanzen im Ablauf (n=4). Signifikante Reduktionen sind mit Sternen gekennzeichnet: *: p≤0,1; **: p≤0,05; ***: p≤0,01.

Die UV-Bestrahlung mit 400 J/m² für 1 Sekunde erzielte lediglich geringe Reduktionen der untersuchten Markergene für fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene. So konnte z.B. *E. coli* von $4{,}34 \times 10^4$ auf $2{,}36 \times 10^4$ Zelläquivalente/100 mL (<0,5 Log-Stufe) reduziert werden. Die Reduktion der übrigen untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene entsprach maximal 0,9 Log-Stufen. In Einzelfällen konnte ein Anstieg der Abundanz nach der UV-Behandlung für die Parameter *mecA*, *bla*VIM, *bla*CTX-M-32 festgestellt werden (0,1-0,2 Log-Stufen). Dieser Anstieg liegt jedoch im Bereich der Varianz und konnte, wie die Mehrheit der beobachteten Reduktionen, nicht als signifikant bestätigt werden. Weiterhin konnten mehrere Gene des Clusters der selten vorkommenden Resistenzgene, mit geringen Ausgangskonzentrationen von maximal $1{,}26 \times 10^1$ Zelläquivalente/100 mL, unter das Detektionslimit reduziert werden (*bla*NDM, *mcr*-1, *van*A). Durch die geringe Konzentration im Zulauf kann jedoch lediglich die Reduktion des Colistin-Resistenzgens *mcr-1* als signifikant (p=0,014) angesehen werden.

Diese Beobachtungen sind nicht in genauer Übereinstimmung mit Erkenntnissen anderer Studien, bei denen bereits bei UV-Dosen ab 150 J/m² eine Reduktion von mindestens einer Log-Stufe nachgewiesen wurde (Maya et al. 2003). Diese und andere Studien mit vergleichbaren Reduktionen basieren jedoch auf der Verwendung von kulturbasierten Methoden. Bei der Verwendung molekularbiologischer Nachweisverfahren und ähnlicher UV-Intensität konnte die geringere Reduktionleistung von anderen Forschungsgruppen bestätigt werden (Auerbach et al. 2007). Für eine mittels molekularbiologischen Methoden nachweisbare Reduktion von Antibiotikaresistenzgenen und Bakterien sind deutlich höhere UV-Intensitäten bis zu 4000 J/m² oder zusätzliche photokatalytische Reaktionen nötig (Guo et al. 2017, McKinney und Pruden 2012).

Besonders bei erfolgter UV-Behandlung ist die Zuverlässigkeit von qPCR-Systemen ein umstrittener Diskussionspunkt (McKinney et al. 2010). Da die Wirkungsweise der UV-Bestrahlung auf DNA Schäden beruht, können Gene als intakt detektiert werden, obwohl sie DNA-Schäden aufweisen falls die Schädigung außerhalb des qPCR Amplikons (ca. 100 bp) liegt. Aus diesem Grund werden Primer mit einer Amplikonlänge von 1000 bp für den Nachweis der Eliminationsleistungen von UV-Behandlungen vorgeschlagen (McKinney und Pruden 2012). Weitergehende Studien zeigen, dass UV-induzierte DNA Schäden (hautsächlich Pyrimidin Dimere (Harm 1980)) durch unterschiedliche Mechanismen (Photoreaktivierung und Dunkel-Reparatur) repariert und einmal geschädigte Bakterien wieder aufwachsen können (Lindenauer und Darby 1994, Thoma 1999, Whitby und Palmateer 1993). Eine Latenzphase zwischen der Bestrahlung und dem Starten der Wiederaufkeimung führt dazu, dass klassische Kultivierungsexperimente dieses Potential der Wiederaufkeimung nicht erfassen (Nebot Sanz et al. 2007). Unter Berücksichtigung dieses Wiederaufkeimens ist jedoch ein kurzes Amplikonfragment aussagekräftiger für eine Bestimmung der nachhaltigen Reduktionsleistung. Bei der Verwendung eines großen Amplikons (1000 bp) werden potentielle DNA Schäden ab einer Häufigkeit von einem Schaden/1000 bp als letal und erfolgreich eliminiert gewertet, ohne das Reparaturpotential zu berücksichtigen. qPCRs mit einem kleineren Amplikon detektieren eine Elimination erst ab einer durchschnittlichen Mutationshäufigkeit von einem Schaden pro 100 bp (Ho et al. 2016, McCarty und Atlas 1993). Es gilt noch zu beweisen, dass Organismen mit einer geringen Schädigung alle 1000 bp schneller in der Lage sind, diese zu reparieren und damit nach kurzer Latenzzeit wieder über ein funktionierendes Gen verfügen. als Organismen mit einer Schädigung alle 100 bp.

Die angewandte UV-Bestrahlung mit 400 J/m² und einer Bestrahlungsdauer von 1 Sekunde zeigt an der untersuchten Kläranlage lediglich geringfügige Reduktionen mikrobieller Kontaminanten von weniger als 1 Log-Stufe und ist als Folge dessen nach mikrobiologischem Standpunkt nicht geeignet, die Ausbreitung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in die Umwelt effektiv zu unterbinden.

3.3.3 Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC

Zur Bewertung der Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene durch Ozon wurde der Ablauf des Nachklärbeckens in einer halbtechnischen Ozonanlage für 8 Minuten mit 1 g Ozon/g DOC behandelt (vgl. Abbildung 14).

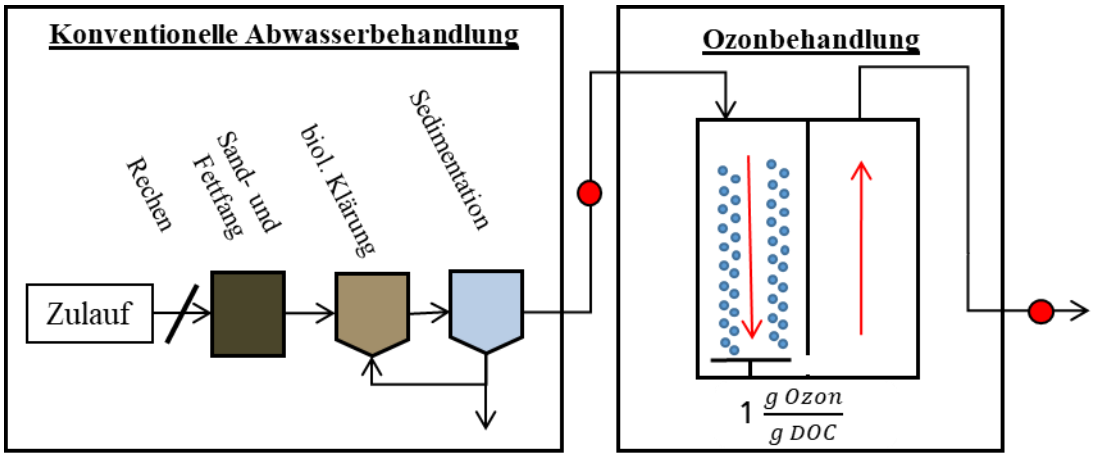

Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Eliminationsleistung einer Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC und einer Verweilzeit von 8 Min. nach dem Nachklärbecken (Sedimentation). Rote Punkte: Probenahmestellen.

Der durchschnittliche DOC im Ablauf des Nachklärbeckens lag während des Probenahmezeitraums bei 4,3±1,1 mg/L. Durch die Ozonbehandlung konnten die Abundanzen aller definierten Cluster signifikant um durchschnittlich 1,5 Log-Stufen reduziert werden. In Abbildung 15 sind die Abundanzen der einzelnen mikrobiologischen Parameter vor und nach der Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC dargestellt und im Anhang 7.8 sind die dargestellten Abundanzen, die dazugehörige Standardabweichung sowie der genaue p-Wert tabellarisch aufgeführt. Alle Einzelwerte, welche an den einzelnen Probenahmetagen ermittelt wurden, befinden sich in Kapitel 7.24 im Anhang.

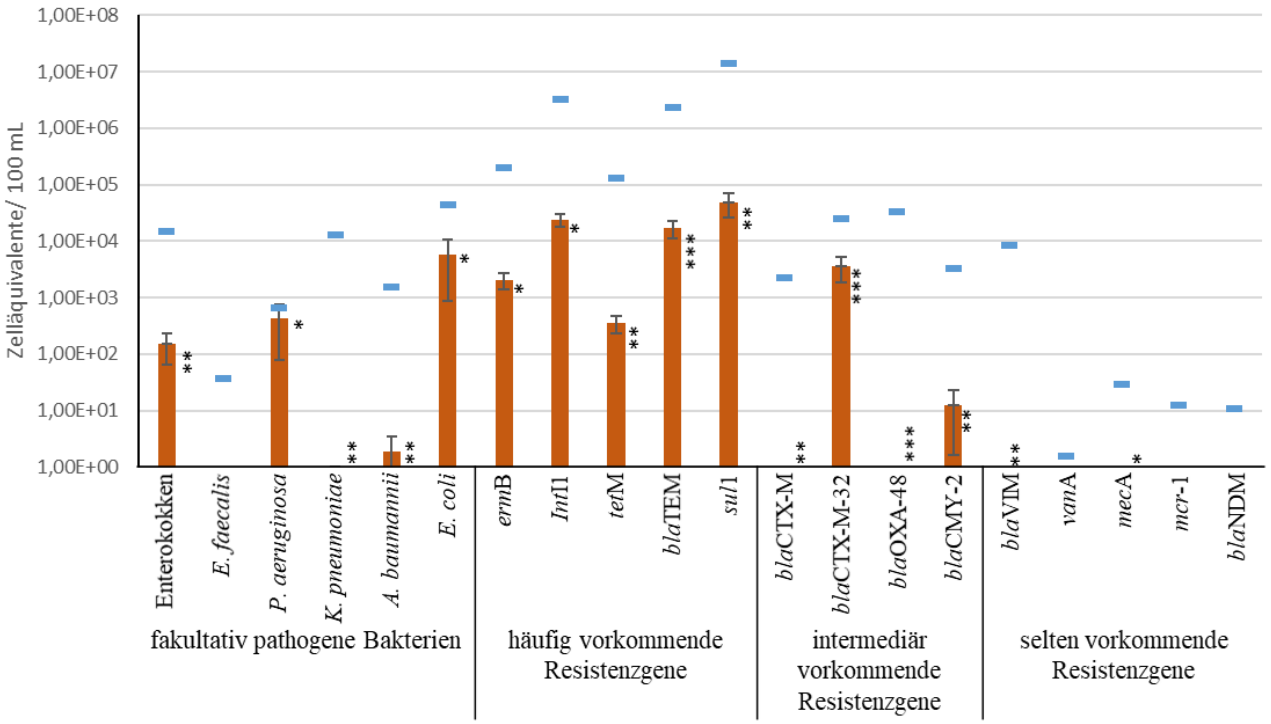

Abbildung 15: Zelläquivalente/100 mL im Zu- (blaue Balken) und Ablauf (orange Säulen) der Ozonanlage mit 1 g Ozon/g DOC und 8 Min. Kontaktzeit. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung im Ablauf (n=4). Signifikante Reduktionen sind mit Sternen gekennzeichnet: *: p≤0,1; **: p≤0,05; ***: p≤0,01.

Fakultativ pathogene Bakterien wurden durch die durchgeführte Ozonbehandlung im Mittel um 1,8 Log-Stufen reduziert. Die Reduktion war für alle nachgewiesenen fakultativ pathogenen Bakterien signifikant und übersteigt die Reduktion der Aktivkohlebehandlung mit sequentieller Sandfiltration und UV-Behandlung um eine Log-Stufe. Auffällig war die starke Streuung der Reduktion für unterschiedliche Bakterienarten. So konnte *P. aeruginosa* lediglich marginal von $6{,}72 \times 10^2$ auf $4{,}21 \times 10^2$ Zelläquivalente/100 mL reduziert werden. Sowohl *K. pneumoniae* als auch *E. faecalis* wurden jedoch um 4 Log-Stufen von $1{,}24 \times 10^4$ resp. $3{,}62 \times 10^1$ Zelläquivalente/100 mL, unter die Nachweisgrenze reduziert.

Die Reduktion der *häufig vorkommenden Antibiotikaresistenzgene* variierte in geringerem Maße um 0,5 Logstufen. Das *tet*M-Resistenzgen wurde um 2,6 Log-Stufen auf $3{,}55 \times 10^2$ Zelläquivalente/100 mL und das Resistenzgen *erm*B gegen das verbreitete Makrolidantibiotikum Erythromycin von $1{,}94 \times 10^5$ auf $2{,}04 \times 10^3$ Zelläquivalente/100 mL reduziert. Insgesamt konnten die mikrobiologischen Parameter dieses Clusters im Durchschnitt um 2 Log-Stufen reduziert werden.

Die Eliminationsleistung der *intermediär vorkommenden Resistenzgene* war dagegen stark abhängig von den einzelnen Parametern. So wurden die Gene *bla*Oxa-48, und *bla*CTX-M bis zu 4 Log-Stufen unter das Detektionslimit reduziert, während *bla*CTX-M-32 lediglich von $2{,}53 \times 10^4$ auf $3{,}55 \times 10^3$ Zelläquivalente/100 mL (0,9 Log-Stufen) reduziert wurde.

Selten vorkommende Resistenzgene (*bla*VIM, *van*A, *mec*A, *mcr*-1, *bla*NDM) konnten durch die Ozonbehandlung vollständig reduziert werden (Elimination) bzw. nicht mehr nachgewiesen werden. Bei diesem Cluster kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die Elimination auf einer hohen Reduktion, oder auf den bereits im Zulauf geringen

Konzentrationen beruht. Das MRSA (Methicillin resistente *Staphylococcus aureus*) assoziierte *mec*A Gen war mit lediglich $2{,}91 \times 10^1$ Zelläquivalente/100mL im Ablauf des Nachklärbeckens vorhanden. Somit war keine Aussage über die maximal mögliche Reduktion dieser Gene durch die Ozonbehandlung möglich.

Die zum Teil starke Streuung der Reduktionsleistungen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen zeigt, dass unterschiedliche Mikroorganismen unterschiedlich empfindlich für dieses Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung sind. Grundsätzlich ist auch die Reduktion von Antibiotikaresistenzgenen nicht direkt abhängig von den Resistenzgenen, sondern viel mehr von den Trägerorganismen dieser Resistenzgene.

Vergleichbare Untersuchungen zur Ozonbehandlung von Abwasser haben ebenfalls gezeigt, dass insbesondere *P. aeruginosa* fähig ist, einer Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC bei einem durchschnittlichen DOC von 10±2,3mg/L zu widerstehen, während Enterokokken um 2 Log-Stufen reduziert werden konnten (Alexander et al. 2016). Diese stehen in Übereinstimmung mit weiteren Untersuchungen die, bei Ozonkonzentrationen von 0,7 g Ozon/g DOC eine Reduktion von ausgewählten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen um 1-2 Log-Stufen beobachten konnten. Dabei wurden auch Enterokokken-Spezies beobachtet, welche sich als robuster gegen eine Ozonbehandlung erwiesen (Luddeke et al. 2015). Diese stark variierenden Reduktionen lassen sich auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Bakterien und damit deren Robustheit gegenüber der Oxidation durch Ozon zurückführen. Die mangelnde Reduktion von *P. aeruginosa* kann z.B. auch auf deren hohen GC-Gehalt im Genom und der damit einhergehenden geringeren Geschwindigkeitskonstanten von Ozon zu den Basen Guanin, Cytosin und Adenin im Vergleich zu Thymin zurückzuführen sein. Hinzu kommt eine starke Neigung von *P. aeruginosa* zur Biofilmbildung und damit eine reduzierte Zugänglichkeit des Ozons zum Bakterium (Rasamiravaka et al. 2015). Die sehr hohe Reduktion der Carbapenem-Resistenzgene *bla*VIM und *bla*Oxa-48 von 4 Log-Stufen wiederrum lassen vermuten, dass diese Resistenzgene zu einem überwiegenden Teil in Bakterien vorliegen, welche in besonderem Maße anfällig gegen Ozon sind. Beide Gene sind, als Plasmid-lokalisierte Carbapenemasen, sehr häufig in *K. pneumoniae* assoziiert beschrieben. Auch *K. pneumoniae* wurde durch die Ozonung von $1{,}27 \times 10^4$ unter das Detektionslimit reduziert (Ikonomidis et al. 2005, Poirel et al. 2012).

Allgemein zeigte sich, dass die Reduktion der mikrobiologischen Kontaminanten durch die Ozonbehandlung offensichtlich stark vom Zielorganismus und dessen entsprechenden Eigenschaften abhängig ist (oxidative Stress Antwort). Im Mittel liegt die Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen bei 1,5 bis 2 Log-Stufen. In Kombination mit der konventionellen Klärung ist die durchgeführte Ozonbehandlung in der Lage, die hygienisch sehr kritischen, *selten vorkommenden Resistenzgene* unter die Nachweisgrenze zu reduzieren. Die übrigen Resistenzgene sowie fakultativ pathogene Bakterien konnten die Ozonung jedoch in relevanten Konzentrationen passieren (*bla*TEM: $1{,}70 \times 10^4$ und *E. coli:* $5{,}86 \times 10^3$ Zelläquivalente/100 mL).

In der Gesamtbetrachtung eignet sich ein solches Ozonverfahren für den Einsatz als zusätzliches Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung mit dem Ziel der Reduktion von mikrobiellen Kontaminationen. Eine Bewertung aus Sicht der Spurenstoffreduktion würde abweichend ausfallen, eine Betrachtung hinsichtlich der Spurenstoffreduktion ist jedoch nicht Inhalt dieser Arbeit.

Für eine verbesserte mikrobiologische Eliminationsleistung bietet sich eine Erhöhung der eingesetzten Ozonkonzentration oder der hydraulischen Verweilzeit an. In welchem Umfang höhere Ozonkonzentrationen oder eine verlängerte Verweilzeit das Reduktionsverhalten der einzelnen Antibiotikaresistenzen bzw. fakultativ pathogenen Bakterien beeinflussen, wird in Kapitel 3.4 beschrieben.

3.3.4 Ozonbehandlung mit sequentieller UV-Bestrahlung

Eine Kombination von Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung bietet, bedingt durch ihre unterschiedlichen Wirkungsweisen, mögliche synergetische Effekte. Zur Überprüfung einer verbesserten Reduktionseffizienz von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen wurden die bereits genannten Einzelverfahren als sequentielles Kombinationsverfahren nacheinander mit realer Abwassermatrix durchgeführt (vgl. Abbildung 16). Der Ablauf des Nachklärbeckens wurde für 8 Minuten mit 1 g Ozon/g DOC behandelt und anschließend mit einer UV-Dosis von 400 J/m² bei 254 nm für 1 Sekunde bestrahlt.

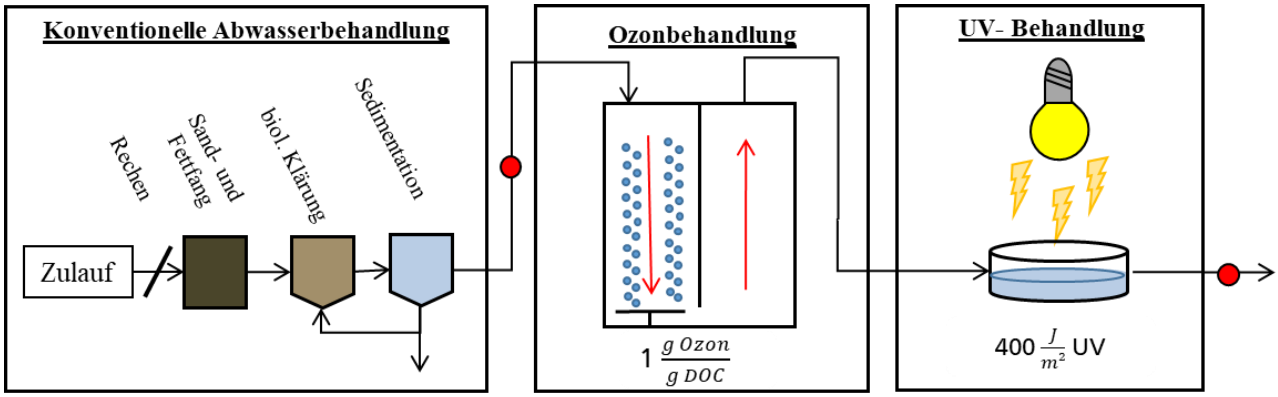

Abbildung 16: Schematische Darstellung des Verfahrens der sequentiellen Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung nach dem Nachklärbecken. Rote Punkte: Probenahmestellen.

Die Reduktion von mikrobiellen Kontaminanten durch das sequentielle Verfahren lag bei durchschnittlich 1,8 Log-Stufen. Der Effekt der sequenziellen Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung auf die Abundanz von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen sind in Abbildung 17 grafisch dargestellt. Eine tabellarische Zusammenfassung der ermittelten Abundanzen an den einzelnen Probenahmentagen sowie deren Mittelwerte sind im Anhang in Kapitel 7.9 und 7.24 aufgeführt.

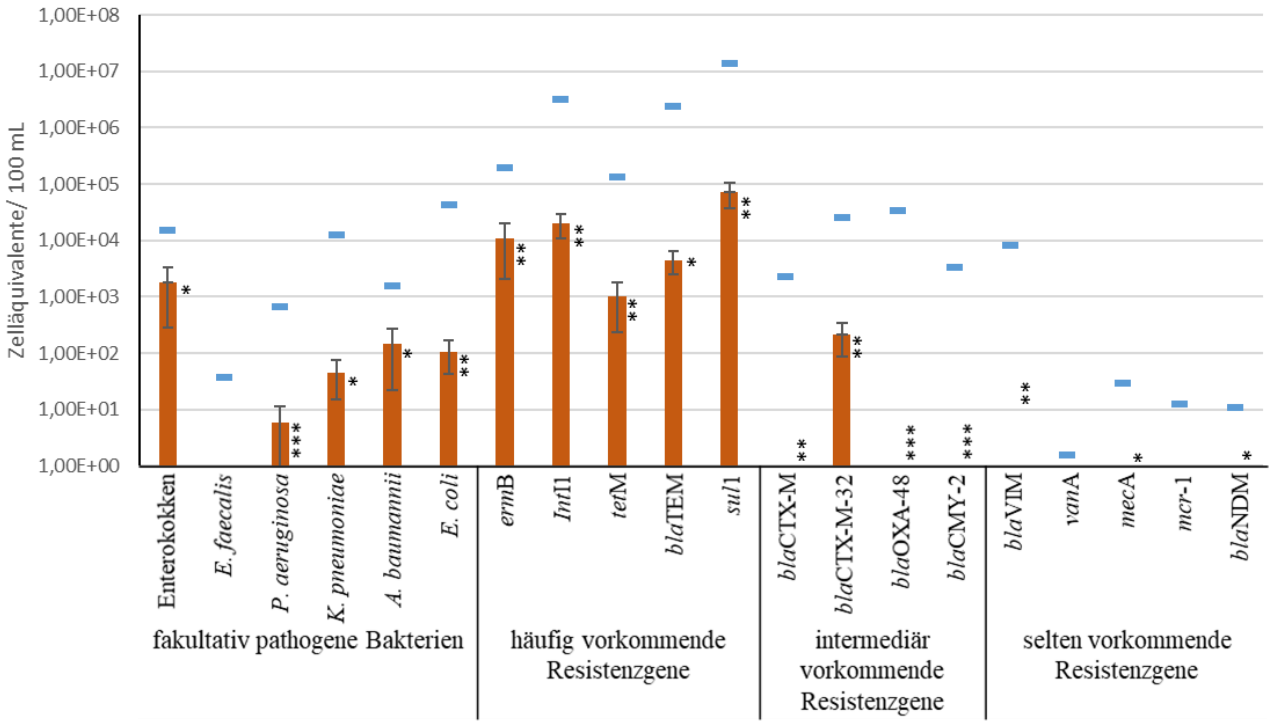

Abbildung 17: Zelläquivalente/100 mL vor (blauer Balken) und nach (orange Säulen) der Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC und sequentieller UV-Bestrahlung mit 400 J/m². Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Abundanzen im Ablauf (n=4). Signifikante Reduktionen sind mit Sternen gekennzeichnet: *: p≤0,1; **: p≤0,05; ***: p≤0,01.

Durch die Kombination von Ozon und UV konnte bei fakultativ pathogenen Bakterien eine durchschnittliche Reduktion von 1,6 Log-Stufen erreicht werden. Enterokokken konnten signifikant um eine Log-Stufe reduziert werden und speziell *E. faecalis* wurde im Ablauf nicht mehr nachgewiesen. Auch der, während der Ozonbehandlung als robust beobachtete, *P. aeruginosa* konnte im verstärkten Umfang von $6{,}72 \times 10^{2}$ auf $5{,}97 \times 10^{0}$ Zelläquivalente/100 mL (2 Log-Stufen) reduziert werden. Die Reduktion von *K. pneumoniae* und *A. baumannii* war um eine Log-Stufe geringer als bei der einer alleinstehenden Ozonbehandlung (bis 3 Log-Stufen). Dies kann der variierenden Abwassermatrix geschuldet sein, Dennoch zeigt sich aber immer noch eine signifikante Reduktion.

Das Cluster der *häufig vorkommenden Antibiotikaresistenzgene* wurde um durchschnittlich 2 Log-Stufen reduziert. Die bereits weit verbreiteten Resistenzgene dieses Clusters wurden durch die sequentielle Behandlung mit Ozon und UV in vergleichbarem Umfang reduziert wie bei alleiniger Ozonbehandlung. Die Reduktion der *intermediär vorkommenden Resistenzen* betrug im Mittel 2,8 Log-Stufen. Das sequentielle Verfahren erzielte damit eine um 0,2 Log-Stufen höhere Reduktion als eine alleinige Ozonbehandlung. Drei Resistenzgene (*bla*CTX-M, *bla*OXA-48 und *bla*CMY-2) konnten sogar unter das Detektionslimit reduziert werden, während *bla*CTX-*32* lediglich um 2 Log-Stufen reduziert wurde. Aus dem Cluster der *selten vorkommende Resistenzgene* wurden alle Resistenzgene unter das Detektionslimit reduziert.

Die durchschnittliche Reduktion der Antibiotikaresistenzgene aller Cluster wurde durch das sequentielle Verfahren im Verhältnis zur separaten alleinigen Ozonbehandlung nochmals geringfügig verbessert. Die durchschnittliche Reduktionleistung aller untersuchten

Resistenzgene betrug bei der alleinigen Ozonbehandlung 1,9 Log-Stufen und bei der sequentiellen Ozon/UV-Behandlung 2 Log-Stufen.

Fakultativ pathogene Bakterien, welche jedoch durch die alleinige Ozonbehandlung nur unzureichend reduziert wurden (*P. aeruginosa* mit 0,2 Log-Stufen oder *E. coli* mit 0,8 Log-Stufen), konnten durch das sequentielle Verfahren jedoch in erhöhter Weise mit *E. coli* um 2,6 Log-Stufen und *P. aeruginosa* um 2 Log-Stufen reduziert werden. So befinden sich bei der Verwendung des identischen Zulaufes nach der Ozonbehandlung noch $4{,}21 \times 10^2$ Zelläquivalente/100 mL an *P. aeruginosa* im Ablauf, bei einer sequentiellen Behandlung jedoch lediglich 5,97 Zelläquivalente/100 mL.

Bei Antibiotikaresistenzgenen wurden solche synergetischen Effekte nicht beobachtet. Das lässt darauf schließen, dass der synergetische Effekt lediglich bei vereinzelten Bakterienspezies auftritt, welche gegen die einzelnen Prozesse eine Robustheit aufweisen oder die Reparaturmechanismen des Bakteriums mit zwei unterschiedlichen Arten von auftretenden Schäden kein Regenerationspotential mehr besitzen. Besonders robuste Spezies, wie der ozonrobuste *P. aeruginosa*, zeigen sowohl ein direktes und indirektes Risikopotential, welches durch Infektionsgefahr oder Weitergabe von Resistenzgenen über horizontalen Gentransfer begründet ist (Lepper et al. 2002, Neuhauser et al. 2003). Demzufolge sollte im Besonderen die Reduktion von robusten Spezies als Indikator zur Bewertung der mikrobiologischen Reinigungsleistung von Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung berücksichtigt werden.

Obwohl die durchschnittliche Eliminationsleistung von sowohl fakultativ pathogene Bakterien als auch Antibiotikaresistenzgenen nur in geringerem Umfang verbessert wird (1,93 Log-Stufen für die alleinige Ozonbehandlung und 1,94 Log-Stufen für die sequentielle Behandlung), stellt die zusätzliche UV-Behandlung eine sinnvolle Ergänzung der Ozonbehandlung zur Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen dar. Denn sie ermöglicht es, robustere Spezies und deren Antibiotikaresistenzgene im Abwasser zu reduzieren und minimiert somit das Risikopotential einer Selektion, welches bei alleinstehenden Verfahren oftmals besteht.

3.3.5 Ultrafiltration

Die Reduktionseffizienz von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen durch Ultrafiltration wurde an zwei unterschiedlichen Ultrafiltrationseinheiten im Pilotmaßstab ermittelt. Ultrafiltration 1 war mit einer 80 m² großen Membran ausgestattet, deren Porendurchmesser bei 20 nm lag und wurde bei einem Betriebsdruck <1 bar mit einer Fluxrate von 70 L/m²h im inside/out-Modus betrieben. Ultrafiltration 2 besaß eine Membran mit einer Porengröße von 25 nm und erreichte im outside/in-Modus bei einem Betriebsdruck <1 bar eine Fluxrate von 35 L/m²h. Beide Ultrafiltrationseinheiten verfügten über einen Vorfilter mit einer Porengröße von 400 µm. In der Prozessanordnung wurden beide Ultrafiltrationseinheiten mit dem Ablauf des Nachklärbeckens (Sedimentation) betrieben (vgl. Abbildung 18).

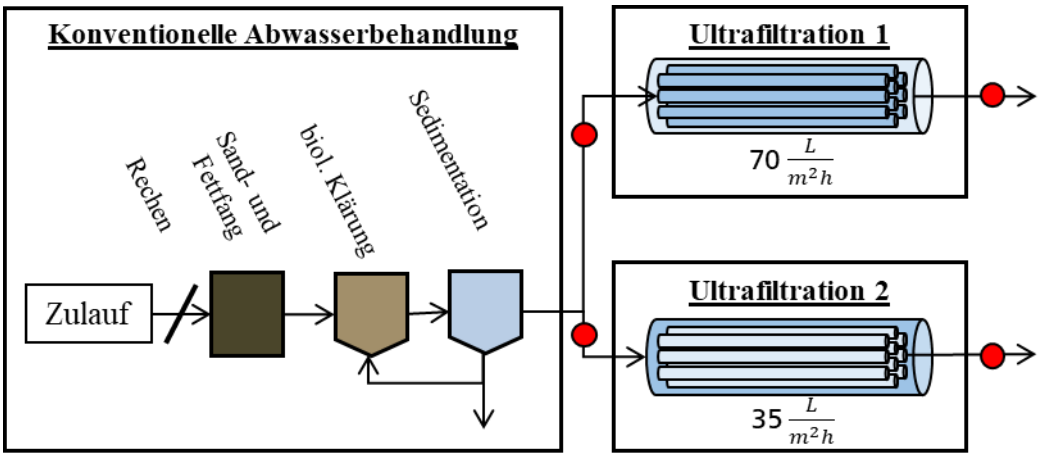

Abbildung 18: Schematische Darstellung der Anordnung der Ultrafiltrationseinheiten und Probenamestellen nach dem Nachklärbecken. Rote Punkte: Probenahmestellen.

Beide untersuchten, mit dem Ablauf der Nachklärung betriebenen Ultrafiltrationseinheiten konnten fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in signifikanten Umfang bis zu 7 Log-Stufen reduzieren.

3.3.5.1. Ultrafiltration 1

Ultrafiltration 1 konnte einen Großteil der Antibiotikaresistenzgene und fakultativ pathogenen Bakterien unter das Detektionslimit sowie die übrigen Parameter signifikant um ca. 4 Log-Stufen, reduzieren.

Die Reduktionen der einzelnen Parameter in Relation zum Ablauf des Nachklärbeckens sind in Abbildung 19 dargestellt. Die genauen Abundanzen im Zu- und Ablauf von Ultrafiltration 1 sowie Einzelwerte einzelner Probenahmetage befinden sich in Kapitel 7.10 und 7.24 im Anhang.

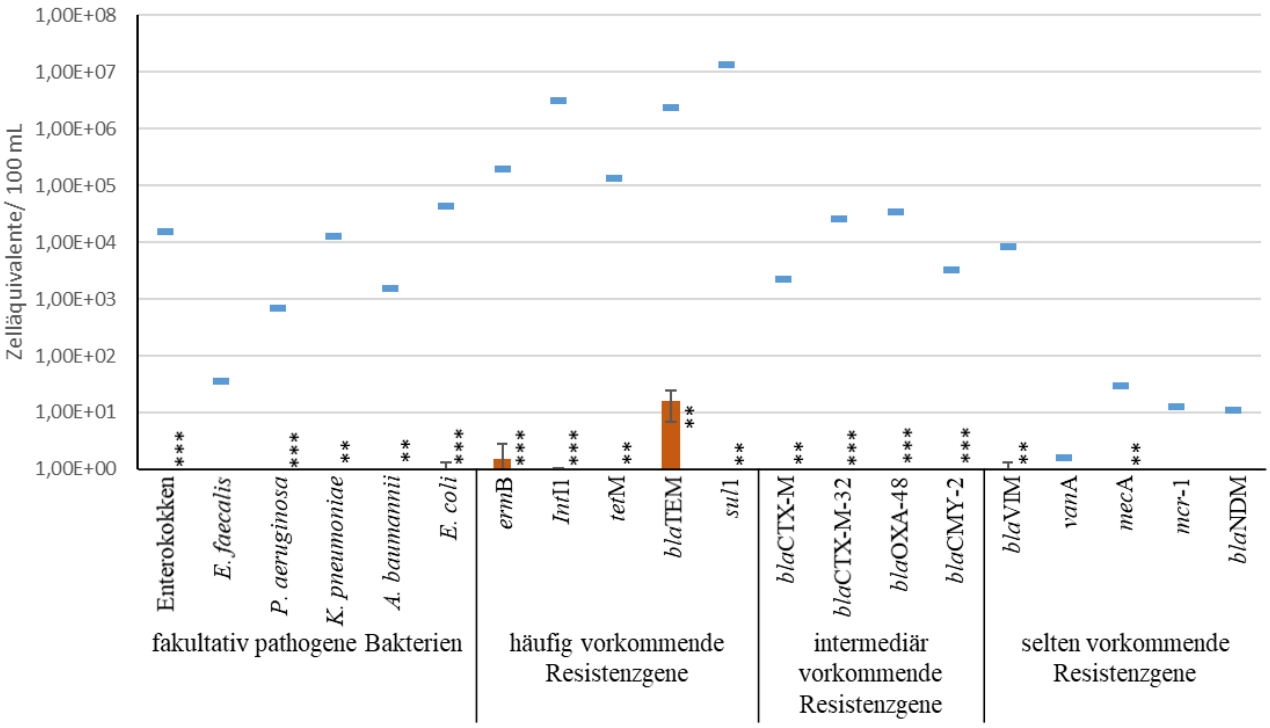

Abbildung 19: Zelläquivalente im Zu- (blaue Balken) und Ablauf (orange Säulen) der Ultrafiltration 1. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Abundanzen im Ablauf (n=4). Signifikante Reduktionen sind mit Sternen gekennzeichnet: *: p≤0,1, **; p≤0,05, ***; p≤0,01.

Im Ablauf von Ultrafiltration 1 konnten die beiden häufig vorkommenden Antibiotikaresistenzgene *erm*B und *bla*TEM mit $1{,}51 \times 10^{1}$ und $1{,}58 \times 10^{1}$ Zelläquivalente/100 mL nachgewiesen werden. Enterokokken, *P. aeruginosa* und *E. coli* sowie *int*I1 (mitverantwortlich für horizontalen Gentransfer) und *bla*VIM waren noch in geringen Konzentrationen über 10 Zelläquivalente/L (<1 Zelläquivalente/100 mL), d.h. nahe des Detektionslimits, im Ablauf der Ultrafiltration vorhanden. Die Signifikanz der Reduktion ist für den Großteil der Parameter mit einem p-Wert <0,01 kalkuliert.

3.3.5.2. **Ultrafiltration 2**

Die Ultrafiltrationseinheit 2 konnte ebenfalls einen Großteil der untersuchten Parameter signifikant reduzieren (bis 3,4 Log-Stufen). In Abbildung 20 sind die einzelnen Abundanzen der untersuchten Parameter vor und nach der Filtration grafisch dargestellt. Die dazugehörigen Abundanzen sind im Anhang 7.11 tabellarisch aufgeführt und die Einzelwerte der Abundanzen für den jeweiligen Probenahmetage sind im Anhang in Kapitel 7.24 zusammengefasst.

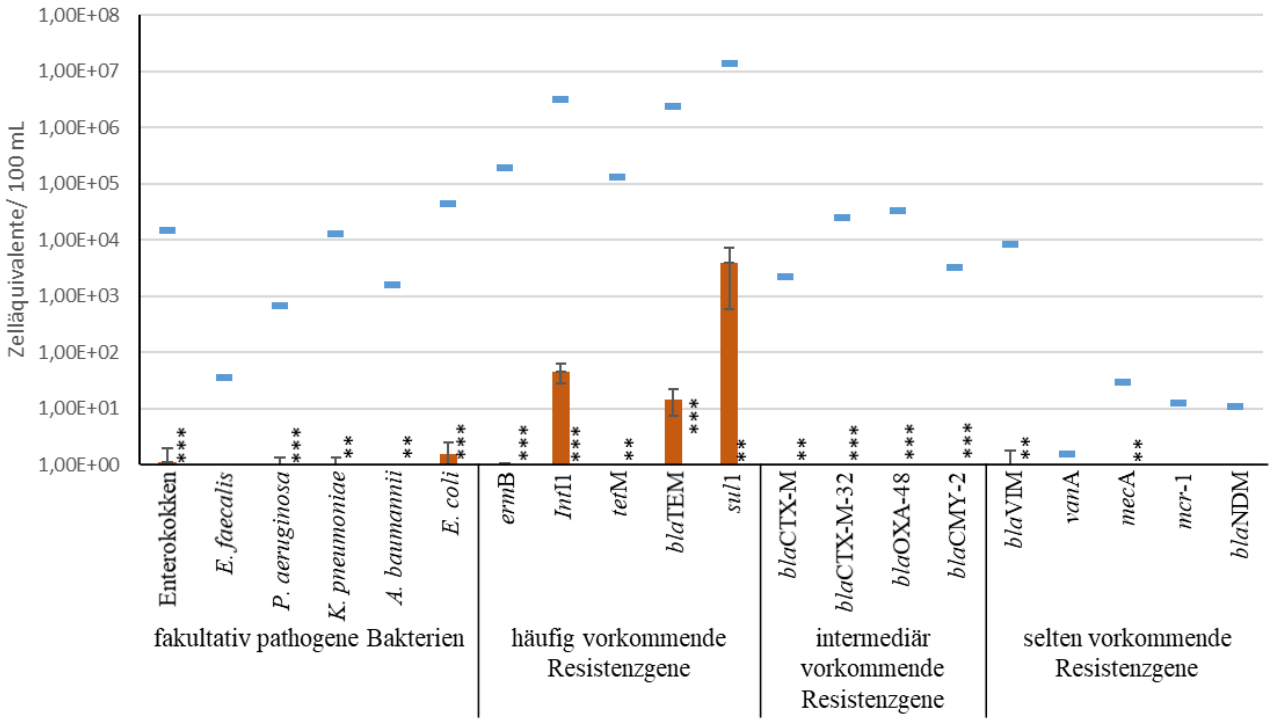

Abbildung 20: Zelläquivalente im Zulauf (blau) und Ablauf (orange) der Ultrafiltration 2. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Abundanzen im Ablauf (n=4). Signifikante Reduktionen sind mit Sternen gekennzeichnet: *: p≤0,1; **: p≤0,05; ***: p≤0,01.

E. faecalis und *A. baumannii* wurden durch die Ultrafiltration 2 unter das Detektionslimit reduziert, während die übrigen fakultativ pathogenen Bakterien mit maximal 1,53 Zelläquivalente/100 mL (*E. coli*) in sehr geringen Konzentrationen noch nachgewiesen werden konnten.

Bei dem Cluster der häufig vorkommenden Resistenzgene konnte eine durchschnittliche Reduktion von 4,75 Log-Stufen erreicht werden, wobei, im Gegensatz zu Ultrafiltration 1, lediglich das Tetracykline-Resistenzgen *tet*M unter das Detektionslimit bzw. *erm*B bis nahe des Detektionslimits reduziert wurde. Das weitverbreitete Sulfonamid-Resistenzgen s*ul*1 war mit einer Abundanz von $3{,}93 \times 10^{3}$ trotz einer Reduktion von 4 Log-Stufen die am häufigsten auftretende Antibiotikaresistenz im Ablauf der Ultrafiltration 2. Intermediär und *selten vorkommende Resistenzgene* konnten mit Ausnahme von *bla*VIM ($9{,}39 \times 10^{-1}$ Zelläquivalente/100 mL im Ablauf) unter das entsprechende Detektionslimit reduziert werden.

3.3.5.3. Vergleich der untersuchten Ultrafiltrationseinheiten

Beide Ultrafiltrationseinheiten, die sich in ihrer Porengröße sowie angewandten Fluxraten, unterscheiden, sind in der Lage, sowohl fakultativ pathogene Bakterien als auch Antibiotikaresistenzgene in großem Maße aus dem Abwasserstrom zu entfernen. Mehr als die Hälfte der untersuchten Parameter (13 von 20 mikrobiellen Parametern bei Ultrafiltration 1 und 11 von 20 Parametern bei Ultrafiltration 2) konnten unter ihr entsprechendes Detektionslimit reduziert werden.

Obwohl durch das Ausbilden einer Deckschicht auf der Membranoberfläche auch Partikel zurückgehalten werden können, die kleiner als der Porendurchmesser der Membran sind, konnten dennoch einige wenige Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in dem Ablauf beider

Ultrafiltrationsanlagen nachgewiesen werden. Ein Bruch in der Membranoberfläche als Ursache hierfür kann ausgeschlossen werden, da dieser durch die einhergehende schlagartige Druckänderung eine Störung in der Prozessführung verursacht hätte. Weniger gut nachweisen lassen sich indes Mängel in der Verarbeitung des Moduls. Hier ist der Übergang vom Modul zur Membranfaser eine bekannte Schwachstelle (Crozes et al. 1997). Da die nachweisbaren Abundanzen allerdings nur bei einzelnen Parametern (*sul*1, *intl*I, *bla*TEM, *E. coli*) auftraten, ist eine Kontamination im Rohrsystem nach der Ultrafiltration ebenfalls denkbar. Es war durch den technischen Aufbau beider Anlagen nicht möglich, die Probe direkt am Auslauf des Filtermoduls zu nehmen, sondern lediglich nach Durchfluss von einigen Metern Rohrsystem. Die beobachteten geringzähligen Kontaminationen könnten demzufolge auch durch eine Kontamination der ablaufseitigen Rohrsysteme verursacht worden sein. Beim direkten Vergleich der Ultrafiltration 1 und Ultrafiltration 2 ist trotz der unterschiedlichen Porengrößen lediglich eine Steigerung der Reduktion um 0,3 Log-Stufen erkennbar. Da der durchschnittliche Bakteriendurchmesser (600-1000nm) allerdings um den Faktor 50 größer ist als der Porendurchmesser, war durch einen Unterschied der Poren von 5 nm kein signifikanter Unterschied in der Reduktionsleistung zu erwarten.

Hinsichtlich der Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen ist eine Ultrafiltration eine sinnvolle und notwendige Ergänzung der konventionellen Klärung, die die untersuchten mikrobiellen Parameter auf ein Niveau nahe der Detektionsgrenze reduzieren konnte. Jedoch sind die untersuchten Ultrafiltrationseinheiten nicht als abschließend dichte Barriere (Desinfektion) zu werten. Neben den eigenen Untersuchungen haben auch mehrere internationale Untersuchungen gezeigt, dass im Ablauf von Ultrafiltrationseinheiten bakterielle Kontaminationen in geringen Konzentrationen vorhanden sein können (Bourgeous et al. 2001, Chan et al. 2019, Hembach et al. 2019, Salladini et al. 2007). Salladini et al. konnte das Auftreten von Coliformen im Ablauf einer Ultrafiltration (20 nm Porendurchmesser) mit den durchgeführten Rückspülungen verbinden. Er erklärt die anschließend auftretende Kontamination mit Coliformen mit der Zerstörung des Filterkuchens, welcher zunächst eine Immobilisierung der Bakterien vor der Membran bewirkte.

Für den Gesamtprozess der Abwasserbehandlung mit dem Ziel der Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen ist das Verfahren der Ultrafiltration jedoch nicht uneingeschränkt zu empfehlen. Es bleibt zu berücksichtigen, dass fakultativ pathogene Bakterien und Träger von Antibiotikaresistenzen durch eine Ultrafiltration lediglich physikalisch zurückgehalten werden. Diese werden zwar dem Abwasserstrom entzogen, liegen aber im Retentat der Ultrafiltration weiterhin vor, während sie durch die alternative Ozonbehandlung oder UV-Bestrahlung tatsächlich beschädigt oder inaktiviert werden. Ob das Retentat dadurch ein gesundheitliches Risiko darstellt und eine weitere Behandlung nötig ist, wird im folgenden Kapitel beschrieben und die Ergebnisse diskutiert.

3.3.5.4. **Retentat der regelmäßigen Rückspülung der Ultrafiltration-Membranen**

Intakte Bakterien im Retentat von Membranfiltrationen sind ein wesentliches Problem der Ultrafiltration, welches bei oxidativen Abwasserbehandlungstechniken wie Ozon nur zum Teil auftritt, da ein wesentlicher Teil durch das Verfahren tatsächlich inaktiviert wird (Alexander et al. 2016). Fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene werden durch die Ultrafiltration zurückgehalten und anschließend durch die Rückspülungsschritte der

Membranreinigung in einem kleineren Volumen konzentriert. Um das Retentat der wässrigen Rückspülung weitergehend zu untersuchen, wurden zwei Probenahmen zur Analyse des Zulaufs und des Retentats nach einem vollständigen Filtrationszyklus (20 min) durchgeführt. Hierzu wurde während des Gesamten Rückspülzeitraums ein Teil des Rückspülwassers durch ein Ventil beprobt, sodass ein eine repräsentative Probe über das gesamte Rückspülvolumen analysiert werden konnte. Bakterielle Kontaminationen welche in irreversiblen Fouling (bzw. Fouling, welches sich nur durch die chemische Reinigung entfernen lässt) vorkommen können durch diese Herangehensweise allerdings nicht beachtet werden. Die Abundanzen ausgewählter fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene im Zulauf sowie im Retentat beider Ultrafiltrationseinheiten sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Mittelwert der untersuchten Auswahl an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Zulauf und Retentat beider Ultrafiltrationseinheiten mit 20 nm und 25 nm Porendurchmesser (n=2).

	Ultrafiltration 1		Ultrafiltration 2	
	Zulauf	Retentat	Zulauf	Retentat
E. coli	2,79E+02	1,25E+04	1,58E+04	1,39E+05
A. baumannii	3,09E+01	3,30E+02	4,03E+02	2,01E+03
Enterokokken.	1,49E+02	1,40E+04	1,79E+04	8,32E+04
*bla*TEM	3,09E+03	1,20E+05	2,03E+05	1,07E+06
*erm*B	1,18E+03	7,15E+04	9,96E+04	7,60E+05
*tet*M	5,34E+02	2,76E+04	7,30E+04	3,18E+05
*bla*Oxa-48	6,56E+01	2,95E+03	1,83E+04	3,19E+04
*sul*1	1,72E+05	2,41E+06	1,76E+05	1,38E+07
*int*I1	1,65E+04	7,49E+05	2,45E+04	4,94E+06
*bla*CTX-M	<LOD	1,08E+03	4,80E+05	2,23E+04
*bla*CTX-M-32	<LOD	9,17E+03	1,03E+06	1,14E+05

Das Retentat von UF 1 enthält um ca. 2 Log-Stufen höhere Konzentrationen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen als im Zulauf nachgewiesen werden konnten. Lediglich *A. baumannii* zeigte im Vergleich zu den restlichen fakultativ pathogenen Bakterien von $3{,}09 \times 10^{1}$ auf $3{,}03 \times 10^{2}$ Zelläquivalente/100 mL eine Erhöhung um 1 Log-Stufe.

Die untersuchten Resistenzgene zeigen vergleichbare Anreicherungen im Retentat. Das Gen *bla*TEM stieg von $3{,}09 \times 10^{3}$ auf $1{,}20 \times 10^{5}$ Zelläquivalente/100 mL, *tet*M reicherte sich von $5{,}34 \times 10^{2}$ auf $2{,}76 \times 10^{4}$ Zelläquivalente/100 mL an und das Resistenzgen *bla*OXA-48 von $6{,}56 \times 10^{1}$ auf $2{,}95 \times 10^{3}$ Zelläquivalente/100 mL. Besonders auffällig war, dass die Resistenzgene *bla*CTX-*M* und *bla*CTX-M-*32* im Zulauf nicht nachgewiesen werden konnten, im Retentat aber in erhöhten Konzentrationen von $1{,}08 \times 10^{3}$ für *bla*CTX-M und $9{,}17 \times 10^{3}$ Zelläquivalente/100 mL für *bla*CTX-M-32 nachgewiesen werden konnten.

Im Vergleich zu Ultrafiltration 1 stieg die Abundanz an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen im Retentat von Ultrafiltration 2 im Verhältnis zum Zulauf geringer an. Die Konzentrationen von *E. coli* erhöhte sich von $1{,}58 \times 10^{4}$ Zelläquivalente/100 mL auf $1{,}39 \times 10^{5}$ Zelläquivalente/100 mL mit einer Log-Stufe ebenfalls nicht in demselben Ausmaß wie bei Ultrafiltration 1 (2 Log-Stufen). Die Unterschiede der Konzentrierung im Retentat

zwischen den beiden Ultrafiltrationseinheiten kann durch unterschiedlich stark ausgeprägte Deckschichten zustande kommen, deren Entfernung der vorrangige Zweck der Rückspülung mittels einem Wasser/Luft-Gemisch ist. Wenn bei Ultrafiltration 2 aufgrund der geringeren Fluxrate (35 L/m²h), nach der Filtrationszeit zwischen zwei Rückspülungen (20 min) die Deckschicht weniger stark ausgeprägt ist, als bei Ultrafiltration 1 (70 L/m²h), enthält diese auch weniger Biomasse. Während der Rückspülung nach einem festgelegten Zeitintervall wird demzufolge auch weniger Biomasse (biologische Kontamination) freigesetzt. Nach der Hypothese von Salladini et al. (2007), dass der Filterkuchen auch zur mikrobiellen Reduktion beiträgt, würde eine weniger ausgeprägte Deckschicht von Ultrafiltration 2 im Vergleich zu Ultrafiltration 1 auch die geringere Reduktion erklären.

Erste Kalkulationen des Kläranlagenbetreibers zu Ultrafiltration 1 ergaben, dass bei einer vollständigen Behandlung des gesamten Abwasserstroms (110.000 m³) pro Tag ca. 5000 m³ Retentat anfallen. Hiervon ausgehend befinden sich rechnerisch in dem Retentat eines Tages von UF 1 z.B. mit $1{,}65 \times 10^{10}$ Zelläquivalente/d vergleichbare Abundanzen an *A. baumannii* wieder, wie sie im Ablauf der Nachklärung nach konventioneller Behandlung vorhanden sind ($3{,}39 \times 10^{10}$ Zelläquivalente/d). Dies zeigt, dass eine weitere Behandlung des Retentats sinnvoll ist, damit bei einer Rückführung des Retentats in die Belebung der Eintrag von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen nicht weiterhin erhöht wird. Die Tagesfrachten aller untersuchten Parameter für UF 1 sind im Anhang in Kapitel 7.12 gelistet.

Zusätzlich zu den qPCR Untersuchungen wurde, um einen tieferen Einblick in den mikrobiologischen Genpool (Resistom, Virulenzfaktoren und metabolische Gene) zu erhalten, eine Metagenomsequenzierung durchgeführt. Damit wurde eine ergänzende biologische Risikoabschätzung des Retentats möglich. Dieser Überblick über Antibiotikaresistenzgene und Virulenzfaktoren im Retentat, welche von der qPCR nicht erfasst wurden, ist notwendig, um deren Gesundheitsrisiko im weiteren Umgang mit dem Retentat darzustellen. Mögliche Ansätze der Weiterbehandlung sind das Rückführen in die Belebungsbecken sowie die Inaktivierung des Retentats durch thermische oder oxidative Verfahren.

Aus der Metagenomanalyse ergaben sich 1205 Hits (UF 1) und 1201 Hits (UF 2) der Sequenzierung, die mit der Antibiotikaresistenzgendatenbank MvirDB abgeglichen wurden. Von diesen Treffern stellt ein Cluster von β-Lactamasen mit 685 identifizierten Genen die Mehrheit dar, gefolgt von verschiedenen Tetracyclin Resistenzgenen (178 Gene). Es konnten parallel dazu 135 Resistenzgene gegen das Reserveantibiotika Vancomycin und Resistenzen gegen β-Metallo-Lactamasen (128 Gene), wie die KPC Carbapenemasen und *bla*NDM Gene identifiziert werden. Sowohl KPC als auch *bla*NDM Gene wurden getrennt von den übrigen Metallo-β-Lactamasen aufgeführt, da sie Resistenzen gegen nahezu alle β-Lactam-Antibiotika vermitteln und somit von besonderer hygienischer Relevanz sind (Pesesky et al. 2015). In geringerer Häufigkeit konnten auch Resistenzgene gegen Methicillin, Erythromycin und Imipenem nachgewiesen werden. In Abbildung 21 ist die relative Häufigkeit der gefundenen Resistenzen abgebildet. Aufgrund des Nachklärbeckens als Zulaufes beider Ultrafiltrationsanlagen gleichen sich die Zusammensetzungen beider Retentate sehr stark.

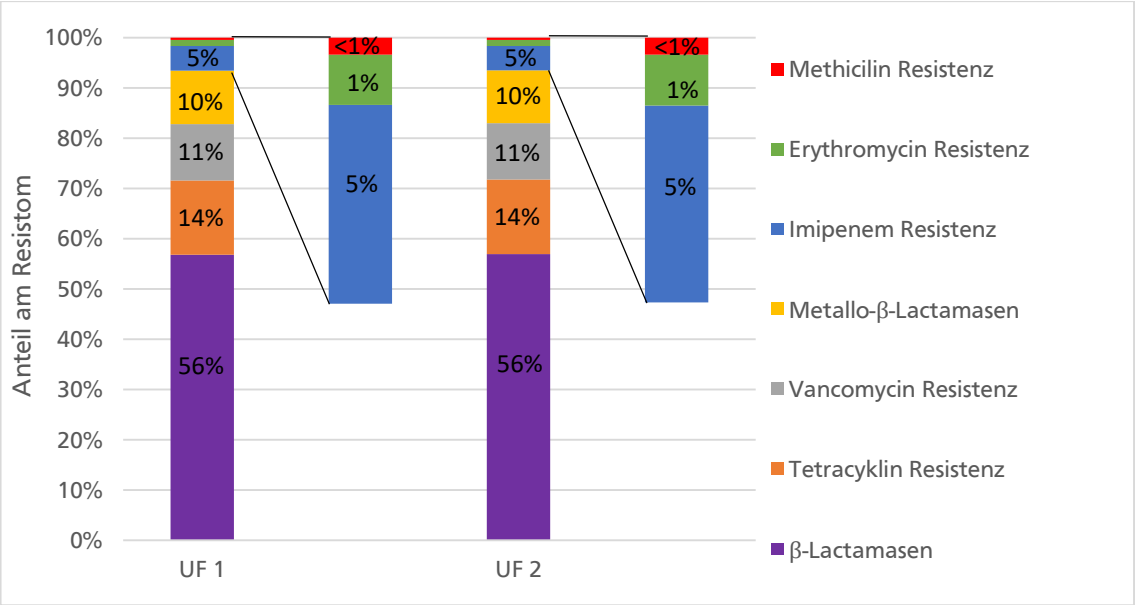

Abbildung 21: Relative Abundanzen an Antibiotikaresistenzgenen im Retentat von UF1 bzw. UF2.

β-Lactamasen machen 56 % des gesamten Resistoms aus, gefolgt von Tetracyclin mit 14 %. Die relativen Anteile der Resistenzen gegen die Antibiotikaklassen sind für β-Lactamasen als auch Tetracyclin-Resistenz vergleichbar mit dem Anteil der entsprechenden Antibiotika an der Gesamtmenge aller verordneter Antibiotika in deutschen Krankenhäusern im Jahr 2017 (Schwabe et al. 2018). Resistenzen gegen das klinisch kritische Reserveantibiotika Vancomycin, trotz geringerem Anteil am Antibiotikaverbrauch von 1,9 %, (Wallmann und Römer 2014) machen im Metagenom 11 % des Resistoms aus. Dieser hohe Anteil beruht auf der Vielzahl unterschiedlicher Resistenzgene. So sind neben dem *van*A Resistenzgen, welches auch in der qPCR nachgewiesen wurde, noch 35 weitere unterschiedliche Resistenzgene, welche eine Vancomycin-Resistenz vermitteln, beteiligt. Resistenzen gegen das veterinär- und humanmedizinisch relevante Antibiotika Tetracyclin machen ca. 14 % der abgeglichenen Sequenzen aus. Resistenzgene gegen das weniger verbreitete Erythromycin machen 1 % aus. Die geringe relative Abundanz der Erythromycin-Resistenzgene in der Metagenomanalyse des Retentats resultiert aus der hohen Varianz an Genvarianten der übrigen Resistenzgene. Für eine Erythromycin-Resistenz konnten lediglich 7 unterschiedliche Genvarianten im Retentat nachgewiesen werden. So hat das *erm*B Gen aus dem Cluster der *häufig vorkommenden Resistenzgene*, zusammen mit 6 weiteren Genvarianten, einen wesentlich geringeren Anteil am Resistom als Resistenzen die durch eine Vielzahl unterschiedlicher Gene verursacht werden könnten. So kann eine Resistenz gegen das seltener verwendete Imipenem durch 13 unterschiedliche Varianten des *bla*VIM Gens vermittelt werden und gegen Vancomycin konnten 36 unterschiedliche Resistenzgene im Retentat nachgewiesen werden. So sind *bla*VIM und *van*A mit einem hohen relativen Anteil am Resistom verantwortlich, obwohl sie einzelnen Resistenzgene *van*A und *bla*VIM dem Cluster der *selten vorkommenden Resistenzgene* zugeordnet sind. Eine vollständige Liste aller identifizierter Resistenzgene ist im Anhang 7.17 aufgeführt.

Bei einem Abgleich mit der Mvir-Datenbank konnten insgesamt 792 (UF 1) bzw. 750 (UF 2) Pathogenitätsinseln und 120 (UF 1) bzw. 306 (UF 2) unterschiedliche Virulenzprotein-kodierende Gene gefunden werden. Unter den 25 am häufigsten identifizierten

Virulenzfaktoren beider Retentate befanden sich mehrere Transposasen der fakultativ pathogenen Bakterien E. *coli, K. aerogenes, P. aeruginosa* und *S. flexneri* sowie das *Pseudomonas* spp. assoziierte β-Lactam-Transposon TN1412.

Da beide Ultrafiltrationseinheiten mit dem Ablauf des Nachklärbeckens betrieben wurden, war zu erwarten, dass auch im Retentat eine, durch die biologische Behandlung bedingte, metabolisch aktive Gesamtpopulation vorhanden ist. Eine Analyse der funktionellen Gene zeigte, dass neben Genen, die dem Kohlenhydratmetabolismus zugeordnet sind, eine große Bandbreite weiterer Gene des bakteriellen Metabolismus und der Biotransformation-Aktivitäten im Retentat vorliegen. Diese Gene machen 6,38 % der funktionellen Gene im Retentat von UF 1 und 5,78 % bei UF 2 aus. Die Präsenz der Gene für Reparaturmechanismen (4,29 % bei UF 1 und 4,35 % UF 2) lassen auf eine mögliche Aktivität innerhalb der Populationen sowie deren Fähigkeit zur Stressbewältigung, z.B. gegen Antibiotika- oder Oxidation-induzierten Stress, schließen. 19 unterschiedliche Rekombinase und Integrase-assoziierte Gene sowie 417 Transposase-assoziierte Gene unter den funktionellen Genen lassen ebenfalls darauf schließen, dass sich das Retentat aktiv an horizontalen Gentransfer beteiligen kann. In Tabelle 13 sind die Gruppen der häufigsten funktionellen Gene und deren prozentualer Anteil aufgelistet.

Tabelle 13: Prozentuale Häufigkeit der funktionellen Gengruppen im Retentat beider Ultrafiltrationsanlagen.

Funktionsgruppe	UF 1	UF 2
Kohlenhydratmetabolismus	8,86 %	8,87 %
Zellprozesse und Zellsignalgebung	6,39 %	6,72 %
Metabolismus	6,38 %	5,78 %
Membrantransport	5,62 %	5,29 %
DNA Prozessierung	5,17 %	4,79 %
Aminosäurenmetabolismus	4,49 %	4,45 %
Vermehrung und Reparaturmechanismen	4,29 %	4,35 %
Nukleotidmetabolismus	2,96 %	2,92 %
Enzymfamilien	2,63 %	2,61 %
Energiemetabolismus	2,46 %	2,33 %
Transkription	2,02 %	1,75 %
Translation	1,88 %	1,88 %
Metabolismus von Cofaktoren und Vitaminen	1,75 %	1,83 %
Falten, Sortierung und Abbau von Proteinen	1,66 %	1,82 %
Glykan-Biosynthese und Metabolismus	1,43 %	1,52 %
Signaltransduktion	1,39 %	1,25 %
Fettmetabolismus	1,08 %	1,11 %
Metabolismus von Terpenoiden and Polyketiden	0,50 %	0,57 %

Kläranlagen inhärente Bakterien wie *Nitrosomonas* spp. und *Accumulibacter* spp. aus der Nitrat- und Phosphatelimination der konventionellen Klärung machen 0,2 % bzw. 0,3 % der Gesamtpopulation im Retentat aus.

Allerdings machen auch fakultativ pathogene Bakterien einen vergleichbaren Anteil der Gesamtpopulation aus. Dadurch besteht das Risiko, dass sich diese teilungsfähigen Bakterien

im Belebtschlamm akkumulieren. Ihr gemeinsamer Anteil liegt bei 0,8 % an der Gesamtpopulation und setzten sich aus 0,4 % *E. coli*, 0,3 % *A. baumannii* und 0,1 % Enterokokken zusammen. Weitere klinisch relevante Bakterien machen 0,4 % für *P. aeruginosa*) und 0,01 % für *S. aureus* aus. Einen Überblick über die Zusammensetzung der Gesamtpopulation, welche auf Speziesebene mehr als 1 % ausmachen ist in Abbildung 22 aufgeführt.

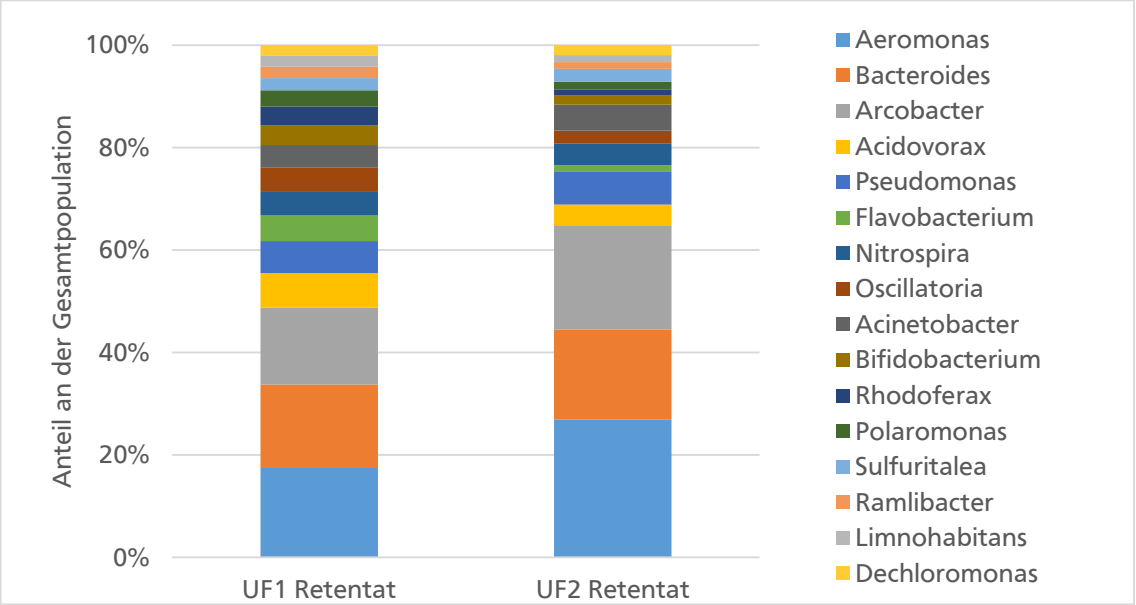

Abbildung 22: Zusammensetzung der Gesamtpopulation auf Speziesebene mit einem Anteil >1 % im Retentat beider Ultrafiltrationseinheiten.

Die Populationsanalyse dient lediglich der Charakterisierung der Retentate. Die notwendige Zulaufsprobe der Ultrafiltration konnte leider aufgrund eines zu geringen Extraktionsvolumen nicht charakterisiert werden, sodass etwaige Populationshifts nicht analysiert wurden.

Eine direkte Rückführung kann zu einer Konzentrierung oder Vermehrung der fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen innerhalb der konventionellen Klärung führen. Es konnte gezeigt werden, dass das Retentat durch die hohen Abundanzen von Transposasen innerhalb der Gesamtpopulation, ein erhöhtes Risiko zum horizontalem Gentransfer aufweist. Infolgedessen könnte sich die Rezyklierung des Retentats in die biologische Reinigung hinsichtlich der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen in der Population als kontraproduktiv erweisen. Diese Vermutung muss in weiteren Untersuchungen allerdings noch bestätigt werden.

Bei der Ultrafiltration für die Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Betrieb an kommunalen Kläranlagen, kann somit nicht ausschließlich die Reduktion isoliert betrachtet werden. Das Verfahren entfernt einen Großteil des hygienischen Risikopotentials aus dem Hauptabwasserstrom und verschiebt es ohne Beeinflussung des Gesamtrisikos in das Retentat, für dessen finalen Verbleib noch keine generelle adäquate Lösung gefunden ist. Zwar eignet sich eine Ultrafiltration zur Reduzierung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen, jedoch muss zusätzlich ein Konzept für den Verbleib des Retentats erstellt werden um eine umfängliche Reduzierung der Kontaminationslage zu erreichen.

Parallel zu den molekularbiologischen Messungen wurden ebenfalls Kultivierungsexperimente für das Retentat beider Ultrafiltrationen durchgeführt, allerdings wurden die selektiven Platten trotz der Verwendung dreier unterschiedlicher Verdünnungen überwachsen, so dass eine quantitative Aussage nicht möglich war. Es konnten jedoch qualitativ vermehrungsfähige *E. coli*, fäkale Enterokokken und *Acinetobacter* spp. in deutlichen Konzentrationen als KBE nachgewiesen werden.

3.3.6 Ergänzende Kultivierungsexperimente zur Verifizierung der Reduktion von Verfahren zur weitergehender Abwasserbehandlung

Zur Verifikation der molekularbiologischen Untersuchungen wurden ergänzende mikrobiologische Untersuchungen mittels selektiver Agaroseplatten durchgeführt. Dadurch konnten die bereits durch molekularbiologische Untersuchungen beobachteten Effizienzen zur Reduktion bestätigt werden. Die ausgezählten mittleren sowie minimalen und maximalen Kolonie bildenden Einheiten (KBE) in 100 mL sind in Kapitel 7.13 aufgelistet und in Abbildung 23 und Abbildung 24 grafisch dargestellt.

Auffällig ist, dass bei der UV-Bestrahlung und der Verwendung der mikrobiologischen Methoden eine höhere Reduktion beobachtet wurde, als durch die molekularbiologischen Methoden festgestellt wurde. So wurde durch die Kultivierung (mikrobiologische Methode) eine mittlere Reduktion von 2 Log-Stufen ermittelt, während durch molekularbiologische Methoden lediglich geringfügige Änderungen der Abundanzen beobachtet wurden. Diese Diskrepanz kann durch die benötigte Regenerationszeit, der durch UV-Bestrahlung gestressten Bakterien, hervorgerufen werden. Dadurch verzögert sich das Wachstum der Bakterien und die Inkubationszeit ist nicht mehr ausreichend, um makroskopisch sichtbare Kolonien zu bilden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit würde jedoch das Aufwachsen einer unspezifischen Begleitflora begünstigen. Derselbe Effekt tritt auch bei dem sequentiellen Verfahren von Ozon und UV-Behandlung auf, wodurch der synergetische Effekt beider Verfahren verstärkt sichtbar wurde. Die Ozonbehandlung sowie die Ultrafiltration erzielten bei den mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen vergleichbare Reduktionen.

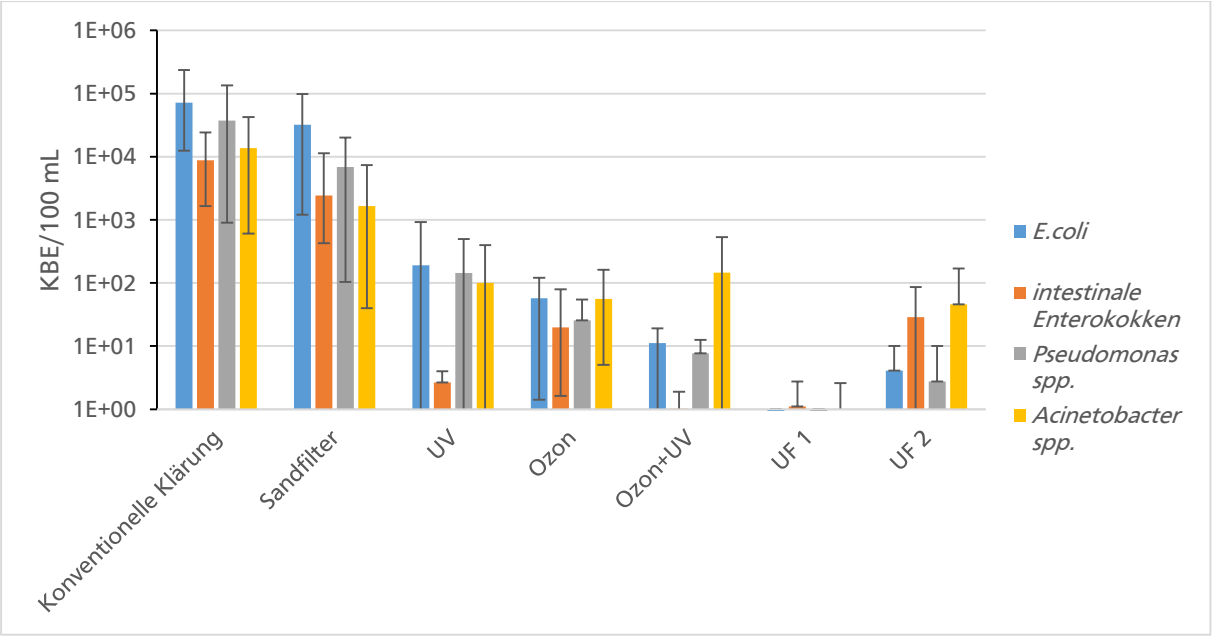

Abbildung 23: Kolonie bildende Einheiten in 100 mL von *E. coli*, Enterokokken, *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. nach den einzelnen Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung. Fehlerbalken repräsentieren den minimale und maximale detektierten KBE/100 mL.

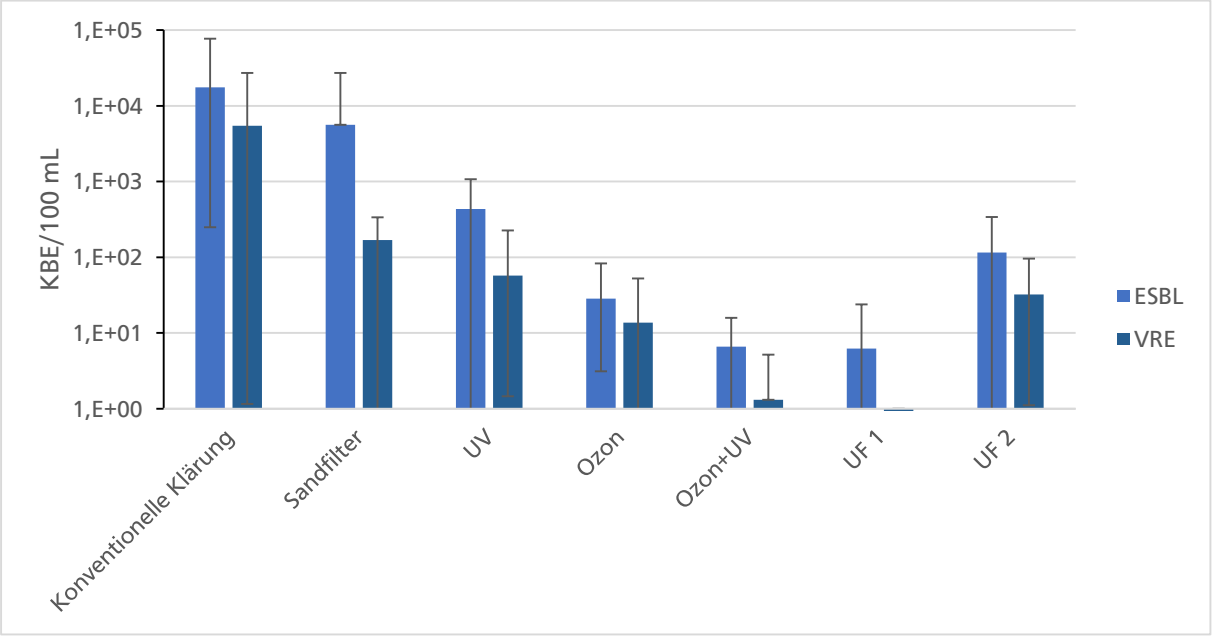

Abbildung 24: Kolonie bildende Einheiten in 100 mL von ESBL-resistenten Bakterien, MRSA und Vancomycin resistenten Enterokokken nach den einzelnen weitergehenden Abwasserbehandlungsverfahren. Fehlerbalken repräsentieren den minimale und maximale detektierten KBE/100 mL.

Beim direkten Vergleich der unterschiedlichen Nachweisverfahren (molekularbiologisch und mikrobiologisch) wurde durch die qPCR bis zur Spezies-spezifischen Ebene differenziert (*E. coli*, *A. baumannii*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*), während bei Kulturverfahren mit der Ausnahme von *E. coli* nur bis zum Genus (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., intestinale

Enterokokken) differenziert wurde. Als Folge dessen können die durch unterschiedliche Analysetiefen ermittelten Abundanzen nicht direkt korreliert werden.

3.3.6.1. Isolatencharakterisierung

Von den ausgewerteten KBE der Kultivierungsexperimente wurden 40 Isolate vom Projektpartner an der Universitätsklinik in Bonn charakterisiert (vgl. Anhang Kapitel 7.16). Im Ablauf der untersuchten weitergehenden Abwasserbehandlungsverfahren konnten mittels Antibiogrammen unterstütz durch MALDI-TOF-Analysen, sowohl Vancomycin resistente Enterokokken (VRE) als auch ESBL resistente Bakterien nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte die hygienisch-klinische Relevanz der im Ablauf der weitergehenden Abwasserbehandlungsverfahren vorhandenen Bakterien bestätigt werden. Es wurden 3-MRGN (Multi-Resistente Gram Negative) Bakterien nachgewiesen (Ablauf Sandfiltration, Ozonung, UF 1) sowie ESBL-Träger, welche gleichzeitig eine Colistin-Resistenz aufwiesen (Ablauf Sandfiltration und UF 1). Die Antibiogramme komplementieren die bisherigen Ergebnisse hinsichtlich ihrer gesundheitlichen Relevanz, indem sie fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzen in Korrelation bringen. Es konnte bestätigt werden, dass die molekularbiologisch nachgewiesenen Resistenzgene auch in lebenden (PMA-negativen) und auch kultivierbaren fakultativ pathogenen Bakterien aktiv sind. Diese befinden sich auch nach den Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung im Wasser und können sich dort persistieren bzw. sich dort auch vermehren.

3.3.7 Zwischenfazit zur mikrobiellen Reduktion durch Verfahren zur weitergehender Abwasserbehandlung

Die Daten der an 5 unterschiedlichen Kampagnen durchgeführten Probenahmen der weitergehender Abwasserbehandlungsverfahren zeigen, statistisch gesichert, eine Abstufung im Reduktionserfolg von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen der Verfahren zur erweiterten Abwasserbehandlung (vgl. Abbildung 25).

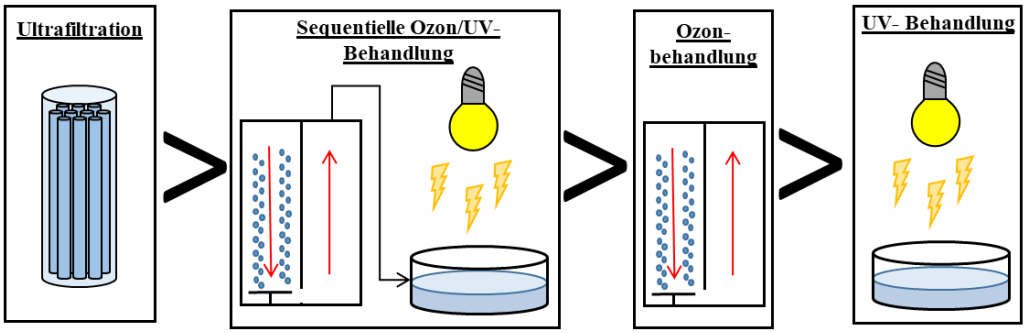

Abbildung 25: Abstufung der untersuchten Verfahren zur weitergehender Abwasserbehandlung basierend auf ihrer Fähigkeit zur Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen.

Eine Ultrafiltration zeigte sich als sehr gut geeignet, um als abschließendes Verfahren des Klärprozesses der Abwasserbehandlung mikrobielle Kontaminationen zu entfernen. Während die übrigen untersuchten Verfahren die untersuchten Parameter ausgehend von ihren Ausgangskonzentrationen um 1-2 Log-Stufen reduzieren, gelingt der Ultrafiltration unabhängig von der Ausgangskonzentration eine Reduktion in die Nähe des Detektionslimits. Dadurch ist die Ultrafiltration vor allem für die Behandlung von Abwasser mit starker biologischer Kontamination sinnvoll. Untersuchte alternative Verfahren würden in diesem

Falle weiterhin erhebliche Konzentrationen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in die Umwelt emittieren. Jedoch muss die Problematik der weiteren Retentatbehandlung geklärt werden, da ansonsten lediglich eine Verschiebung der mikrobiologischen Belastung stattfindet. Aufgrund des physikalischen Rückhaltes können neben mikrobiologischen Kontaminationen auch Feststoffe wie Mikroplastik effektiv zurückgehalten werden (Ma et al. 2019). Spurenstoffe können die Membran allerdings ungehindert passieren. Diese können aber durch die oxidative Wirkung einer zusätzlichen vorgeschalteten Ozonbehandlung effektiv reduziert werden. Eine Abwasserbehandlung, welche sowohl Spurenstoffe als auch mikrobiologische Kontaminationen reduziert, sollte demzufolge eine Kombination aus Ozon mit nachgeschalteter Aktivkohlebehandlung, zur Elimination polarer und unpolarer Spurenstoffe, sowie eine Ultrafiltration beinhalten. Die Ozonbehandlung dient dabei primär der Spurenstoff-Transformation bzw. -reduktion und trägt nur in eingeschränktem Maße zur Reduktion von unerwünschten Bakterien bei. Die gezeigte adsorptive Reinigung mittels pulverisierter Aktivkohle (PAK) verringert die Emission toxischer oder unbekannter Transformationsprodukte und schützt die Membran der Ultrafiltration vor der aggressiven Wirkung des restlichen Ozons. Die abschließende Ultrafiltration erlaubt eine zuverlässige Reduktion fakultativ pathogener und Antibiotikaresistenter Bakterien.

Eine solche optimierte Abwasseraufarbeitung ist in Abbildung 26 abgebildet.

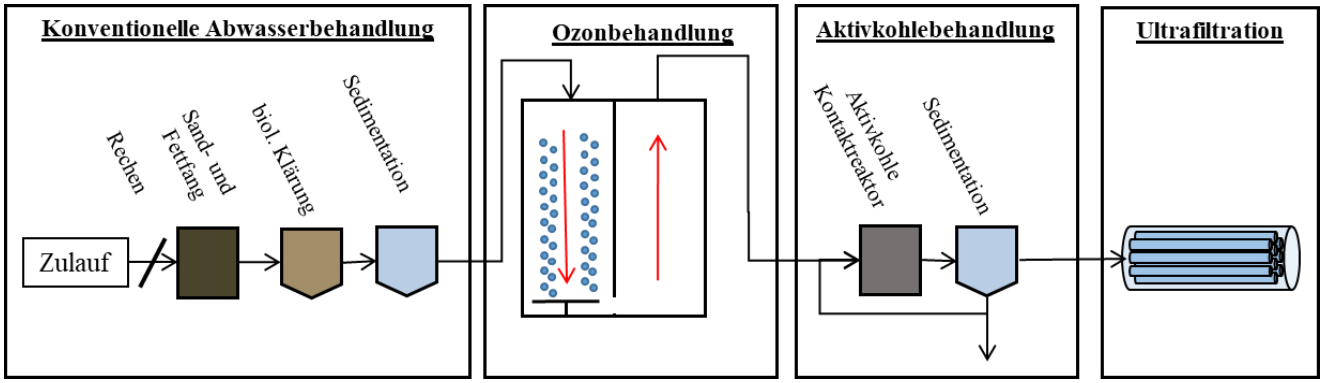

Abbildung 26: Optimiertes Kombinationsverfahren zur erweiterten Abwasserbehandlung mit einer Ozonung, einer Aktivkohleadsorption (PAK) und einer abschließenden Ultrafiltration zur Reduzierung von sowohl Nährstoffen, Spurenstoffen als auch fakultativ pathogenen Bakterien.

Das adsorptive, alleinige Verfahren der Aktivkohlebehandlung mit nachgeschalteter Sandfiltration, das für die Spurenstoffelimination von Bedeutung ist (oftmals als 4. Reinigungsstufe benannt), zeigte keinen reduzierenden Effekt auf die Abundanz von Antibiotikaresistenzgene bzw. fakultativ pathogenen Bakterien.

3.4 Optimierung der Betriebsparameter zur Reduktion mikrobieller Kontaminationen bei sequentieller Ozon/UV-Behandlung

Ausgehend von den bisherigen Erkenntnissen und den Bewertungen wurden unterschiedliche Betriebsparameter des Verfahrens der sequentiellen Ozon/UV-Behandlung variiert, um sich der Reduktion von mikrobiologischen Kontaminanten durch eine sehr effiziente Ultrafiltration anzunähern. Dies hätte den Vorteil, dass bei einer vergleichbaren Reduktion auch eine gleichzeitige Vermeidung des Risikopotentials über das Retentat durch die Ultrafiltration erreicht würde. Der Fokus lag hierbei auf den Auswirkungen einer Erhöhung der

Ozonkonzentration und UV-Dosis sowie einer Verlängerung der hydraulischen Verweilzeit des zu behandelnden Wassers während der Ozonung (Verweilzeit innerhalb des Kontaktreaktors) auf die Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen.

Da eine Erhöhung der Ozonkonzentration das Risiko der Bildung gefährlicher Abbauprodukte bedingt, wurde neben dem Ablauf des Nachklärbeckens auch der Ablauf des Sedimentationsbeckens der adsorptiven Stufe (Aktivkohlebehandlung) als Zulauf der Ozon/UV-Kombination beprobt (Hubner et al. 2015, Luddeke et al. 2015). Dieser Aufbau verspricht eine Verringerung chemischer Kontaminationen, welche eine Ozonzehrung während der Ozonbehandlung verursachen können, und mit einer nötigen Erhöhung der Ozondosis für eine vergleichbare Reduktion einhergeht. So könnte das Risiko der Bildung toxischer Nebenprodukte, bei gleichbleibender Reduktion fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene, minimiert werden.

Abweichend von den bisherigen Darstellungen liegt der Fokus in diesem Teil der Arbeit nicht auf den Abundanzen der einzelnen untersuchten Parameter, sondern auf der mittleren Abundanzänderung eines ganzen Clusters (fakultativ pathogene Bakterien, *häufig vorkommende Resistenzgene*, *intermediär vorkommende Resistenzgene* und *selten vorkommende Resistenzgene*). Im Folgenden wurde weniger auf dem Verhalten der einzelnen Parameter, sondern weitergehend auf der Möglichkeit die Reduktion mikrobieller Kontaminanten durch Parameteränderungen der einzelnen Verfahren zu erhöhen geachtet. Hierfür wurde die Verwendung eines Summenparameters für eine eingängigere grafische Darstellung als Punktwolke mit integriertem Mittelwert als Summenparameter der Verwendung der Einzelparameter vorgezogen.

3.4.1 Erhöhung der Ozonkonzentration und UV-Dosis einer sequentiellen Behandlung

Abweichend von den vorherigen Untersuchungen (vgl. Kapitel 3.3.3 und 3.3.4) wurde die Ozon-Konzentration der sequentiellen Ozon/UV-Behandlung auf 1,5 und 2 g Ozon/g DOC eingestellt, sowie eine UV-Intensität von 0, 400 und 600 J/m² angewandt. Ozonkonzentrationen bis zu 2 g Ozon/g DOC werden u. a. in der Schweiz als akzeptabel für eine Desinfektion in der Trinkwasseraufbereitung angesehen und die verwendeten 400J/m², als minimale Dosis für eine alleinige Desinfektion vorgeschlagen (Auckenthaler und von Gunten 2010). Die erhöhten Ozonkonzentrationen zielen auf eine höhere Eliminationsleistung eines Großteiles der mikrobiologischen Parameter ab, während die UV-Bestrahlung, als ergänzendes Verfahren, ozonwiderstandsfähige Mikroorganismen reduzieren soll. Der DOC im Ablauf des Nachklärbeckens an den drei Probenahmekampagnen (n=3) betrug 4,04 bzw. 4,5 und 3,5 mg/L und lag damit im Bereich des durchschnittliche DOC Konzentration während der Untersuchungen der alleinstehenden erweiterten Abwasserbehandlungsverfahren (Kapitel 3.3).

Abbildung 27 zeigt einen Überblick über die Prozessanordnung und die abgeänderten. verwendeten Prozessparameter. Als Zulauf der Ozonbehandlung im Pilotmaßstab wurde der Ablauf des Nachklärbeckens verwendet. Die optionale UV-Bestrahlung erfolgte als 1 L Batch-Verfahren im Labormaßstab.

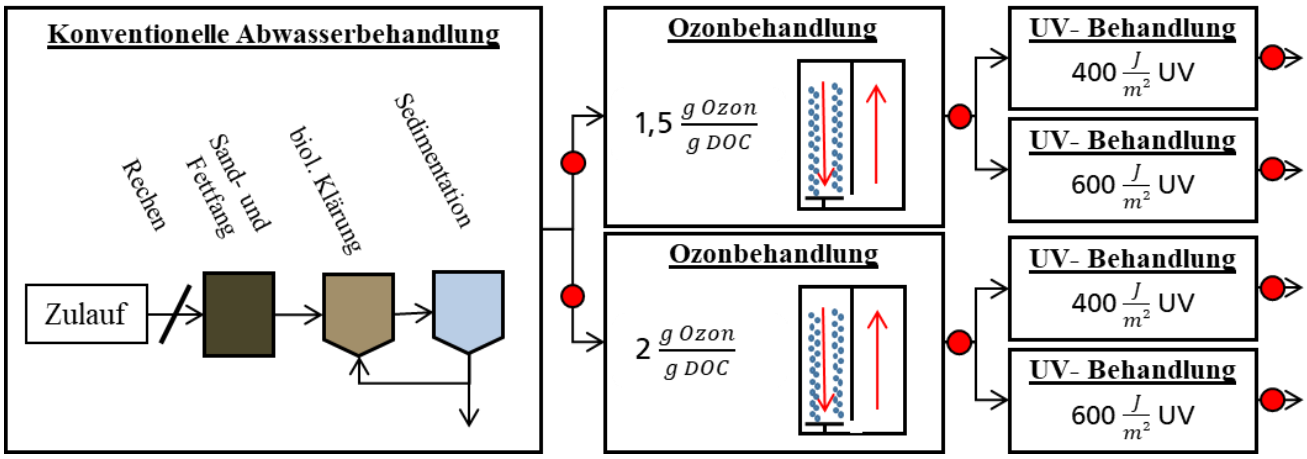

Abbildung 27: Schema der Prozessführung und einzelnen Probenahmestellen für die Erhöhung der Betriebsparameter der sequentiellen Behandlung mit Ozon und UV nach der Nachklärung. Rote Punkte: Probenahmestelle.

Nach der Nachklärung wurde das zu behandelnde Wasser mit 1,5 bzw. 2 g Ozon/g DOC behandelt. Nach der Ozonbehandlung erfolgte anschließend eine UV-Bestrahlung mit jeweils 400 zw. 600 J/m². Im Anhang 7.18 sind die mittleren Abundanzen aller Parameter aufgelistet und Anhang 7.24 listet die entsprechenden Abundanzen nach den einzelnen Probenkampagnen auf. Die Abundanzen der einzelnen Cluster und die Signifikanz der Reduktion einzelner Verfahrenskombinationen sind in Abbildung 28 grafisch zusammengefasst. Die genaue Signifikanz der Reduktionen sind im Anhang 7.14 gelistet.

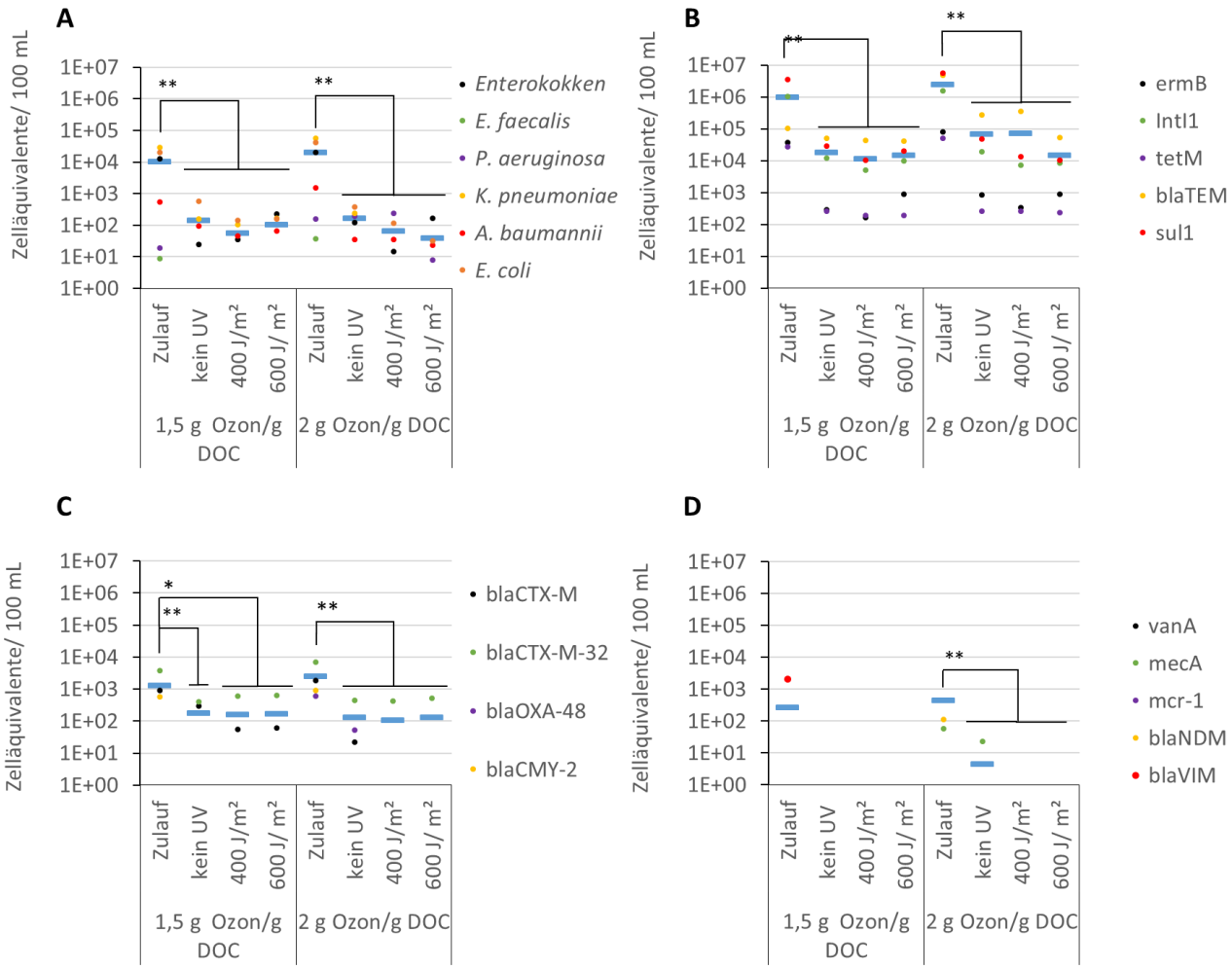

Abbildung 28: Zelläquivalente/100 mL als Summenparameter der Cluster fakultativ pathogene Bakterien (A), häufig vorkommender Resistenzgene (B), intermediär vorkommender Resistenzgene (C) und selten vorkommender Resistenzgene (D) im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens) und nach 1,5 g Ozon/g DOC bzw. 2 g Ozon/g DOC ohne und mit nachgeschalteter UV-Bestrahlung mit 400 J/m² bzw. 600 J/m². (n=3) Blauer Balken: Mittelwert aller Einzelparameter als Summenparameter. Signifikante Reduktionen in Bezug auf den Zulauf sind mit Sternen gekennzeichnet: *: p≤0,1, **: p≤0,05, ***: p≤0,01.

Bei einer Erhöhung der Ozonkonzentration und UV-Dosis konnte, verglichen mit der ursprünglich festgelegten Ozonkonzentration von 1 g Ozon/g DOC, bei einer gleichbleibenden Kontaktzeit von 8 Minuten, keine einheitliche Steigerung der Reduktion beobachtet werden. Die durchschnittliche Reduktion des sequentiellen Verfahrens mit Ozonkonzentrationen von 1,5 g Ozon/g DOC sowie 2 g Ozon/g DOC und einer UV-Dosis von 400 J/m² bzw. 600 J/m² lag bei 1,5-2 Log-Stufen. Ein Großteil dieser Reduktion des sequentiellen Verfahrens wurde durch die Ozonbehandlung erzielt. Die ergänzende UV-Bestrahlung reduzierte zusätzlich einzelne ozonrobuste Bakterien und Resistenzgene. Die sequentielle UV-Bestrahlung erwies sich vor allem bei *fakultativ pathogenen Bakterien* (Abbildung 28, A) sowie *intermediär vorkommenden Resistenzgenen* (Abbildung 28, C), also bei Clustern, in welchen einzelne ozonwiderstandsfähige Spezies einen Einfluss auf die Gesamtpopulation haben, als besonders effektiv.

Der Einfluss der Robustheit unterschiedlicher Spezies wird an den beiden Resistenzgene *bla*CTX-*M-32* und *bla*VIM deutlich. Beide waren im Zulauf in vergleichbarer Konzentration vorhanden ($3{,}69x10^3$ und $1{,}32x10^3$ Zelläquivalente/100 mL). Jedoch konnte das *bla*VIM-Gen durch die Ozonbehandlung mit 1,5 g Ozon/g DOC als auch mit 2 g Ozon/g DOC unter das Detektionslimit reduziert werden, während *bla*CTX-*M-32* lediglich um 1 Log-Stufe auf $4{,}13x10^2$ reduziert wurde.

Die einzelnen Parameter des Clusters der selten vorkommenden Resistenzgene konnten im Zulauf des sequentiellen Verfahrens (1,5 und 2 g Ozon/g DOC) nicht detektiert werden. Lediglich die Resistenzgene *mec*A ($5{,}78x10^1$ Zelläquivalente/100 mL*)* und *bla*NDM ($1{,}13x10^2$ Zelläquivalente/100 mL) konnten im Zulauf der Ozonbehandlung mit 2 g Ozon/g DOC in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Das New-Delhi-β-Lactamase-Gen (*bla*NDM) konnte während der Ozonbehandlung unter das Detektionslimit reduziert werden und das Methicillin-Resistenzgen m*ecA* wurde durch die erhöhte Ozonung lediglich marginal auf $2{,}30x10^1$ Zelläquivalente/100 mL und durch die anschließende UV-Bestrahlung (400 J/m²) ebenfalls unter das Detektionslimit reduziert.

Die Intensität der UV-Bestrahlung hat einen untergeordneten Effekt auf die durchschnittliche Reduktion der einzelnen Cluster. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Bakterien bereits durch die Ozonbehandlung vorgeschädigt waren und somit 400 J/m² bereits ausreichen, um die maximal möglichen Reduktionen zu erreichen. Höhere UV-Dosen wären demzufolge lediglich für eine alleinstehende UV-Behandlung zielführend. Der bereits in Kapitel 3.3.4 beobachtete synergetische Effekt von Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung konnte besonders bei der hohen Ozonkonzentration für die fakultativ pathogenen Bakterien und häufig vorkommenden Antibiotikaresistenzgene beobachtet werden (vgl. Abbildung 28 A,B).

3.4.2 Effekte einer vorgeschalteten adsorptiven Reinigungsstufe auf die Reduktion von mikrobiellen Kontaminanten

Um die Reduktion von mikrobiellen Kontaminanten der sequentiellen Ozon/UV-Behandlung weiterhin zu erhöhen wurde, die sequentielle Ozon/UV-Behandlung mit dem Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung betrieben. Diese Verfahrensanordnung ermöglicht, dass besonders für die Ozonkonzentrationen von 2 g Ozon/g DOC geringere Dosen Ozon benötigt werden und somit auch weniger leistungsstarke und damit günstigere Ozongeneratoren die benötigte Ozonkonzentration bei hohem DOC zuverlässig bereitstellen können. Gleichzeitig kann dem beobachteten Anstieg von Abundanzen einzelner, auch hygienisch kritischer, Antibiotikaresistenzgene und fakultativ pathogener Bakterien während der Aktivkohlebehandlung (siehe Kapitel 3.3.1) durch die Ozonbehandlung entgegengewirkt werden, bevor diese die Umwelt erreichen. Nach der konventionellen Klärung, sowie adsorptiven Aktivkohlebehandlung und Sedimentation im großtechnischen Maßstab wurde die Ozonbehandlung, in Anlehnung an die bisherigen Untersuchungen, mit 1,5 g Ozon/g DOC und 2 g Ozon/g DOC und einer Verweilzeit von 8 Minuten im Pilotmaßstab durchgeführt. Die nachfolgende UV-Bestrahlung mit 400 J/m² und 600 J/m² erfolgte als Batch-Verfahren im 1 L Labormaßstab. Ein Schema des vollständigen Versuchsaufbaus ist in Abbildung 29 dargestellt.

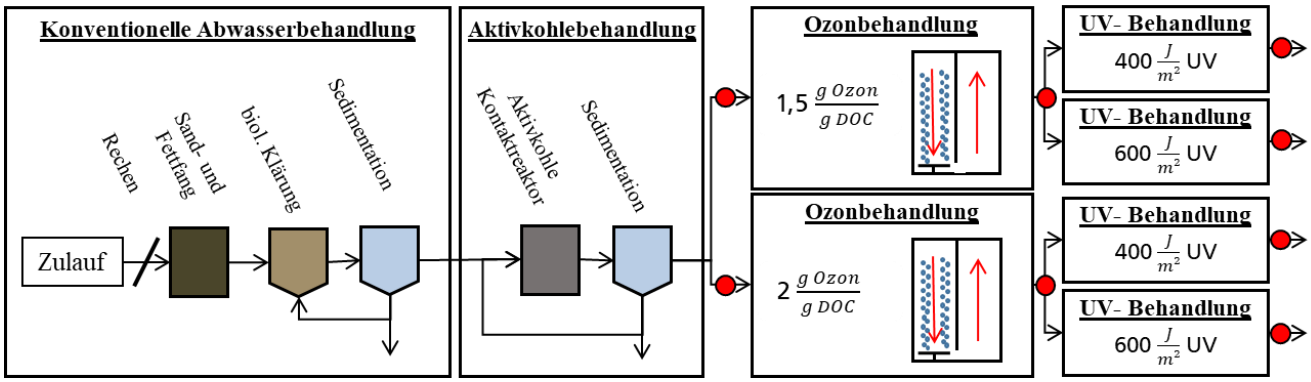

Abbildung 29: Schematisch dargestellter Aufbau der Prozessführung und Probenahmestellen der sequentiellen Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung nach konventioneller Klärung und Aktivkohlebehandlung (n=2). Rote Punkte: Probenahmestellen.

Aufgrund der geänderten Anordnung konnte dieser Versuch lediglich an zwei Probenahmekampagnen durchgeführt werden (n=2). Die Aktivkohlebehandlung reduzierte die der ersten Probenahmekampagne den DOC von 4,04 mg/L im Ablauf des Nachklärbeckens auf 3,64 mg/L nach dem Sedimentationsbecken der Aktivkohlebehandlung. Bei der zweiten Kampagne lag der DOC im Ablauf des Nachklärbeckens bei 3,5 mg/L und wurde bis zum Auslauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung lediglich auf 3,24 mg/L verringert. Damit war die im Ablauf des Nachklärbeckens ein vergleichbarer DOC wie bei den bisherigen Untersuchungen (Kapitel 3.3 und Kapitel 3.4.1).

Die durchschnittlichen Abundanzen des Summenparameter eines Clusters an jeder Probenahmestelle sind in Abbildung 30 zusammen mit den Abundanzen der einzelnen Parameter grafisch zusammengefasst. Die genauen Einzelparameter sind tabellarisch im Anhang 7.21 gelistet und die zugrundeliegenden Messungen der einzelnen Probenahmen befinden sich im Anhang 7.24.

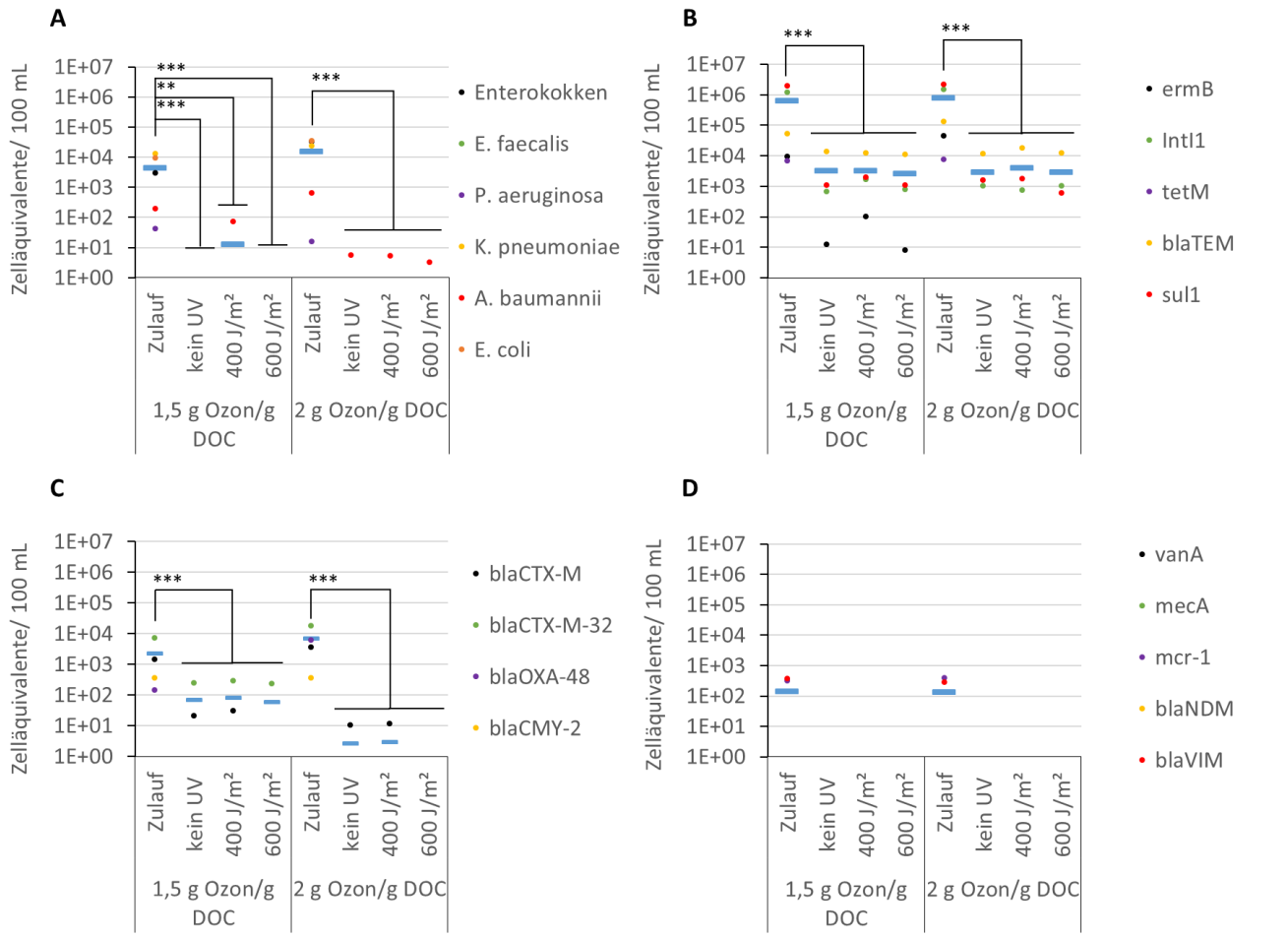

Abbildung 30: Zelläquivalente/100 mL der Summenparameter der fakultativ pathogenen Bakterien (A), häufig vorkommenden Resistenzgene (B), intermediär vorkommenden Resistenzgene (C) und selten vorkommenden Resistenzgene (D) im Zulauf (Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung) und nach 1,5 g Ozon/g DOC bzw. 2 g Ozon/g DOC ohne und mit nachgeschalteter UV-Bestrahlung mit 400 J/m² bzw. 600 J/m². Blauer Balken: Mittelwert aller Einzelparameter als Summenparameter. Punkte: Abundanzen der einzelnen Parameter. Signifikante Reduktionen in Bezug auf den Zulauf sind mit Sternen gekennzeichnet: *: p≤0,1, **: p≤0,05, ***: p≤0,01.

Im Gegensatz zum Verfahren mit dem direkten Ablauf des Nachklärbeckens (ohne nachgeschalteten Aktivkohlebehandlung) als Zulauf wurde die maximale, durch Ozon hervorgerufene, reduzierende Wirkung auf alle Cluster nicht bereits bei 1,5 g Ozon/g DOC, sondern erst bei 2g Ozon/g DOC erreicht. Eine zusätzliche UV-Behandlung zeigte nur vereinzelt Wirkung gegen ozonrobuste Bakterien. Trotz der gestiegenen Reduktion konnten einzelne Bakterien diesen Reinigungsprozess in relevanten Konzentrationen überstehen (z.B. Träger das *bla*TEM–Gens, vgl. Abbildung 30, B).

Durch die Verwendung des Ablaufs der adsorptiven Reinigung konnte bei dem Cluster der fakultativ pathogenen Bakterien, im Vergleich zum direkten Ablauf des Nachklärbeckens als Zulauf, eine wesentlich gesteigerte Reduktion beobachtet werden (siehe Abbildung 30, A). Lediglich *A. baumannii* erwies sich als besonders widerstandsfähig gegen Ozon und konnte

auch noch nach einer Behandlung mit 2 g Ozon/g DOC nahe dem Detektionslimit nachgewiesen werden.

Von *den häufig vorkommenden Antibiotikaresistenzgenen* konnten *tet*M und *erm*B ausgehend von 10^3-10^4 Zelläquivalente/100 mL unter das Detektionslimit reduziert werden. Das Resistenzgen *bla*TEM konnte ausgehend von $5{,}48x10^4$ bei 1,5 g Ozon/g DOC (bzw. für 2 g Ozon/g DOC: $1{,}31x10^5$) Zelläquivalente/100 mL um etwa 1 Log-Stufe auf ca. 10^4 Zelläquivalente/100 mL reduziert werden. Die übrigen Parameter kamen nach einer Reduktion von bis zu 3,5 Log-Stufen (*sul1*) noch in deutlich detektierbaren Konzentrationen vor (Abbildung 30, B). Ein direkter Einfluss der veränderten Prozessparameter auf die Abundanz der häufig vorkommenden Resistenzgene wurde nicht beobachtet. Weder eine Erhöhung der Ozonkonzentration von 1,5 g Ozon/g DOC auf 2 g Ozon/g DOC noch eine zusätzlich nachfolgende UV-Bestrahlung mit 400 J/m² oder 600 J/m² konnte die Reduktion signifikant verbessern.

An dem Cluster der *intermediär vorkommenden Resistenzgene* ist die speziesabhängige Wirkung von Ozon besser zu erkennen. Die Reduktion des Verfahrens erhöht sich bei einem Anstieg der Ozonkonzentration von 1,5 g Ozon/g DOC auf 2 g Ozon/g DOC von 1,5 Log-Stufen auf 3,5 Log-Stufen. Eine zusätzliche UV-Behandlung zeigt, insbesondere bei dem Cephalosporin-Resistenzgen *bla*CTX-M, eine synergetische Wirkung. *Intermediär vorkommende Resistenzgene* konnten durch den Prozess zu einem überwiegenden Teil bereits durch die alleinige Ozonbehandlung mit 1,5 g Ozon/g DOC unter das Detektionslimit reduziert werden (*bla*CMY-2, *bla*OXA-48). Eine vollständige Reduktion unter das Detektionslimit wurde erst ab einer Ozonkonzentration von 2 g Ozon/g DOC für *bla*CTX-M-32 bzw. einer Kombination von 2 g Ozon/g DOC und 600 J/m² UV bei *bla*CTX-M erreicht (siehe Abbildung 30, C).

Aus dem Cluster der *selten vorkommenden Resistenzgene* konnte nur die kritischen *mcr-1* und blaVIM Gene im Zulauf mit $3{,}26x10^2$ (1,5 g Ozon/g DOC) und $3{,}92x10^2$ (2 g Ozon/g DOC) Zelläquivalente/100 mL detektiert werden. In beide Fällen wurde das Gen bereits bei der Ozonbehandlung ohne UV-Bestrahlung unter das Detektionslimit reduziert.

Andere Autoren haben bereits gezeigt, dass der DOC einen Einfluss auf die Effizienz von Ozon bei der Reduktion von chemischen Spurenstoffen aufweist. Bei einem höheren DOC-Gehalt ist die Wirkung von Ozon weniger ausgeprägt als bei einem geringen DOC-Gehalt (Von Sonntag und Von Gunten 2012). Die beobachtete Verringerung des DOC im zu behandelnden Wasser durch die adsorptive Behandlung konnte ebenfalls bestätigt werden (Altmann et al. 2014). Die gesteigerte mikrobielle Reduktion der Ozonbehandlung nach einer vorgeschalteten adsorptiven Reinigung lässt vermuten, dass ein vergleichbarer Effekt ebenfalls für mikrobielle Kontaminationen auftritt. Bei einem verringerten DOC haben die Ozonmoleküle bzw. OH Radikale weniger Strukturen, mit denen sie reagieren können. Durch die somit verminderte Ozon-Zehrung ist eine Reaktion mit einem Bakterium wahrscheinlicher.

Obwohl eine adsorptive Stufe als alleinstehender Prozess keine signifikante Reduktionen erzielen konnte (vgl. Kapitel 3.3.1), betrug die durchschnittliche Reduktion der nachfolgenden sequentiellen Ozon/UV-Kombination zwischen 2,5-3 Log-Stufen (vgl. Abbildung 30). Damit lag die Reduktion der sequentiellen Ozon/UV-Behandlung mit vorangegangener adsorptiver Behandlung, bei vergleichbaren DOC im Ablauf des Nachklärbecken, ca. 1 Log-Stufe über der sequentiellen Ozon/UV Behandlung bei der konventionellen Reinigung ohne adsorptive Stufe.

3.4.3 Einfluss der hydraulischen Verweilzeit auf das Reduktionsvermögen der sequentiellen Anwendung von Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung

Neben einer Erhöhung der Ozonkonzentration ist die Kontaktzeit des Ozons mit dem Wasser im Reaktor eine weitere wesentliche Einflussgröße auf eine mögliche verbesserte Reduktion von Mikroorganismen (von Gunten et al. 2001). Im Folgenden wurde die Auswirkung einer Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC bei einer Erhöhung der hydraulischen Verweilzeit des zu behandelten Wassers innerhalb des Ozonkontaktreaktors von 8 Minuten auf 30 Minuten und auf 60 Minuten auf die Reduktion fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene untersucht. Aufgrund des Aufbaus der Ozonanlage als Blasensäulenreaktor ist die hydraulische Verweilzeit jeweils zur Hälfte in Ozonkontaktzeit und Verweilzeit zum Abreagieren aufgeteilt.

Aufgrund der in vorangegangenen Untersuchungen beobachteten synergetischen Wirkung einer nachfolgenden UV-Bestrahlung wurden auch diese Experimente der verlängerten Verweilzeit mit und ohne UV-Bestrahlung durchgeführt (vgl. Abbildung 31).

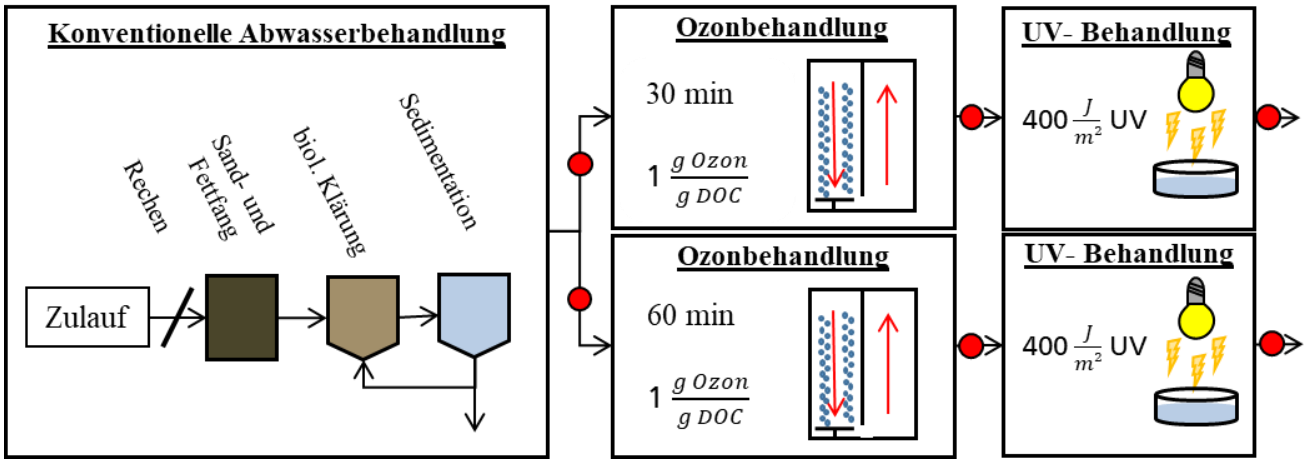

Abbildung 31: Schematische Darstellung der Prozessführung zur Untersuchung des Effekts einer verlängerten hydraulischen Ozon-Verweilzeit von 30 Minuten bzw. 60 Minuten ohne und mit nachfolgender UV-Bestrahlung. Rote Punkte: Probenahmestellen.

Als UV-Dosis wurde 400 J/m² verwendet, da eine Erhöhung auf 600 J/m² in den bisherigen Ergebnissen (vgl. Kapitel 3.4.1 und 3.4.2) keine durchgehende Verbesserung der Reduktionleistung erzielte. Insgesamt wurden drei unterschiedliche Probenahmen durchgeführt (n=3). Als Zulauf der Ozonbehandlung diente der Ablauf des Nachklärbeckens und die optionale UV-Bestrahlung erfolgte im 1 L Batch -Verfahren im Labormaßstab. Der DOC im Ablauf des Nachklärbeckens an den drei Tagen unterlag mit 4,88; 3,64 und 3,24 mg/L DOC an den einzelnen Probenahmekampagnen einer Streuung, lag aber noch im Bereich der Standartabweichung der Durchschnittwerte über den gesamten Probenahmezeitraum (4,3±1,1 mg/L).

Die durchschnittlichen Abundanzen der Antibiotikaresistenzgen-Cluster sowie der untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien sind in Abbildung 32 grafisch dargestellt. Die Abundanz der Einzelparameter und deren Standardabweichungen sind im Anhang 7.22 tabellarisch zusammengefasst und die genauen p-Werte der Reduktionen sowie die Abundanzen während der einzelnen Probenahmen sind im Kapitel 7.24 im Anhang aufgeführt.

Insgesamt zeigt die Ozonbehandlung mit verlängerter hydraulischer Verweilzeit eine starke Reduktion für fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen bis zu 2,5

Log-Stufen. Hierbei hat sich eine hydraulische Verweilzeit von 60 Minuten als effektiver herausgestellt als 30 Minuten. Eine nachfolgende UV-Bestrahlung erwies sich bei kürzerer Verweilzeit (30 min) als synergetisch wirksamer als bei längerer hydraulischer Verweilzeit (60 min)(siehe Abbildung 32,A,B,C, D).

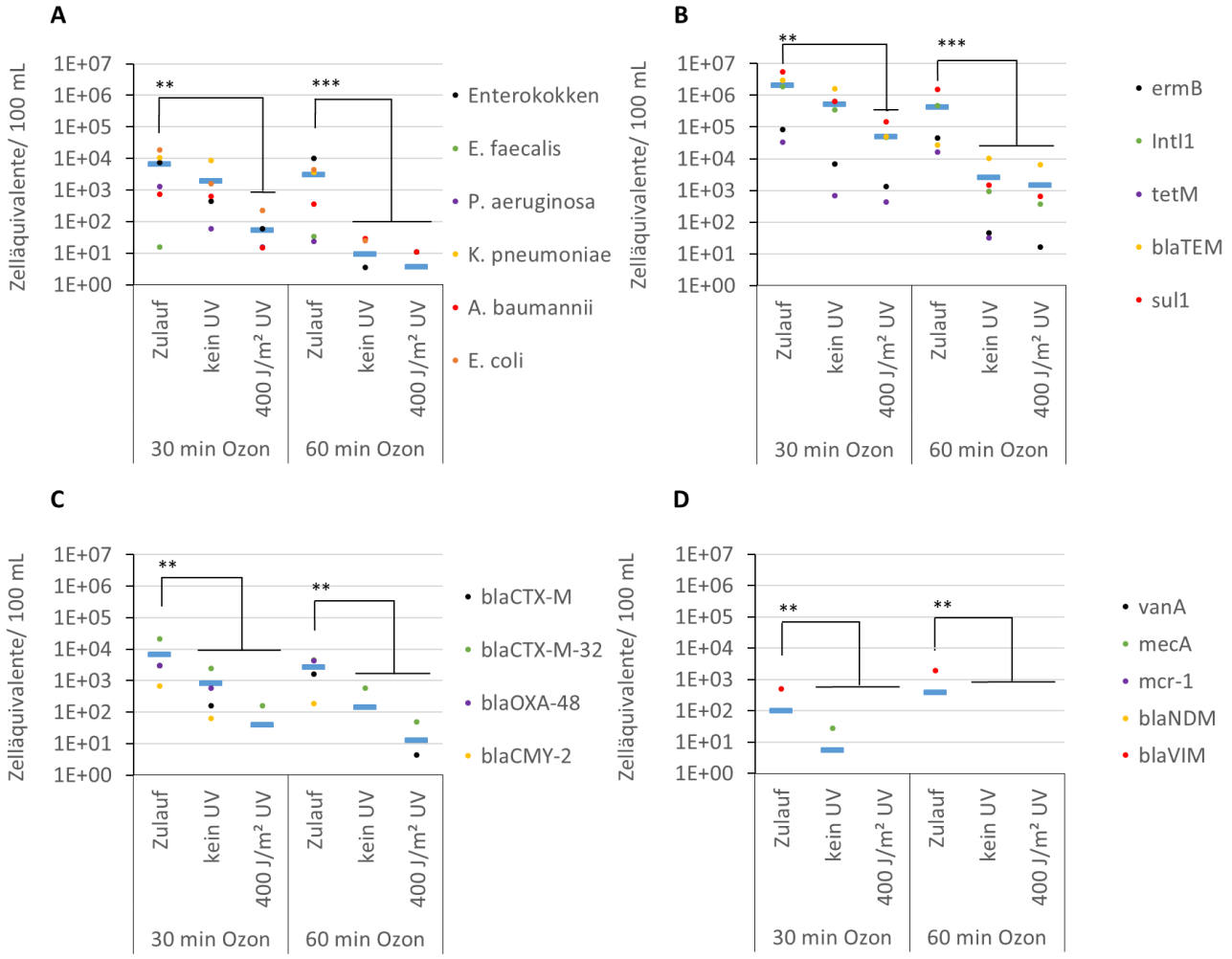

Abbildung 32: Zelläquivalente/100 mL der Summenparameter der fakultativ pathogenen Bakterien(A), häufig vorkommenden Resistenzgene (B) intermediär vorkommenden Resistenzgene (C) und selten vorkommenden Resistenzgene (D) im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens) und nach einer Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC, einer Ozonkontaktzeit von 30 Minuten bzw. 60 Minuten sowie optionaler UV-Bestrahlung mit 400 J/m². Blauer Balken: Mittelwert aller Einzelparameter als Summenparameter. Punkte: Abundanzen der einzelnen Parameter. Signifikante Reduktionen in Bezug auf den Zulauf sind mit Sternen gekennzeichnet: *: p≤0,1; **: p≤0,05; ***: p≤0,01.

Die allgemeine Reduktion für fakultativ pathogenen Bakterien (Abbildung 32, A) bei einer hydraulischen Verweilzeit von 30 Minuten und ohne UV-Bestrahlung lag bei 0,53 Log-Stufen. Durch eine nachfolgende UV-Bestrahlung konnte die Reduktion auf 2,09 Log-Stufen erhöht werden. Bei einer hydraulischen Verweilzeit von 60 Minuten betrug die Steigerung durch eine zusätzliche UV-Behandlung, ausgehend von 2,51 Log-Stufen für die alleinstehende Ozonbehandlung, insgesamt 2,9 Log-Stufen, also nur zusätzlich 0,4 Log-Stufen.

Häufig vorkommende Antibiotikaresistenzgene konnten, abhängig von den verwendeten Prozessparametern, im Mittel zwischen 0,6 Log-Stufen bei 30 Minuten Ozonbehandlung und

2,44 Log-Stufen bei 60 Minuten Ozon/UV-Bestrahlung reduziert werden (Abbildung 32, C). Vergleichbar mit den fakultativ pathogenen Bakterien wurde auch hier ein ausgeprägter synergetischer Effekt mit der UV-Behandlung beobachtet, welcher bei der kürzeren hydraulischen Verweilzeit von 30 Minuten 1 Log-Stufe höher ausfällt als bei längerer Verweilzeit. Von den einzelnen untersuchten Parametern des Clusters erwies sich das Resistenzgen *bla*TEM gegen β-Lactam-Antibiotika bzw. deren Trägerorganismen als besonders widerstandsfähig gegen Ozon. Es wurde bei einer hydraulischen Kontaktzeit von 30 Minuten lediglich von $3{,}06 \times 10^6$ auf $1{,}64 \times 10^6$ Zelläquivalente/100 mL und bei 60 Minuten von $2{,}75 \times 10^4$ auf $1{,}02 \times 10^4$ Zelläquivalente/100 mL reduziert.

Die Reduktion von *intermediär vorkommenden Resistenzgenen* lag, abhängig von den Prozessparametern, zwischen 0,94 Log-Stufen (30 Minuten Ozonbehandlung) und 2,38 Log-Stufen (60 Minuten Ozonbehandlung mit sequentieller UV-Bestrahlung). Bei einer Verweilzeit von 30 Min. wurde das *bla*CTX-M-32 Resistenzgen lediglich von $2{,}08 \times 10^4$ auf $2{,}45 \times 10^3$ Zelläquivalente/100 mL und bei einer Verweilzeit von 60 Min. von $4{,}54 \times 10^3$ auf $5{,}73 \times 10^2$ Zelläquivalente/100 mL reduziert. Eine nachfolgende UV-Bestrahlung erreichte jeweils eine weitere Reduktion von ca. 1 Log-Stufe. Damit war *blaCTX-M-32* der einzige Parameter dieses Clusters, welcher nach einer kombinierten Behandlung noch in signifikanten Abundanzen detektiert werden konnte.

Selten vorkommende Resistenzgene konnten im Zulauf der Ozonbehandlung bei dieser Probenahmekampagne nicht detektiert werden, somit ist eine Aussage über die Reduktion dieses Clusters nicht möglich.

Die im Vergleich der verlängerten Verweilzeit zu einer Verweilzeit von 8 Minuten gesteigerte Reduktion bei gleichbleibender Ozonkonzentration (1 g Ozon/g DOC) korreliert mit denen aus Laborstudien (Gehr et al. 2003). Die erhöhte mikrobielle Reduktion resultiert aus einem verringerten „shielding effect“ der Partikel im Wasser, welche eine Reaktion des Ozons mit Bakterien erschwert (Lazarova et al. 2013). Bei einer längeren hydraulischen Verweilzeit ist es wahrscheinlicher, dass ein Ozonmolekül oder OH Radikal mit einem Bakterium reagiert und nicht mit einem abiotischen Partikel interagiert.

Gleichzeitig lässt der synergetische Effekt von Ozon und UV-Behandlung bei längerer Ozonkontaktzeit nach. Die durch eine 30 Minuten Kontaktzeit geschädigten Bakterien werden im Anschluss durch die UV-Bestrahlung zwar noch zusätzlich eliminiert. Eine 60-minütige Ozonung überleben jedoch nur sehr robuste, oder anderweitig geschützte Bakterien, welche in geringerem Maße dann noch UV anfällig sind. Trotz der allgemein hohen Reduktion im kombinierten Ansatz können jedoch vor allem ozonrobuste Bakterien sowie Resistenzgene solcher Bakterien diesen Abwasserbehandlungsprozess überstehen (z.B. *A. baumannii* oder *bla*CTX-M-32). Das Verfahren erweist sich grundsätzlich als geeignetes Verfahren, um bei ausreichend langer Verweilzeit (60 Minuten), auch ohne zusätzliche UV-Bestrahlung, einen Großteil der klinisch relevanten kritischen Antibiotikaresistenzgene sowie die Mehrheit der fakultativ pathogenen Bakterien aus dem Abwasserstrom zu entfernen. Es bleibt zu diskutieren, ob dieser rein wissenschaftlich untersuchte Prozess zur hydraulischer Verweilzeit auch tatsächlich in den Realbetrieb einer Großkläranlage integriert werden kann.

3.4.4 Verifizierung der Effekte der veränderten Betriebsparameter durch Kultivierungsexperimente

Um die Auswirkung der Prozessparameterveränderung mittels Kultivierungsexperimenten zu erfassen, wurde aufgrund der Vielzahl an Probenahmestellen lediglich Taxonomie-spezifische Plattensysteme verwendet. Die auszählbaren Kolonie bildenden Einheiten/100 mL der einzelnen Kampagnen sind im Anhang in den Kapiteln 7.19, 7.21 und 7.23 aufgelistet.

Nach einer Behandlung mit erhöhten Ozonkonzentrationen und UV-Dosen konnten zum überwiegenden Teil eine einstellige Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten in 100 mL nachgewiesen wurde. Lediglich *Pseudomonas* spp. konnte durchgehend in höheren Abundanzen nachgewiesen werden, z.B. mit 471 KBE/100 mL nach einer Ozonbehandlung mit 1,5 g Ozon/g DOC. Ein Vergleich der Reduktionleistungen bei unterschiedlichen Ozonkonzentrationen zeigt, dass für *E. coli, Acinetobacter* spp. und *Pseudomonas* spp. mit steigender Ozonkonzentration auch eine ansteigende Reduktion erreicht wurde. Nach einer Behandlung mit 1,5 g Ozon/g DOC konnten noch 26 KBE/100 mL detektiert werden und bei 2 g Ozon/g DOC wurden 6 KBE/100 mL *E. coli* nachgewiesen. Diese gesteigerte Reduktion konnte bei molekularbiologischen Untersuchungen identischer Proben trotz PMA-Behandlung zur Lebend/Tod Diskriminierung der Bakterien nicht beobachtet werden.

Eine Verlängerung der hydraulischen Kontaktzeit von 8 Minuten auf 30 Minuten hatte zur Folge, dass im Kulturverfahren fakultativ pathogene Bakterien nur noch in geringen Konzentrationen im Ablauf vorhanden waren, welche nach einer zusätzlichen UV-Bestrahlung nahe des Detektionslimits reduziert wurden. Bei einer weiteren Verlängerung der hydraulischen Kontaktzeit auf 60 Minuten konnten bereits durch eine alleinige Ozonbehandlung die Mehrheit der Keime nicht mehr verlässlich quantifizierbar kultiviert werden.

Eine zusätzliche adsorptive Aktivkohlebehandlung zwischen dem Nachklärbecken und der Ozonbehandlung ermöglichte eine signifikante Reduktion, sodass lediglich sehr geringe Abundanzen (1-15 KBE/100 mL) nachgewiesen werden konnten. Vergleichbar mit den Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchungen ist *Acinetobacter* spp. als alleiniger untersuchter Parameter noch vereinzelt (15 KBE/100 mL) nach der Ozonbehandlung nachweisbar.

Die allgemeinen Unterschiede zwischen den Abundanzen der mikrobiologischen Untersuchungen zu den molekularbiologischen Untersuchungen (qPCR) lassen sich durch Induktion von VBNC-Stadien, also von Stressreaktionen bei Bakterien durch die Ozonbehandlung erklären, wie sie auch bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde (Orta de Velásquez et al. 2017, Zhang et al. 2015, Zhang et al. 2011). Bakterien in VBNC-Stadien können durch kulturbasierte Verfahren nicht nachgewiesen werden. Erst nach einer zusätzlichen Regenerationszeit bilden sich Spezies abhängig während der Inkubationszeit makroskopisch sichtbare Kolonien. Bakterien, welche durch die subletale Ozonbehandlung in das VBNC-Stadium übergehen, werden demzufolge durch die kulturbasierten Methoden nicht nachgewiesen und die Ergebnisse sind als falsch negativ zu bewerten.

Bei der PMA-Behandlung vor der qPCR wird die DNA von Bakterien im VBNC-Stadium jedoch nicht komplexiert und steht weiterhin zur Detektion zur Verfügung. Bei kulturbasierten Verfahren übersteigen daher deren beobachteten Reduktionseffizienzen die der qPCR basierten Verfahren. Letztlich muss bei allen Verfahren, die bei Bakterien eine Stressantwort

auslösen, darauf geachtet werden, ob VBNC-Stadien verstärkt induziert werden, um dann ein geeignetes Nachweisverfahren zu wählen, durch welches die Gesamtheit aller intakten Bakterien erfasst wird.

3.4.5 Zwischenfazit zu veränderten Betriebsparametern der sequentiellen Ozon/UV-Behandlung

Die Bewertung der Parameteränderung im Hinblick auf die Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Bewertung der Änderung einzelner Betriebsparameter auf die Reduktion fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Vergleich zur Behandlung mit 1 g Ozon/g DOC bei einer hydraulischen Verweilzeit von 8 Minuten ◊: keine Verbesserung der Reduktion, Δ: Verbesserung der Reduktion.

	Erhöhung der Ozonkonzentration bis auf 2 g Ozon/g DOC	Ozon/UV-Kombination	Erhöhung der UV-Dosis auf 600 J/m²	Erhöhung der hydraulischen Verweilzeit
Ablauf des Nachklärbeckens als Zulauf	◊	◊	◊	Δ
Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohle (PAK) als Zulauf	Δ	Δ	◊	Nicht untersucht

Durch die alternative Verwendung des Ablaufs des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung, konnte eine um 1 Log-Stufe erhöhte Reduktion aller untersuchten mikrobiologischen Parameter erreicht werden. Obwohl die adsorptive Reinigung nur unzureichende Reduktionleistungen bezüglich fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen besitzt, ermöglicht der verringerte DOC eine effizientere reduzierende Wirkung des Ozons, aufgrund einer verminderten Ausprägung der Ozonzehrung. Der Verfahrensaufbau mit einer adsorptiven Reinigung und erhöhter Ozonkonzentration als eine abschließende Stufe für eine mikrobielle Abwasserbehandlung ist als vielversprechend Alternative anzusehen. Es sollten jedoch zusätzliche Untersuchungen dieser Prozessführung am beprobten sowie an weiteren Standorten wiederholt werden, um eine statistische Absicherung dieser ersten Resultate zu gewährleisten.

Die Untersuchungen der Reduktionleistungen nach der konventionellen Klärung unter veränderten Einstellungen des Prozesses der sequentiellen Ozon/UV-Behandlung ergab, dass eine Erhöhung der Ozonkonzentration von 1 g Ozon/g DOC auf 1,5 g Ozon/g DOC bzw. 2 g Ozon/g DOC keine Steigerung der mikrobiellen Reduktion zur Folge hatte. Weiterhin ist eine Erhöhung der Ozonkonzentration aufgrund der Entstehung von unerwünschten, potentiell toxischen Nebenprodukten ohne weitergreifende Maßnahmen bedenklich (Hubner et al. 2015, von Gunten et al. 2001). Für einen abschließenden Prozess in der Kette der Abwasserbehandlung sind diese erhöhten Einstellungen nicht geeignet. Eine weitergehende UV-Bestrahlung, auch mit erhöhter UV-Dosis, bringt keine zusätzliche Reduktion, würde jedoch vorsorgend auch die Reduktion ozonrobuster Spezies ermöglichen.

Eine Verlängerung der hydraulischen Verweilzeit im Ozon-Kontaktreaktor und damit eine Erhöhung der Kontaktzeit des belasteten Wassers mit dem Ozon kann bei einer Ozonkonzentration von 1 g Ozon/g DOC die bakterielle Reduktion des kombinierten Prozesses signifikant erhöhen. Auch hier muss die Umsetzbarkeit an der Kläranlage im Realbetrieb überprüft werden.

3.5 Optimierung der Betriebsparameter beider Ultrafiltrationseinheiten

Neben der sequentiellen Ozonbehandlung und UV-Bestrahlung hat sich in Kapitel 3.3.5 auch die Ultrafiltration als vielversprechender Prozess zur Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen dargestellt. Im Folgenden werden die Reduktionen der beiden beprobten Ultrafiltrationseinheiten jeweils am unteren (12,5 L/m²h) sowie oberen (50 L/m²h für UF 2 und 90/m²h für UF 1) Bereich der möglichen Fluxrate sowie mit unterschiedlichen Zuläufen (Ablauf des Nachklärbeckens und Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung) an zwei Probenahmen untersucht (n=2). Die Probenahmen bei unterschiedlichen Fluxraten fanden innerhalb eines Filtrationszyklus (20 Minuten) statt. Um eine vergleichbare Ausgangssituation des zu behandelnden Wassers zu gewährleisten, wurden alle Proben bei unterschiedlichen Fluxraten in einem Zeitfenster von 2 h genommen. Vor den Probenahmen fand jeweils eine chemische Reinigung der Membranen mit Natronlauge, Natriumhypochlorid und Salzsäure statt.

Aufgrund der benötigten DNA-Menge für die molekularbiologischen Untersuchungen und dem damit verbundenen benötigten erhöhten Probenvolumen für die Ultrafiltrationen, konnten diese Untersuchungen nicht mit allen etablierten Parametern durchgeführt werden. Lediglich das Cluster der *häufig vorkommenden Resistenzgene*, sowie ausgewählte Resistenzgene der hygienisch relevanteren *intermediär vorkommenden Resistenzgene* (*bla*OXA-48, *bla*CTX-M und *bla*CTX-M-32) wurde beprobt, da zu erwarten war, dass die übrigen Cluster unter das Detektionslimit reduziert werden. Aus dem Cluster der fakultativ pathogenen Bakterien wurden die Untersuchungen auf den Nachweis von *E. coli*, *A. baumannii* und intestinale Enterokokken beschränkt.

3.5.1 Einfluss der Fluxrate auf die Reduktion von Ultrafiltrationen

In Abbildung 33 sind schematisch die Betriebsführung der einzelnen Ultrafiltrationseinheiten sowie die unterschiedlichen verwendeten Fluxraten abgebildet. Die Probenahmen fanden in einem Zeitrahmen von insgesamt 2 h statt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Proben innerhalb eines Filtrationszyklus (20 Minuten) genommen wurden. Der SAK_{254} im Zulauf der Ultrafiltrationseinheiten, vor dem installierten 200 µm Vorfilter, lag an den Probenahmetagen bei 9,6 und 10,4 1/m und lag damit geringfügig über dem durchschnittlichen SAK_{254} während der Kampagne zur Untersuchung der alleinstehenden erweiterten Abwasserbehandlungsverfahren von 9.3.

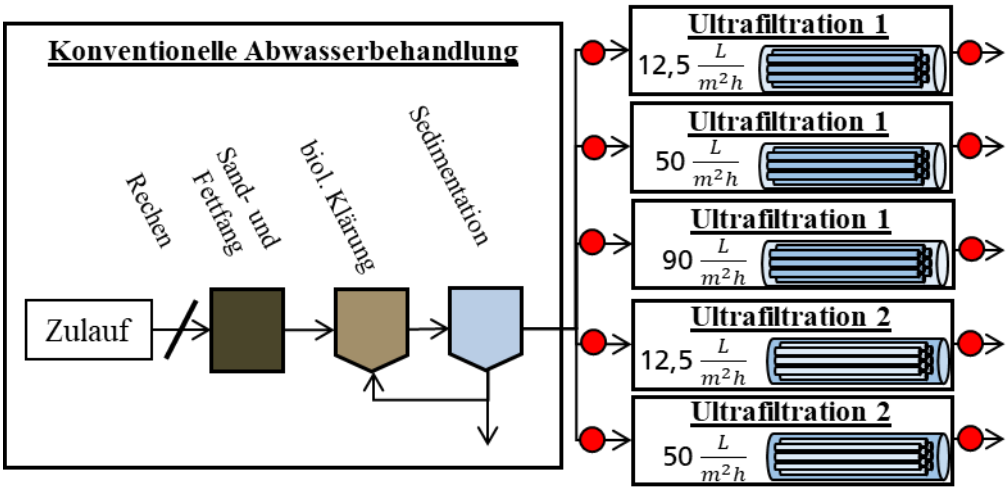

Abbildung 33: Schematische Darstellung der Prozessführung sowie die verwendeten Fluxraten der beiden Ultrafiltrationseinheiten. Rote Punkte: Probenahmestellen.

Es zeigte sich, dass die Reduktion nicht ausschließlich über die Porengröße der Membranen (UF 1: 20 nm, UF 2: 25 nm) definiert ist, sondern auch die Fluxrate (Durchsatz der Ultrafiltrationseinheit) einen Einfluss auf die Reduktion haben kann. Entgegen der ursprünglichen Erwartung zeigte eine Erhöhung der Fluxraten jedoch keinen einheitlichen Effekt. So erreicht Ultrafiltration 1 mit steigender Fluxrate ausgehend von 12,5 L/m²h eine stetige Verbesserung der Reduktion bis zu 5 Log-Stufen, während bei Ultrafiltration 2 eine Erhöhung der Fluxrate von 12,5 L/m²h auf 50 L/m²h mit einer gleichbleibenden Reduktion von ca. 3 Log-Stufen keine nennenswerte Steigerung festgestellt wurde.

Die mittleren Abundanzen der einzelnen Parameter bei Verwendung des Ablaufes der Nachklärung als Zulauf sind im Anhang in Tabelle 31 gelistet.

Das unterschiedliche Verhalten der mikrobiellen Reduktionen von Ultrafiltration 1 und Ultrafiltration 2 bei einem Anstieg des Fluxes untermauert die in Kapitel 3.3.5 aufgestellte Hypothese, dass Ultrafiltration 2 bei gleichem SAK_{254} (als Richtwert für den Gehalt an gelösten, organischen Stoffen mit adsorbierenden Eigenschaften bei 254 nm) in geringerem Umfang eine Deckschicht ausbildet als Ultrafiltration 1. Da eine ausgebildete Deckschicht an der mikrobiellen Reinigungsleistung beteiligt ist (Salladini et al. 2007, Schäfer et al. 2000), erreicht Ultrafiltration 1 eine höhere Reduktionen. Bei einem Anstieg der Fluxrate wird wiederum die Deckschicht, soweit vorhanden, stärker verdichtet (Pinnekamp und Friedrich 2006, Thomas 2007). Da sich bei dem Betrieb von Ultrafiltration 2 keine Deckschicht ausbildet, kann sich diese durch eine Erhöhung des Fluxes nicht zusätzlich verdichten und die mikrobielle Reduktion nicht zusätzlich beeinflussen

Aus ökonomischer Sicht kann eine höhere Fluxrate, unter Vorbehalt des benötigten Energieverbrauchs, vorteilhaft sein, da eine Filtrationseinheit in der gleichen Zeit ein größeres Abwasservolumen reinigen kann. Untersuchungen der Ultrafiltration zur Trinkwasseraufarbeitung empfehlen, die Wahl des Fluxes abhängig vom Transmembrandruck zu wählen, da ein konstanter Transmembrandruck von ≤ 1 bar hilft, irreversibles Fouling der Membran zu vermeiden (Crozes et al. 1997).

3.5.2 Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen durch eine Ultrafiltration mit vorgeschalteter adsorptiver Reinigungsstufe

Es wurden zusätzliche Untersuchungen zur Reduktion beider Ultrafiltrationseinheiten mit einer vorgeschalteten adsorptiven Reinigungsstufe untersucht. Ein schematischer Überblick über den Versuchsaufbau ist in Abbildung 34 gegeben. Die Abundanzen jeder Probenahmestelle sind im Anhang 7.15 aufgeführt. Die Probenahmen fanden in einem Zeitrahmen von insgesamt 2 h statt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Proben innerhalb eines Filtrationszyklus (20 Minuten) genommen wurden Der SAK_{254} im Zulauf der Ultrafiltrationseinheiten lag für die beiden Probenahmetage (n=2) mit 6,2 1/m und 5,8 1/m, bedingt durch die Aktivkohlebehandlung unter dem durchschnittlichen SAK_{254} im Ablauf des Nachklärbeckens (9,3).

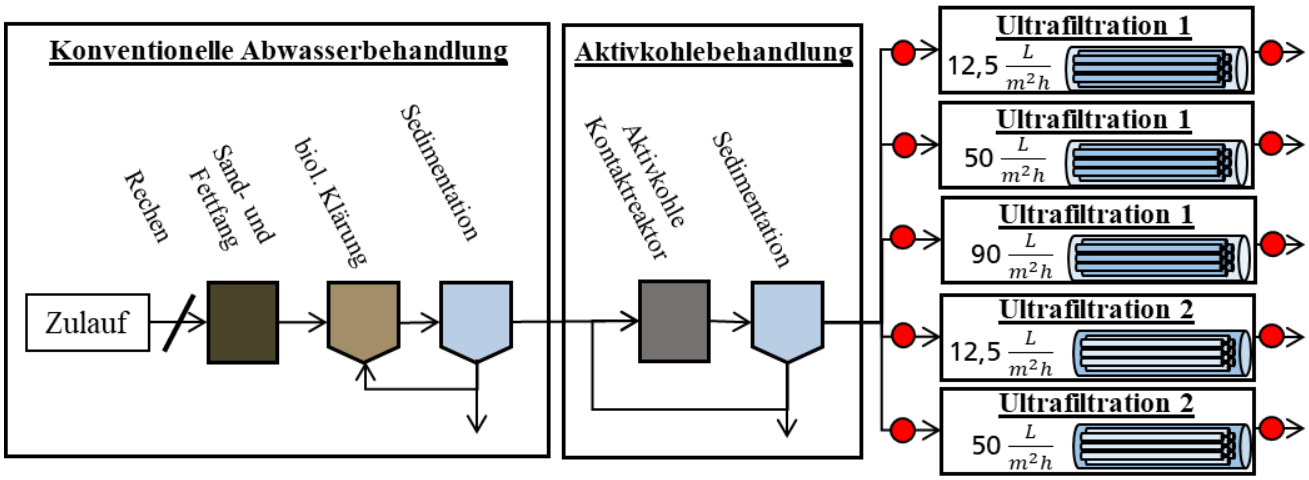

Abbildung 34: Schematische Darstellung der Prozessführung sowie die verwendeten Fluxrate der beiden Ultrafiltrationseinheiten zur Ermittlung des Einflusses vom Zulauf der Ultrafiltration. Rote Punkte: Probenahmestellen.

Ultrafiltrationseinheit 1 erreichte unabhängig von den verwendeten Fluxraten (12,5 L/m²h, 50 L/m²h und 90 L/m²h) eine Reduktion der fakultativ pathogenen Bakterien und der untersuchten Auswahl an intermediär vorkommenden Resistenzgenen (*E. coli*, *A. baumannii*, *intestinale Enterokokken*, *bla*Oxa-48, *bla*CTX-*M* und *bla*CTX-*M-32)* unter das Detektionslimit. Die übrigen Parameter konnten ausgehend von einer Reduktionleistung von ca. 5 Log-Stufen bei einer Fluxrate von 12,5 L/m²h durch eine Erhöhung des Fluxes auf 6 Log-Stufen erhöht werden. Für Ultrafiltration 2 hat eine Änderung des Zulaufes (vom Ablauf der Nachklärung auf den Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung) ebenfalls einen Rückgang der Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Ablauf zur Folge. Ultrafiltrationseinheit 2 erzielte bei einer Fluxrate von 12,5 L/m²h eine Reduktionleistung von 2 Log-Stufen. Eine Erhöhung der Fluxrate auf 50 L/m²h zeigt keinen zusätzlichen Effekt auf die Reduktion mikrobieller Kontaminationen.

Die Auswirkungen auf die mikrobielle Reduktion einer vorgeschalteten adsorptiven Reinigungsstufe sind nach dieser Stichprobe abhängig von den Eigenschaften der Membran und der Filtrationseinheit. So erzielte Ultrafiltration 1 durch eine vorgeschaltete adsorptive Stufe eine erhöhte Reduktion der untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen, welche durch die steigenden Fluxraten verbessert werden konnte.

Die Reduktion von Ultrafiltration 2 zeigte durch die vorgeschaltete adsorptive Stufe ungeachtet der Fluxrate keine signifikante Veränderung in der Reduktion.

Die mikrobielle Reduktion einer Ultrafiltration resultiert aus dem physikalischen Rückhalt und teilweise auch aus Wechselwirkungen mit der Membran und einer evtl. ausgebildeten Deckschicht. Die adsorptive Stufe besteht aus einem Kontaktreaktor mit granulierter Aktivkohle gefolgt von einem Sedimentationsbecken (vgl. Kapitel 1.5.1). Ein möglicher Grund für die Varianz im Verhalten der Eliminationsleistung wäre, dass feine Aktivkohlepartikel, welche die zusätzliche Sedimentation passieren, die Deckschicht auf der Membran der Ultrafiltration beeinflussen oder ein generell abgeändertes Strömungsverhalten induzieren. So kann die Erhöhung der Reduktion von Ultrafiltration 1 auf abgelagerte Aktivkohle in der Deckschicht und auf einen dadurch gesteigerten Rückhalt zurückgeführt werden. Für eine tiefergreifende und statistisch abgesicherte Analyse der Ursachen zum beobachteten Verhalten sind weitergehende Studien nötig. Neben den Abundanzen von mikrobiologischen Kontaminationen im Eluat muss auch der genaue Anteil an partikulären Feststoff im Zulauf sowie weitere Betriebsparameter wie der Transmembrandruck mit einbezogen werden.

3.6 Empfehlung zur erweiterten Abwasseraufbereitung an kommunalen Kläranlagen

Die durchgeführten Untersuchungen haben aufgezeigt, dass die derzeit in Deutschland verbreitete Abwasserbehandlung nicht geeignet ist, um fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene aus dem Abwasserstrom zu entfernen und an der weiteren Ausbreitung in die Umwelt zu hindern. Durch ausgewählten Verfahren und Verfahrenskombinationen der erweiterten Abwasserbehandlung, konnte allerdings eine signifikante Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen erreicht werden, welche nach internationaler Sichtweise ausreichend ist, um die Verbreitung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen zu unterbinden(Kehoe et al. 2017).

Grundsätzlich stellte sich bei dieser Arbeit das Verfahren der Ultrafiltration als besonders vielversprechend für eine umfassende Reduzierung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen heraus. Da während der Filtration fakultativ pathogene Bakterien jedoch nicht abgetötet, sondern lediglich zurückgehalten werden, konzentrieren sich alle aus dem Hauptwasserstrom entfernten mikrobiellen Kontaminationen im Retentat (Rückspülung) der Filtrationseinheit auf. Dieses Retentat zeigte sich bei ersten Untersuchungen der zwei Ultrafiltrationseinheiten als stark kontaminiert und biologisch aktiv, sodass sich mobile übertragbare „Risikogene“ durch horizontalen Gentransfer weiter verbreiten und auch auf andere Bakterien übertagen werden können. Davon ist bei hoher Bakteriendichte und –diversität auszugehen. Generell ist dieses Geschehen ein verbreitetes Problem in vielen technischen Anlagen der Aufbereitung. Speziell sind keine weiteren Erkenntnisse zum Retentat von Ultrafiltrationsanlagen im Bereich der kommunalen Abwasserbehandlung in Bezug auf ihr biologischen Risikopotential in den internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht. Die Entwicklung eines Konzepts für die weitere Behandlung bzw. den Verbleib des Retentats ist für diese Prozesskombination noch zwingend nötig.

Ein möglicher Gesamtprozess für die Reduzierung sowohl von Spurenstoffen als auf fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen besteht aus einer Ozonbehandlung inkl.

optionaler adsorptiver Reinigung für die Spurenstoffelimination sowie einer nachfolgenden Ultrafiltration für die Reduktion mikrobieller Kontaminationen. Die empfohlene Prozessanordnung für eine solche umfassende Abwasseraufbereitung ist in Abbildung 35, A dargestellt.

Als mögliche Alternative zur Reduktion mikrobieller Kontaminationen zu der Ultrafiltration zeigte die in Stichproben untersuchte Prozesskombination aus einer adsorptiven Aktivkohlebehandlung mit anschließender sequentieller Ozon/UV-Behandlung, eine zur Ultrafiltration vergleichbare Reduktion mikrobiologischer Kontaminationen. Bei diesem Aufbau werden mehrere beobachtete synergetische Effekte der einzelnen Verfahren ausgenutzt. Die Aktivkohlebehandlung reduziert den DOC des zu behandelnden Wassers und verbessert somit die mikrobielle Reduktion der Ozonbehandlung und die abschließende UV-Behandlung erzielt ebenfalls erhöhte mikrobielle Reduktionen durch die synergetische Leistung der vorgeschalteten Ozonbehandlung. In diesem Gesamtprozess soll die Aktivkohlebehandlung als Stufe der Spurenstoffreduktion angesehen werden und die sequentielle Ozon/UV-Behandlung als Stufe zur Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen. Dieser Ansatz könnte mit der noch durchzuführenden statistischen Absicherung der Ergebnisse als Alternative zur Ultrafiltration eingesetzt werden (vgl. Abbildung 35, B).

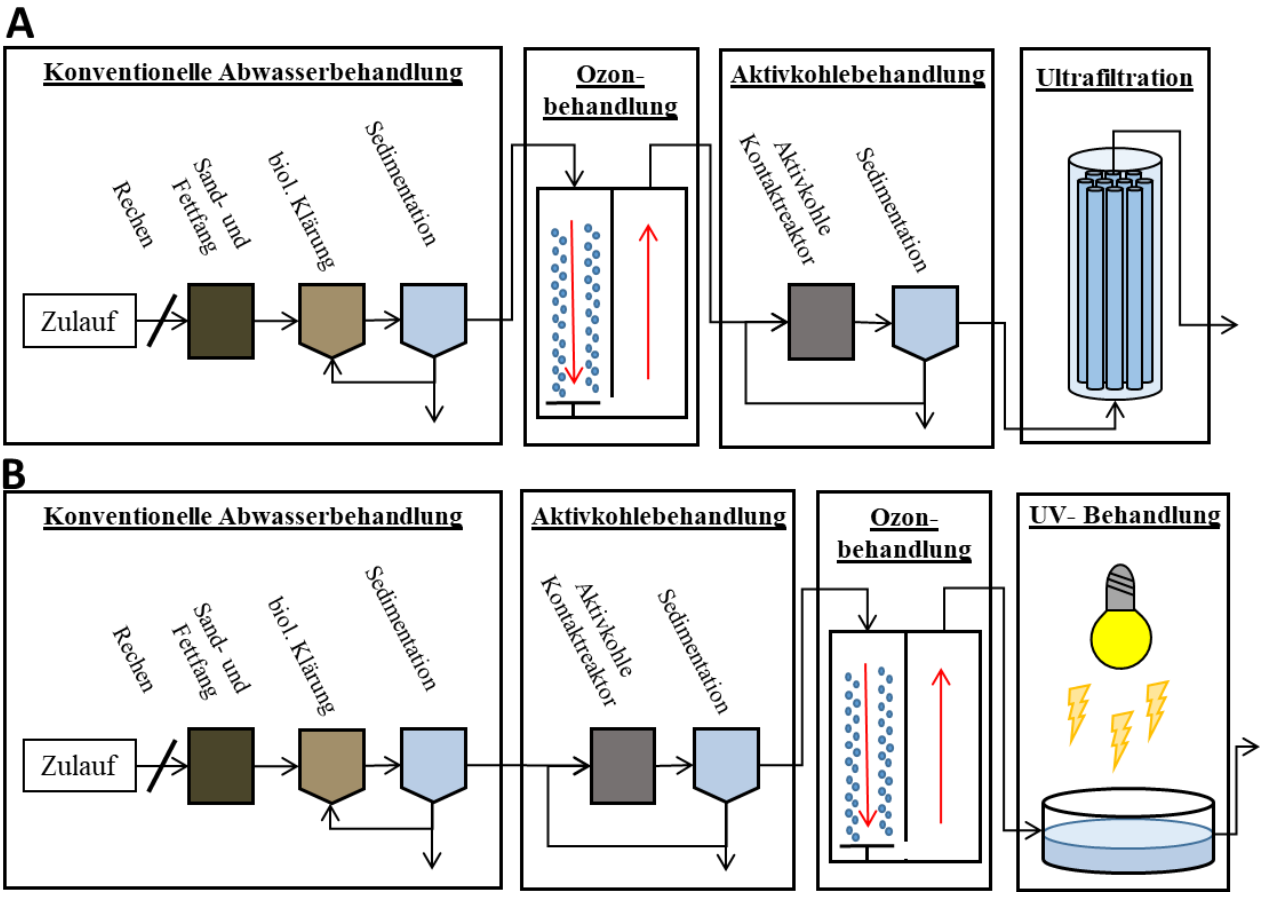

Abbildung 35: Vorschlag zweier Verfahren zur erweiterten Abwasserbehandlung, welche eine umfassende Reduktion von fakultativ pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen unter Nutzung mehrerer synergetischer Effekte ermöglicht.

Um solche Verfahren und Verfahrenskombinationen an der Kläranlage zu etablieren, muss allerdings die Problematik erkannt, und ein Anreiz für die Kläranlagenbetreiber geschaffen werden.

Erste Bestrebungen das gesundheitliche Risiko von Abwasser zu erfassen, zeigt sich bereits auf Länder übergreifenden Ebenen. Internationale Bemühungen einer Regulation von mikrobiellen Kontaminationen von Abwasser werden seitens der EU für die Wiederverwendung von Abwasser für die Bewässerung in der Landwirtschaft geführt (EU 2020/741). Jedoch werden auch in dieser Verordnung der EU in Anlehnung an die Deutsche EN12255-14:2003, lediglich Indikatororganismen (*E. coli/Coliphagen*, und *Legionella* spp.) als mikrobiologische Zielorganismen, berücksichtigt. Antibiotikaresistenzen werden in der Verordnung EU 2020/741 lediglich als optionale Anforderung berücksichtigt und das gesundheitliche Risiko der Gruppe von ESKAPE-Erregern wie von der WHO vorgeschlagen, außer Acht gelassen. Diese werden jedoch seitens der Krankenhaushygiene in Deutschland erstmals auch für den klinischen Abwasserbereich berücksichtigt (Bundesgesundheitsbl. 2020). Es werden erstmals die Belastungssituation von Abwasser auch hinsichtlich der vorkommenden Antibiotikaresistenzen und fakultativ pathogenen Bakterien (nicht nur *E. coli* als Indikatororganismus) in deren Risikobewertung von wasserführenden Systemen mit aufgenommen.

Keine der bisherigen Ansätze und Empfehlungen sind allerdings vollumfänglich, sie behandeln lediglich Teilaspekte des Gesamtproblems. Eine restrisikofreie Abwasserbehandlung ist indes

jedoch zur Zeit kaum möglich. Aus Gründen des vorsorgenden Umwelt- und Gesundheitsschutzes ist es jedoch gefordert, eine möglichst hohe Reduktionsleistung durch Implementierung zusätzlicher technischer Verfahren an Kläranlagen zeitnah einzuführen.

4 Ausblick

Obwohl sich während der Arbeit mehrere Verfahren und deren Kombinationen als potentiell geeignet herausgestellt haben, bleiben noch einige Fragestellungen bezüglich der beiden wirksamsten Verfahren offen und bieten Raum für weitere tiefergehende Untersuchungen. So bleibt zu klären, wie mit dem Retentat der Ultrafiltration weiter zu verfahren ist, damit nicht lediglich eine Verschiebung der Kontaminationsgefahr, sondern eine tatsächliche Minimierung bzw. Eliminierung stattfindet. Mögliche Ansätze hierfür sind die Rückführung in die Belebung aber auch eine weitere Volumenreduzierung und anschließende thermische Behandlung des Retentats.

Das Identifizieren sowie Optimieren geeigneter erweiterter Abwasserbehandlungsverfahren hinsichtlich der Reduktion fakultativ pathogener Bakterien sowie Antibiotikaresistenzgene war der erste Schritt zur Vermeidung der Ausbreitung über Kläranlagen und der daraus folgenden Minimierung des Gesundheitsrisikos. Der nächste Schritt wäre, einen Anreiz für Kläranlagenbetreiber zu schaffen, die identifizierten Techniken und Verfahren anzuwenden und für ihre individuellen Abwasserbedingungen zu optimieren. Dies kann beispielsweise durch die Bestimmung von geforderten minimalen Reduktionen einer Kläranlage oder Festlegung erlaubter Restkonzentrationen im Ablauf einer Kläranlage erfolgen.

Im internationalen Umfeld wird ein solcher Ansatz bereits durch die US-Water Alliance vorgeschlagen (Kehoe et al. 2017). Die Einführung und Bestimmung eines solchen Grenzwertes ist jedoch sehr komplex. Bakterien können sich in der Umwelt erneut anreichern und aus theoretischer Sicht kann ein einziger Keim, der in die Umwelt gelangt, dort proliferieren und, ausschlaggebend für eine Besiedlung von Menschen oder sogar einer Infektion z.B. bei Immun-supprimierten Personen sein. Weiterhin sind Resistenzgene aufgrund ihrer gesundheitsgefährdeten, klinischen Relevanz unterschiedlich zu bewerten. Hierbei kann erweiternd der Ansatz der unterschiedlichen Cluster der Resistenzgene hilfreich sein. Indem das Cluster der selten vorkommenden Resistenzgene, aufgrund der klinischen Relevanz der enthaltenen Gene, kritischer gewertet wird, als das Cluster der häufig vorkommenden Resistenzgene, kann eine Verfälschung der Reduktion durch verbreitete Resistenzgene minimiert werden. Die einzelnen Parameter eines Clusters können weiterhin der aktuellen Resistenzsituation angepasst werden, indem einzelne Gene eines Clusters hinzugefügt oder entfernt werden.

Für eine Gesamtbetrachtung der Belastungssituation müssen zusätzlich, neben der Kläranlage, die weiteren große Eintragspfade von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in die Umwelt bedacht werden. So ist die direkte Entlastung von Regenüberlaufbecken von Mischwassersystemen genauso kritisch zu sehen, wie das unregulierte Ausbringen von Gülle in die Umwelt. Viele dieser Punkte benötigen noch genauere Untersuchungen, welche aber zwingend notwendig sind, um die bereits kritische Resistenzsituation unter Kontrolle zu bringen.

5 Eigene Veröffentlichungen zur Thematik

5.1 Publikationen in Fachzeitschriften

Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E.T. and Schwartz, T. (2017) Occurrence of the mcr-1 Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1282.

Jäger, T., Hembach, N., Elpers, C., Wieland, A., Alexander, J., Hiller, C., Krauter, G., Schwartz, T. (2018) Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment. *Frontiers in Microbiology* **9**, 2599.

Hembach, N., Alexander, J., Hiller, C., Wieland, A. and Schwartz, T. (2019) Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant. *Scientific Reports* **9(1)**, 12843.

Voigt, A.M., Zacharias, N., Timm, C., Wasser, F., Sib, E., Skutlarek, D., Parcina, M., Schmithausen, R.M., Schwartz, T., Hembach, N., Tiehm, A., Stange, C., Engelhart, S., Bierbaum, G., Kistemann, T., Exner, M., Faerber, H.A., Schreiber, C. (2020) Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater – An evaluation of clinical influences. *Chemosphere* **241**, 125032.

Alexander, J., Hembach, N. and Schwartz, T. (2020) Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. *Scientific Reports* **10(1)**, 8952.

5.2 Weitere Veröffentlichungen

Alexander, J., Hembach, N., Schmid, F., Holler, G., Wieland, A., Schwartz, T. (2017) Reduktion von Krankheitserregern und Antibiotikaresistenzen durch verschiedene Prozesse der 4. Reinigungsstufe als Grundlage für ein mikrobiolgisches Bewertungskonzept. *Vom Wasser – Das Journal* **115,** 3.

Hembach, N., Alexander, J., Wieland, A., Hiller, C., Schwartz, T. (2018) Investigation of the elimination performance of various advanced wastewater treatment processes to reduce facultative-pathogenic bacteria. *Vom Wasser -Das Journal*, **116**, 2.

Alexander, J., Hembach, N., Schwartz, T. (2019) Die Problematik der antibiotikaresistenten Bakterien. *wwt Wasserwirtschaft Wassertechnik 2019*, **6**.

5.3 Posterbeiträge

Spurenstoffe und Krankheitserreger im Wasserkreislauf SUK (2018): Combined advanced processes in wastewater treatment for reduction of antibiotic resistant bacteria (Posterpreis)

Wasser-Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft (2018): Bewertung unterschiedlicher Abwasserreinigungsverfahren zur Entfernung fakultativ-pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene.

Xenowac II: Challenges and Solutions related to Xenobiotics and Antimicrobial Resistance in the Framework of Urban Wastewater Reuse (2018): Effect of ozone/UV process combination on antibiotic resistance genes and facultative pathogenic bacteria.

Bewertung von behandeltem Abwasser im Hinblick auf Mensch und Umwelt, Workshop Koblenz (2018): Bewertung unterschiedlicher Abwasserreinigungsverfahren zur Entfernung fakultativ-pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene.

6 Literaturverzeichnis

Aghdassi, S.J., Behnke, M., Gastmeier, P., Gropmann, A., Hansen, S., Pena Diaz, L.A., Piening, B., Rosenbusch, M.-L., Schröder, C. and Schwab, F. (2016) Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen infektionen und Antibiotikaanwendung, Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen.

Alain, K. and Querellou, J. (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. Extremophiles 13(4), 583-594.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Roberts, K. and Walter, A. (2007) Molecular Biology of the cell, Cancer pp. 1205-1268, Garland Science Taylor and Francis Group. New York, Usa.

Alexander, J., Bollmann, A., Seitz, W. and Schwartz, T. (2015) Microbiological characterization of aquatic microbiomes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. Sci Total Environ 512-513, 316-325.

Alexander, J., Hembach, N. and Schwartz, T. (2020) Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. Scientific Reports 10(1), 8952.

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

Allen, M.J., Edberg, S.C. and Reasoner, D.J. (2004) Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? International Journal of Food Microbiology 92(3), 265-274.

Altmann, J., Ruhl, A.S., Zietzschmann, F. and Jekel, M. (2014) Direct comparison of ozonation and adsorption onto powdered activated carbon for micropollutant removal in advanced wastewater treatment. Water Research 55, 185-193.

Aminov, R.I. (2011) Horizontal gene exchange in environmental microbiota. Front Microbiol 2(158), 158.

Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A. and Marotta, R. (1999) Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. Catalysis today 53(1), 51-59.

Auckenthaler, A. and von Gunten, U. (2010) Anerkannte Aufbereitungsverfahren für Trinkwasser. EDI, E.D.d.I. (ed), Bundesamt für Gesundheit

Auerbach, E.A., Seyfried, E.E. and McMahon, K.D. (2007) Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. Water Res 41(5), 1143-1151.

Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R. and Giamarellou, H. (1996) Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40(1), 221-224.

Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Burgmann, H., Sorum, H., Norstrom, M., Pons, M.N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F. and Martinez, J.L. (2015) Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. Nat Rev Microbiol 13(5), 310-317.

Blatchley III, E.R., Weng, S., Afifi, M.Z., Chiu, H.H., Reichlin, D.B., Jousset, S. and Erhardt, R.S. (2012) Ozone and UV254 radiation for municipal wastewater disinfection. Water Environment Research 84(11), 2017-2029.

Blaut, M. (2012) Vielfalt der Kulturen. Aktuelle Ernährungsmedizin 37(S 01), S2-S6.

Boehler, M., Zwickenpflug, B., Hollender, J., Ternes, T., Joss, A. and Siegrist, H. (2012) Removal of micropollutants in municipal wastewater treatment plants by powder-activated carbon. Water Science and Technology 66(10), 2115-2121.

Bourgeous, K.N., Darby, J.L. and Tchobanoglous, G. (2001) Ultrafiltration of wastewater: effects of particles, mode of operation, and backwash effectiveness. Water Res 35(1), 77-90.

Bourgin, M., Beck, B., Boehler, M., Borowska, E., Fleiner, J., Salhi, E., Teichler, R., Von Gunten, U., Siegrist, H. and McArdell, C.S. (2018) Evaluation of a full-scale wastewater treatment plant upgraded

with ozonation and biological post-treatments: Abatement of micropollutants, formation of transformation products and oxidation by-products. Water Research 129, 486-498.
Brahmi, M., Belhadi, N.H., Hamdi, H. and Hassen, A. (2009) Modeling of secondary treated wastewater disinfection by UV irradiation: effects of suspended solids content. Journal of Environmental Sciences 22(8), 1218-1224.
Breazeal, M.V., Novak, J.T., Vikesland, P.J. and Pruden, A. (2013) Effect of wastewater colloids on membrane removal of antibiotic resistance genes. Water Res 47(1), 130-140.
Brede, D.A., Snipen, L.G., Ussery, D.W., Nederbragt, A.J. and Nes, I.F. (2011) Complete genome sequence of the commensal Enterococcus faecalis 62, isolated from a healthy Norwegian infant, Am Soc Microbiol.
Brown, P.C., Borowska, E., Schwartz, T. and Horn, H. (2019) Impact of the particulate matter from wastewater discharge on the abundance of antibiotic resistance genes and facultative pathogenic bacteria in downstream river sediments. Science of The Total Environment 649, 1171-1178.
Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2019) Erneut weniger Antibiotika in der Tiermedizin abgegeben.
Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit and e.V., P.-E.-G.f.C. (2016) GERMAP 2015 – Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. , Rheinbach.
Bundesgesundheitsbl. (2018) Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 61(10), 1310-1361.
Bundesgesundheitsbl. (2020) Anforderungen der Hygiene an abwasserführende Systeme in medizinischen Einrichtungen. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 63(4), 484-501.
Bundesgesundheitsblatt (2012) [Hygiene measures for infection or colonization with multidrug-resistant gram-negative bacilli. Commission recommendation for hospital hygiene and infection prevention (KRINKO) at the Robert Koch Institute (RKI)]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 55(10), 1311-1354.
Burleson, G.R., Murray, T. and Pollard, M. (1975) Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. Appl. Environ. Microbiol. 29(3), 340-344.
Cady, N.C., Stelick, S., Kunnavakkam, M.V. and Batt, C.A. (2005) Real-time PCR detection of Listeria monocytogenes using an integrated microfluidics platform. Sensors and Actuators B: Chemical 107(1), 332-341.
Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J. and Muniesa, M. (2014) Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. Environmental Science & Technology 48(13), 7602-7611.
Cambray, G., Guerout, A.M. and Mazel, D. (2010) Integrons. Annu Rev Genet 44(1), 141-166.
Carattoli, A. (2009) Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 53(6), 2227-2238.
Carey, D.E., Zitomer, D.H., Hristova, K.R., Kappell, A.D. and McNamara, P.J. (2016) Triclocarban influences antibiotic resistance and alters anaerobic digester microbial community structure. Environmental Science & Technology 50(1), 126-134.
Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleesschauwer, B. and Cecchini, M. (2019) Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. The Lancet Infectious Diseases 19(1), 56-66.
Chan, S., Pullerits, K., Keucken, A., Persson, K.M., Paul, C.J. and Rådström, P. (2019) Bacterial release from pipe biofilm in a full-scale drinking water distribution system. NPJ biofilms and microbiomes 5, 9-9.

Chee-Sanford, J.C., Aminov, R.I., Krapac, I.J., Garrigues-Jeanjean, N. and Mackie, R.I. (2001) Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. Appl Environ Microbiol 67(4), 1494-1502.
Chen, D., Dong, S.X. and Gehr, R. (2005) Alternative Disinfection Mechanisms for Wastewaters Using Combined PAA/UV Processes. Proceedings of the Water Environment Federation 2005(1), 886-906.
Chen, Y.-C., Liu, T., Yu, C.-H., Chiang, T.-Y. and Hwang, C.-C. (2013) Effects of GC bias in next-generation-sequencing data on de novo genome assembly. PLOS ONE 8(4).
Cheng, H.-W.A., Lucy, F.E., Broaders, M.A., Mastitsky, S.E., Chen, C.-H. and Murray, A. (2012) Municipal wastewater treatment plants as pathogen removal systems and as a contamination source of noroviruses and Enterococcus faecalis. Journal of water and health 10(3), 380-389.
Cho, M., Chung, H. and Yoon, J. (2003) Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone-initiated radical reactions. Appl. Environ. Microbiol. 69(4), 2284-2291.
Chong, M.N., Sharma, A.K., Burn, S. and Saint, C.P. (2012) Feasibility study on the application of advanced oxidation technologies for decentralised wastewater treatment. Journal of Cleaner Production 35, 230-238.
Clifford, R.J., Milillo, M., Prestwood, J., Quintero, R., Zurawski, D.V., Kwak, Y.I., Waterman, P.E., Lesho, E.P. and Mc Gann, P. (2012) Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. PLOS ONE 7(11), e48558.
Courvalin, P. (2008) Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. J Intern Med 264(1), 4-16.
Criegee, R. (1975) Mechanism of Ozonolysis. Angewandte Chemie-International Edition in English 14(11), 745-752.
Crozes, G.F., Jacangelo, J.G., Anselme, C. and Laine, J.M. (1997) Impact of ultrafiltration operating conditions on membrane irreversible fouling. Journal of Membrane Science 124(1), 63-76.
Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A. and Burgmann, H. (2012) Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake geneva, Switzerland. Front Microbiol 3(106), 106.
Czekalski, N., Imminger, S., Salhi, E., Veljkovic, M., Kleffel, K., Drissner, D., Hammes, F., Burgmann, H. and von Gunten, U. (2016) Inactivation of Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes by Ozone: From Laboratory Experiments to Full-Scale Wastewater Treatment. Environ Sci Technol 50(21), 11862-11871.
Dalahmeh, S.S., Jönsson, H., Hylander, L.D., Hui, N., Yu, D. and Pell, M. (2014) Dynamics and functions of bacterial communities in bark, charcoal and sand filters treating greywater. Water Research 54, 21-32.
Darby, J.L., Snider, K.E. and Tchobanoglous, G. (1993) Ultraviolet disinfection for wastewater reclamation and reuse subject to restrictive standards. Water Environment Research 65(2), 169-180.
Davison, J. (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid 42(2), 73-91.
Depardieu, F., Perichon, B. and Courvalin, P. (2004) Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. Journal of clinical microbiology 42(12), 5857-5860.
Eliopoulos, G.M., Maragakis, L.L. and Perl, T.M. (2008) Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clinical infectious diseases 46(8), 1254-1263.
Eloe-Fadrosh, E.A., Ivanova, N.N., Woyke, T. and Kyrpides, N.C. (2016) Metagenomics uncovers gaps in amplicon-based detection of microbial diversity. Nature Microbiology 1(4), 1-4.
Emery, C.L. and Weymouth, L.A. (1997) Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. Journal of clinical microbiology 35(8), 2061-2067.
Engler-Hüsch, S., Heister, T., Mutters, N.T., Wolff, J. and Kaier, K. (2018) In-hospital costs of community-acquired colonization with multidrug-resistant organisms at a German teaching hospital. BMC health services research 18(1), 737-737.

Epa, U. (2003) National primary drinking water standards. Office of Water, US Environmental Protection Agency. Washington, DC, United States Environmental Protection Agency.
Eshed, L., Yaron, S. and Dosoretz, C.G. (2008) Effect of permeate drag force on the development of a biofouling layer in a pressure-driven membrane separation system. Appl Environ Microbiol 74(23), 7338-7347.
Facile, N., Barbeau, B., Prevost, M. and Koudjonou, B. (2000) Evaluating bacterial aerobic spores as a surrogate for Giardia and Cryptosporidium inactivation by ozone. Water Research 34(12), 3238-3246.
Farooq, S., Chian, E. and Engelbrecht, R. (1977) Basic concepts in disinfection with ozone. Journal (Water Pollution Control Federation), 1818-1831.
Ferella, F., De Michelis, I., Zerbini, C. and Vegliò, F. (2013) Advanced treatment of industrial wastewater by membrane filtration and ozonization. Desalination 313, 1-11.
Feuerpfeil, I., López-Pila, J., Schmidt, R., Schneider, E. and Szewzyk, R. (1999) Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 42(1), 37-50.
Ford, T.E. (1999) Microbiological safety of drinking water: United States and global perspectives. Environ Health Perspect 107 Suppl 1(suppl 1), 191-206.
Frahm, E. and Obst, U. (2003) Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of Enterococcus spp. and Escherichia coli in water samples. Journal of Microbiological Methods 52(1), 123-131.
Futselaar, H., Schonewille, H., van Dalfsen, H. and Shen, L. (2003) Ultrafiltration technology for potable, process and wastewater treatment. MEMBRANE SCIENCE AND TECHNOLOGY-LANZHOU- 23(4), 246-254.
Gao, Y., Li, Y., Zhang, L., Huang, H., Hu, J., Shah, S.M. and Su, X. (2012) Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. J Colloid Interface Sci 368(1), 540-546.
Gehr, R., Wagner, M., Veerasubramanian, P. and Payment, P. (2003) Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. Water Research 37(19), 4573-4586.
Gelate, P., Hodnett, M. and Zeqiri, B. (2000) Supporting infrastructure and early measurements. National Physical Laboratory Report, Teddington, Middlesex, UK, 2-11.
Geletneky, C. and Berger, S. (1998) The Mechanism of Ozonolysis Revisited by17O-NMR Spectroscopy. European Journal of Organic Chemistry 1998(8), 1625-1627.
Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M. and Stokes, H.W. (2008) The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. Journal of bacteriology 190(14), 5095-5100.
Goosen, M., Sablani, S., Al-Hinai, H., Al-Obeidani, S., Al-Belushi, R. and Jackson, a. (2005) Fouling of reverse osmosis and ultrafiltration membranes: a critical review. Separation Science and Technology 39(10), 2261-2297.
Gravel, A., Messier, N. and Roy, P.H. (1998) Point mutations in the integron integrase IntI1 that affect recombination and/or substrate recognition. Journal of bacteriology 180(20), 5437-5442.
Grinsted, J., de la Cruz, F. and Schmitt, R. (1990) The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. Plasmid 24(3), 163-189.
Guo, C., Wang, K., Hou, S., Wan, L., Lv, J., Zhang, Y., Qu, X., Chen, S. and Xu, J. (2017) H2O2 and/or TiO2 photocatalysis under UV irradiation for the removal of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes. J Hazard Mater 323(Pt B), 710-718.
Harm, W. (1980) Biological effects of ultraviolet radiation, Cambridge University Press Cambridge.
Hartmann, A. (2004/2005) Übertragung von Erbmaterial: Horizonaler Gentransfer- ein natürlicher Prozess, pp. 59-67, GSF- Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.

Hassani, M. (2014) The crisis of resistant Gram-negative bacterial infections: is there any hope for ESKAPE. Clin Infect Dis 1, 1005.
Hassen, A., Mahrouk, M., Ouzari, H., Cherif, M., Boudabous, A. and Damelincourt, J.J. (2000) UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device. Bioresource Technology 74(2), 141-150.
Hembach, N., Alexander, J., Hiller, C., Wieland, A. and Schwartz, T. (2019) Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant. Sci Rep 9(1), 12843.
Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E.T. and Schwartz, T. (2017) Occurrence of the mcr-1 Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. Front Microbiol 8(1282), 1282.
Hijnen, W., Medema, G., Baars, E., Bosklopper, T., Veer, A. and Meijers, R. (2004a) Influence of DOC on the Inactivation Efficiency of Ozonation Assessed with Clostridium perfringens and a Lab-Scale Continuous Flow System. Ozone-science & Engineering - OZONE-SCI ENG 26.
Hijnen, W., Van Der Veer, A., Beerendonk, E. and Medema, G.J. (2004b) Increased resistance of environmental anaerobic spores to inactivation by UV. Water science and technology: Water supply 4(2), 55-61.
Hijnen, W.A., Beerendonk, E.F. and Medema, G.J. (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. Water Res 40(1), 3-22.
Hiller, C.X., Hubner, U., Fajnorova, S., Schwartz, T. and Drewes, J.E. (2019) Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. Sci Total Environ 685, 596-608.
Ho, J., Seidel, M., Niessner, R., Eggers, J. and Tiehm, A. (2016) Long amplicon (LA)-qPCR for the discrimination of infectious and noninfectious phix174 bacteriophages after UV inactivation. Water Research 103, 141-148.
Hoff, J.C. (1986) Inactivation of microbial agents by chemical disinfectants. U.S. Environ. Protection Agency.
Hubner, U., Zucker, I. and Jekel, M. (2015) Options and limitations of hydrogen peroxide addition to enhance radical formation during ozonation of secondary effluents. Journal of Water Reuse and Desalination 5(1), 8-16.
Huerta, B., Marti, E., Gros, M., Lopez, P., Pompeo, M., Armengol, J., Barcelo, D., Balcazar, J.L., Rodriguez-Mozaz, S. and Marce, R. (2013) Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. Sci Total Environ 456-457, 161-170.
Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W. and Hauser, L.J. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. BMC bioinformatics 11(1), 119.
Iakovides, I.C., Michael-Kordatou, I., Moreira, N.F.F., Ribeiro, A.R., Fernandes, T., Pereira, M.F.R., Nunes, O.C., Manaia, C.M., Silva, A.M.T. and Fatta-Kassinos, D. (2019) Continuous ozonation of urban wastewater: Removal of antibiotics, antibiotic-resistant Escherichia coli and antibiotic resistance genes and phytotoxicity. Water Res 159, 333-347.
Ikonomidis, A., Tokatlidou, D., Kristo, I., Sofianou, D., Tsakris, A., Mantzana, P., Pournaras, S. and Maniatis, A.N. (2005) Outbreaks in distinct regions due to a single Klebsiella pneumoniae clone carrying a bla VIM-1 metallo-{beta}-lactamase gene. Journal of clinical microbiology 43(10), 5344-5347.
ISO7899 (1997) ISO 7899-2: water quality. Enumeration of faecal enterococci by membrane filtration.
Jager, T., Alexander, J., Kirchen, S., Dotsch, A., Wieland, A., Hiller, C. and Schwartz, T. (2018a) Live-dead discrimination analysis, qPCR assessment for opportunistic pathogens, and population analysis at ozone wastewater treatment plants. Environ Pollut 232, 571-579.

Jager, T., Hembach, N., Elpers, C., Wieland, A., Alexander, J., Hiller, C., Krauter, G. and Schwartz, T. (2018b) Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment. Front Microbiol 9(2599), 2599.
Janex, M., Savoye, P., Do-Quang, Z., Blatchley Iii, E. and Laine, J. (1998) Impact of water quality and reactor hydrodynamics on wastewater disinfection by UV, use of CFD modeling for performance optimization. Water Science and Technology 38(6), 71-77.
Jolis, D., Lam, C. and Pitt, P. (2001) Particle effects on ultraviolet disinfection of coliform bacteria in recycled water. Water Environment Research 73(2), 233-236.
Jungfer, C. (2006) Einfluss der UV-Desinfektion auf molekulare Reparaturmechanismen bei Bakterien im Trinkwasser, Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, Univesität ….
Jungfer, C., Schwartz, T. and Obst, U. (2007) UV-induced dark repair mechanisms in bacteria associated with drinking water. Water Res 41(1), 188-196.
Kämpfer, P. (1997) Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge. FEMS Microbiology Ecology 23(3), 169-181.
Kang, S.T., Subramani, A., Hoek, E.M.V., Deshusses, M.A. and Matsumoto, M.R. (2004) Direct observation of biofouling in cross-flow microfiltration: mechanisms of deposition and release. Journal of Membrane Science 244(1-2), 151-165.
Kehoe, P., Abbott, S., Anderson, A., Bautista, j., Bernaados, B., Davis, B., Deem, S., Jon, E., Edwards-Brandt, J., El-Aarag, M., Elmir, S., FGarland, J., Goldenberg, B., Good, B., Graf, C., Icenogle, B., Jaeger, M., Lipsky, D., Morita, J., Pruder, S., Rho, M., Salmonson, G., Shapiro, N., Stefani, R., Tam, W., Taylor, J., Usawa, B., Wanner, c. and Weintraub, J. (2017) A Guidebook for Developing and implementing Regulations for Onsite Non-Potable Water Systems, US water Alliance, WE&RF and WRF.
Kibbee, R.J. and Örmeci, B. (2017) Development of a sensitive and false-positive free PMA-qPCR viability assay to quantify VBNC Escherichia coli and evaluate disinfection performance in wastewater effluent. Journal of Microbiological Methods 132, 139-147.
Klein, G., Pack, A. and Reuter, G. (1998) Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. Appl Environ Microbiol 64(5), 1825-1830.
Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P.A.I. and Graham, D.W. (2010) Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940. Environmental Science & Technology 44(2), 580-587.
Koivunen, J., Siitonen, A. and Heinonen-Tanski, H. (2003) Elimination of enteric bacteria in biological–chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. Water Research 37(3), 690-698.
Kristich, C.J., Wells, C.L. and Dunny, G.M. (2007) A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in Enterococcus faecalis mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(9), 3508-3513.
Kruithof, J., Van der Leer, R.C. and Hijnen, W.A. (1992) Practical experiences with UV disinfection in the Netherlands. Aqua- Journal of Water Supply: Research and Technology 41(2), 88-94.
Kurpiel, P.M. and Hanson, N.D. (2011) Association of IS5 with divergent tandem blaCMY-2 genes in clinical isolates of Escherichia coli. J Antimicrob Chemother 66(8), 1734-1738.
l, B. (2004) Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer. Abwasserverordnung (ed), Bundesrepublik Deutschland.
Lai, K.K.-Y., Cook, L., Krantz, E.M., Corey, L. and Jerome, K.R. (2005) Calibration Curves for Real-Time PCR. Clinical Chemistry 51(7), 1132-1136.
Lam, M.M., Seemann, T., Bulach, D.M., Gladman, S.L., Chen, H., Haring, V., Moore, R.J., Ballard, S., Grayson, M.L. and Johnson, P.D. (2012) Comparative analysis of the first complete Enterococcus faecium genome. Journal of bacteriology 194(9), 2334-2341.
Langlais, B., Reckhow, D.A. and Brink, D.R. (1991) Ozone in water treatment: application and engineering. Co-operative Research Report., CRC press.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol 10(3), R25.
Lawrence, R. and Jeyakumar, E. (2013) Antimicrobial resistance: a cause for global concern, p. S1, BioMed Central.
Lazarova, V., Janex, M., Fiksdal, L., Oberg, C., Barcina, I. and Pommepuy, M. (1998) Advanced wastewater disinfection technologies: short and long term efficiency. Water Science and Technology 38(12), 109-117.
Lazarova, V., Liechti, P.-A., Savoye, P. and Hausler, R. (2013) Ozone disinfection: main parameters for process design in wastewater treatment and reuse. Journal of Water Reuse and Desalination 3(4), 337-345.
Lazcka, O., Del Campo, F.J. and Munoz, F.X. (2007) Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. Biosensors and bioelectronics 22(7), 1205-1217.
Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M. and Déziel, E. (2006) Genomic analysis reveals that Pseudomonas aeruginosa virulence is combinatorial. Genome Biology 7(10), R90.
Lepper, P.M., Grusa, E., Reichl, H., Hogel, J. and Trautmann, M. (2002) Consumption of imipenem correlates with beta-lactam resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 46(9), 2920-2925.
Levy, S.B. and Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med 10(12 Suppl), S122-129.
Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J.R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A.S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, J., Xu, X., Xiao, L., Liang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Chen, W., Zhao, H., Al-Aama, J.Y., Edris, S., Yang, H., Wang, J., Hansen, T., Nielsen, H.B., Brunak, S., Kristiansen, K., Guarner, F., Pedersen, O., Dore, J., Ehrlich, S.D., Meta, H.I.T.C., Bork, P., Wang, J. and Meta, H.I.T.C. (2014) An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. Nat Biotechnol 32(8), 834-841.
Liebert, C.A., Hall, R.M. and Summers, A.O. (1999) Transposon Tn21, flagship of the floating genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63(3), 507-522.
Lindenauer, K.G. and Darby, J.L. (1994) Ultraviolet disinfection of wastewater: effect of dose on subsequent photoreactivation. Water Research 28(4), 805-817.
Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. and Law, M. (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. BioMed Research International 2012.
Lu, X., Zhang, X.-X., Wang, Z., Huang, K., Wang, Y., Liang, W., Tan, Y., Liu, B. and Tang, J. (2015) Bacterial pathogens and community composition in advanced sewage treatment systems revealed by metagenomics analysis based on high-throughput sequencing. PLOS ONE 10(5).
Luddeke, F., Hess, S., Gallert, C., Winter, J., Gude, H. and Loffler, H. (2015) Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. Water Res 69, 243-251.
Lüneberg, K., Schneider, D., Siebe, C. and Daniel, R. (2018) Drylands soil bacterial community is affected by land use change and different irrigation practices in the Mezquital Valley, Mexico. Scientific Reports 8(1), 1413.
Luo, J., Ding, L., Qi, B., Jaffrin, M.Y. and Wan, Y. (2011) A two-stage ultrafiltration and nanofiltration process for recycling dairy wastewater. Bioresource Technology 102(16), 7437-7442.
Lupo, A., Coyne, S. and Berendonk, T.U. (2012) Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. Front Microbiol 3(18), 18.
Ma, B., Xue, W., Hu, C., Liu, H., Qu, J. and Li, L. (2019) Characteristics of microplastic removal via coagulation and ultrafiltration during drinking water treatment. Chemical Engineering Journal 359, 159-167.
Madge, B.A. and Jensen, J.N. (2006) Ultraviolet disinfection of fecal coliform in municipal wastewater: effects of particle size. Water Environment Research 78(3), 294-304.

Mahvi, A., Dehghani, M. and Vaezi, F. (2005a) Ultrasonic technology effectiveness in total coliforms disinfection of water. J App Sci 5, 856-858.
Mahvi, A.H. (2009) Application of Ultrasonic Technology for Water and Wastewater Treatment. Iranian Journal of Public Health 38(2), 1-17.
Mahvi, A.H., Dehghani, M. and Kia, E. (2005b) Inactivation of nematodes by ultrasonic. J Med Sci 5, 75-77.
Malley, J.P. (2004) Inactivation of pathogens with innovative UV technologies, American Water Works Association.
Mannapperuma, J.D. and Santos, M.R. (2004) Reconditioning of poultry chiller overflow by ultrafiltration. Journal of food process engineering 27(6), 497-516.
Mardis, E.R. (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends in Genetics 24(3), 133-141.
Mason, C., Ward, G., Abu-Salah, K., Keren, O. and Dosoretz, C. (2000) Biodegradation of BTEX by bacteria on powdered activated carbon. Bioprocess Engineering 23(4), 331-336.
Mason, T.J. and Lorimer, J.P. (2002) Applied sonochemistry. The uses of power ultrasound in chemistry and processing, 1-48.
Maya, C., Beltrán, N., Jiménez, B. and Bonilla, P. (2003) Evaluation of the UV disinfection process in bacteria and amphizoic amoebae inactivation. Water Science and Technology: Water Supply 3(4), 285-291.
McCarty, S.C. and Atlas, R.M. (1993) Effect of amplicon size on PCR detection of bacteria exposed to chlorine. Genome Research 3(3), 181-185.
McKinney, C.W., Loftin, K.A., Meyer, M.T., Davis, J.G. and Pruden, A. (2010) tet and sul antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence. Environ Sci Technol 44(16), 6102-6109.
McKinney, C.W. and Pruden, A. (2012) Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. Environ Sci Technol 46(24), 13393-13400.
Metcalf, Eddy, Tchobanoglous, G., Stensel, H.D., Tsuchihashi, R., Burton, F.L., Abu-Orf, M., Bowden, G. and Pfrang, W. (2014) Wastewater engineering : treatment and resource recovery.
Meyer, E., Schröder, C., Gastmeier, P. and Geffers, C. (2014) Rückgang von nosokomialen MRSA-Infektionen in Deutschland. Dtsch Arztebl International 111(19), 331-336.
Mofidi, A.A., Meyer, E.A., Wallis, P.M., Chou, C.I., Meyer, B.P., Ramalingam, S. and Coffey, B.M. (2002) The effect of UV light on the inactivation of Giardia lamblia and Giardia muris cysts as determined by animal infectivity assay (P-2951-01). Water Research 36(8), 2098-2108.
Monteiro, J., Widen, R.H., Pignatari, A.C., Kubasek, C. and Silbert, S. (2012) Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother 67(4), 906-909.
Morinaga, H., Nehijima, W. and Okada, M. (2003) Stimulation of bacterial activity by the addition of different PACs. Environmental technology 24(2), 179-186.
Müller, H., Sib, E., Gajdiss, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R.M., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M., Schreiber, C. and Bierbaum, G. (2018) Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. FEMS Microbiology Ecology 94(5).
Navidinia, M. (2016) The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. Journal of Paramedical Sciences 7(3), 43-57.
Nebot Sanz, E., Salcedo Davila, I., Andrade Balao, J.A. and Quiroga Alonso, J.M. (2007) Modelling of reactivation after UV disinfection: effect of UV-C dose on subsequent photoreactivation and dark repair. Water Res 41(14), 3141-3151.
Neuhauser, M.M., Weinstein, R.A., Rydman, R., Danziger, L.H., Karam, G. and Quinn, J.P. (2003) Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. JAMA 289(7), 885-888.

Nocker, A., Sossa, K.E. and Camper, A.K. (2007) Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. J Microbiol Methods 70(2), 252-260.
Noll, I., Schweickert, B., Abu Sin, M., Feig, M., Claus, H. and Eckmann, T. (2012) Daten zur Antibiotikaresistenzlage in Deutschland. Bundesgesundheitsbl. 2012 55, 1370-1376.
Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R. and Livermore, D.M. (2011) The emerging NDM carbapenemases. Trends Microbiol 19(12), 588-595.
Okitsu, N., Kaieda, S., Yano, H., Nakano, R., Hosaka, Y., Okamoto, R., Kobayashi, T. and Inoue, M. (2005) Characterization of ermB gene transposition by Tn1545 and Tn917 in macrolide-resistant Streptococcus pneumoniae isolates. Journal of clinical microbiology 43(1), 168-173.
Organization, W.H. (2014) Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, World Health Organization.
Orta de Velásquez, M.T., Yáñez Noguez, I., Casasola Rodriguez, B. and Román Román, P.I. (2017) Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC Helicobacter pylori by molecular techniques and FESEM images. Environmental technology 38(6), 744-753.
Paluszak, Z., Ligocka, A. and Breza-Boruta, B. (2003) Effectiveness of Sewage Treatment Based on Selected Faecal Bacteria Elimination in Municipal Wastewater Treatment Plant in Toru. Polish Journal of Environmental Studies 12(3).
Pärnänen, K., Karkman, A., Tamminen, M., Lyra, C., Hultman, J., Paulin, L. and Virta, M. (2016) Evaluating the mobility potential of antibiotic resistance genes in environmental resistomes without metagenomics. Scientific Reports 6(1), 35790.
Paterson, D.L., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Yeiser, B., Bonomo, M.D., Rice, L.B., Bonomo, R.A. and International Klebsiella Study, G. (2003) Extended-spectrum beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 47(11), 3554-3560.
Peak, N., Knapp, C.W., Yang, R.K., Hanfelt, M.M., Smith, M.S., Aga, D.S. and Graham, D.W. (2007) Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. Environmental Microbiology 9(1), 143-151.
Pesesky, M.W., Hussain, T., Wallace, M., Wang, B., Andleeb, S., Burnham, C.A. and Dantas, G. (2015) KPC and NDM-1 genes in related Enterobacteriaceae strains and plasmids from Pakistan and the United States. Emerg Infect Dis 21(6), 1034-1037.
Pinnekamp, J. and Friedrich, H. (2006) Bd. 1: Membrantechnik für die Abwasserreinigung.
Ploy, M.-C., Lambert, T., Couty, J.-P. and Denis, F. (2000) Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. Clinical chemistry and laboratory medicine 38(6), 483-487.
Poirel, L., Potron, A. and Nordmann, P. (2012) OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J Antimicrob Chemother 67(7), 1597-1606.
Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H. and Carlson, K.H. (2006) Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. Environmental Science & Technology 40(23), 7445-7450.
Qu, F.S., Liang, H., Zhou, J., Nan, J., Shao, S.L., Zhang, J.Q. and Li, G.B. (2014) Ultrafiltration membrane fouling caused by extracellular organic matter (EOM) from Microcystis aeruginosa: Effects of membrane pore size and surface hydrophobicity. Journal of Membrane Science 449, 58-66.
Qualls, R.G. and Johnson, J.D. (1983) Bioassay and dose measurement in UV disinfection. Appl. Environ. Microbiol. 45(3), 872-877.
Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P. and El Jaziri, M. (2015) The formation of biofilms by Pseudomonas aeruginosa: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. Biomed Res Int 2015, 759348.
Rice, L.B. (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE, The University of Chicago Press.
Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, I. and Fatta-Kassinos, D. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. Sci Total Environ 447, 345-360.

Robert-Koch-Institut (2019) Antibiotika Resistenz Surveillance.
Rocha, J., Cacace, D., Kampouris, I., Guilloteau, H., Jäger, T., Marano, R.B.M., Karaolia, P., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Berendonk, T.U. and Schwartz, T. (2018) Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes. Journal of Environmental Chemical Engineering.
Roeske, W. and Ritter, K. (2007) Trinkwasserdesinfektion: Grundlagen, Verfahren, Anlagen, Geräte, Mikrobiologie, Chlorung, Ozonung, UV-Bestrahlung, Membranfiltration, Qualitätssicherung, Oldenbourg Industrieverlag.
Romanowski, G., Lorenz, M.G. and Wackernagel, W. (1991) Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. Appl Environ Microbiol 57(4), 1057-1061.
Rossolini, G.M., Arena, F., Pecile, P. and Pollini, S. (2014) Update on the antibiotic resistance crisis. Curr Opin Pharmacol 18, 56-60.
Rubin, R.J., Harrington, C.A., Poon, A., Dietrich, K., Greene, J.A. and Moiduddin, A. (1999) The economic impact of Staphylococcus aureus infection in New York City hospitals. Emerg Infect Dis 5(1), 9-17.
Saeki, K., Sakai, M. and Wada, S.I. (2010) DNA adsorption on synthetic and natural allophanes. Applied Clay Science 50(4), 493-497.
Salladini, A., Prisciandaro, M. and Barba, D. (2007) Ultrafiltration of biologically treated wastewater by using backflushing. Desalination 207(1-3), 24-34.
Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J.A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., Voigt, A. and Kreyenschmidt, J. (2020) ESKAPE Bacteria and Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Escherichia coli Isolated from Wastewater and Process Water from German Poultry Slaughterhouses. Applied and Environmental Microbiology 86(8), e02748-02719.
Savoye, P., Janex, M. and Lazarova, V. (2001) Wastewater disinfection by low-pressure UV and ozone: a design approach based on water quality. Water Science and Technology 43(10), 163-171.
Schäfer, A.I., Fane, A.G. and Waite, T.D. (2000) Fouling effects on rejection in the membrane filtration of natural waters. Desalination 131(1), 215-224.
Schluter, A., Krause, L., Szczepanowski, R., Goesmann, A. and Puhler, A. (2008) Genetic diversity and composition of a plasmid metagenome from a wastewater treatment plant. J Biotechnol 136(1-2), 65-76.
Schwabe, U., Paffrath, D., Ludwig, W.-D. and Klauber, J. (2018) Arzneiverordnungs-report 2018, Springer.
Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B. and Obst, U. (2003) Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiol Ecol 43(3), 325-335.
Scott, D.B. and Lesher, E.C. (1963) Effect of Ozone on Survival and Permeability of Escherichia Coli. J Bacteriol 85(3), 567-576.
Severin, B.F., Suidan, M.T. and Engelbrecht, R.S. (1983) Kinetic Modeling of Uv Disinfection of Water. Water Research 17(11), 1669-1678.
Sheldon, B.W. and Brown, A. (1986) Efficacy of ozone as a disinfectant for poultry carcasses and chill water. Journal of Food Science 51(2), 305-309.
Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F. and Hajibabaei, M. (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. Molecular Ecology 21(8), 1794-1805.
Skov, R.L. and Monnet, D.L. (2016) Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. Euro Surveill 21(9), 30155.
Slama, T.G. (2008) Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. Crit Care 12 Suppl 4(4), S4.
Soledad Ramírez, M., Pineiro, S. and Centron, D. (2009) Novel Insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. Microbial Agents and chemotherapy 54(2), 699 -706.

Somensi, C.A., Simionatto, E.L., Bertoli, S.L., Wisniewski, A., Jr. and Radetski, C.M. (2010) Use of ozone in a pilot-scale plant for textile wastewater pre-treatment: physico-chemical efficiency, degradation by-products identification and environmental toxicity of treated wastewater. J Hazard Mater 175(1-3), 235-240.
Sommer, R., Cabaj, A. and Haider, T. (1996) Microbicidal effect of reflected UV radiation in devices for water disinfection. Water Science and Technology 34(7-8), 173.
Sørensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N. and Wuertz, S. (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. Nature Reviews Microbiology 3(9), 700-710.
Staehelin, J. and Hoigne, J. (1982) Decomposition of Ozone in Water - Rate of Initiation by Hydroxide Ions and Hydrogen-Peroxide. Environmental Science & Technology 16(10), 676-681.
Su, H.C., Pan, C.G., Ying, G.G., Zhao, J.L., Zhou, L.J., Liu, Y.S., Tao, R., Zhang, R.Q. and He, L.Y. (2014) Contamination profiles of antibiotic resistance genes in the sediments at a catchment scale. Sci Total Environ 490, 708-714.
Suslick, K.S. (1994) The chemistry of Ultrasound, Encyclopaedia Britannica.
Suss, J., Volz, S., Obst, U. and Schwartz, T. (2009) Application of a molecular biology concept for the detection of DNA damage and repair during UV disinfection. Water Res 43(15), 3705-3716.
Szczepanowski, R., Bekel, T., Goesmann, A., Krause, L., Kromeke, H., Kaiser, O., Eichler, W., Puhler, A. and Schluter, A. (2008) Insight into the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to antimicrobial drugs analysed by the 454-pyrosequencing technology. J Biotechnol 136(1-2), 54-64.
Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W. and Schleifer, K.-H. (2000) Microbiological safety of drinking water. Annual Reviews in Microbiology 54(1), 81-127.
Tacconelli, E., Magrini, N., Kahlmeter, G. and Singh, N. (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization 27.
Tchobanoglous, G., Burton, F.L. and Stensel, H.D. (2003) Metcalf & Eddy wastewater engineering: treatment and reuse. International Edition. McGrawHill 4, 361-411.
Thoma, F. (1999) Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. EMBO J 18(23), 6585-6598.
Thomas, C.M. and Nielsen, K.M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat Rev Microbiol 3(9), 711-721.
Thomas, M.R., Rautenbach (2007) Membranverfahren Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung, Springer- Verlag Berlin Heidelberg.
Vadivoo, N.S. and Usha, B. (2018) ESKAPE pathogens: Trends in antibiotic resistance pattern.
van der Zee, A., Roorda, L., Bosman, G., Fluit, A.C., Hermans, M., Smits, P.H., van der Zanden, A.G., Te Witt, R., Bruijnesteijn van Coppenraet, L.E., Cohen Stuart, J. and Ossewaarde, J.M. (2014) Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. BMC Infect Dis 14(1), 27.
van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Veldman, K. and Mevius, D. (2007) Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in Escherichia coli, Salmonella and Campylobacter spp. in the Netherlands. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 59(4), 746-750.
Volkmann, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S. and Obst, U. (2004) Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). J Microbiol Methods 56(2), 277-286.
von Gunten, U. (2005) Verminderung der Konzentration von Spurenstoffen: Was leistet die Trinkwasseraufbereitung? GWA. Gas, Wasser, Abwasser 85(1), 53-59.
von Gunten, U., Driedger, A., Gallard, H. and Salhi, E. (2001) By-products formation during drinking water disinfection: a tool to assess disinfection efficiency? Water Res 35(8), 2095-2099.
Von Sonntag, C., Kolch, A., Gebel, J., Oguma, K. and Sommer, R. (2003) The photochemical basis of UV disinfection.

Von Sonntag, C. and Von Gunten, U. (2012) Chemistry of ozone in water and wastewater treatment, IWA publishing.
von Wintersdorff, C.J., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H. and Wolffs, P.F. (2016) Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. Frontiers in Microbiology 7, 173.
Wallmann, J. and Römer, A. (2014) GERMAP 2012 Antibiotika-Resistenz und-Verbrauch Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human-und Veterinärmedizin in Deutschland.
Walsh, T.R. (2010) Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J Antimicrob Agents 36 Suppl 3, S8-14.
Whitby, G. and Palmateer, G. (1993) The effect of UV transmission, suspended solids and photoreactivation on microorganisms in wastewater treated with UV light. Water Science and Technology 27(3-4), 379-386.
White, P.A., McIver, C.J. and Rawlinson, W.D. (2001) Integrons and gene cassettes in theenterobacteriaceae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45(9), 2658-2661.
WHO (2008) Guidelines for Drinking-water Quality. WHO Chronicle 1(3), 334-415.
Wood, D.E. and Salzberg, S.L. (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. Genome Biol 15(3), R46.
Xia, R., Ren, Y., Guo, X. and Xu, H. (2013) Molecular diversity of class 2 integrons in antibiotic-resistant gram-negative bacteria found in wastewater environments in China. Ecotoxicology 22(2), 402-414.
Xu, P., Janex, M.-L., Savoye, P., Cockx, A. and Lazarova, V. (2002) Wastewater disinfection by ozone: main parameters for process design. Water Research 36(4), 1043-1055.
Zhang, F., Xi, J., Huang, J.-J. and Hu, H.-Y. (2013) Effect of inlet ozone concentration on the performance of a micro-bubble ozonation system for inactivation of Bacillus subtilis spores. Separation and Purification Technology 114, 126-133.
Zhang, S., Ye, C., Lin, H., Lv, L. and Yu, X. (2015) UV disinfection induces a VBNC state in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Environmental Science & Technology 49(3), 1721-1728.
Zhang, X.-X., Zhang, T., Zhang, M., Fang, H.H. and Cheng, S.-P. (2009) Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants. Applied Microbiology and Biotechnology 82(6), 1169-1177.
Zhang, Y.Q., Wu, Q.P., Zhang, J.M. and Yang, X.H. (2011) Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in Pseudomonas aeruginosa. J Appl Microbiol 111(4), 1006-1015.
Zhou, C.E., Smith, J., Lam, M., Zemla, A., Dyer, M.D. and Slezak, T. (2007) MvirDB--a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. Nucleic Acids Res 35(Database issue), D391-394.
Zucker, I., Lester, Y., Avisar, D., Hübner, U., Jekel, M., Weinberger, Y. and Mamane, H. (2015) Influence of wastewater particles on ozone degradation of trace organic contaminants. Environmental Science & Technology 49(1), 301-308.
Zuma, F., Lin, J. and Jonnalagadda, S.B. (2009) Ozone-initiated disinfection kinetics of Escherichia coli in water. Journal of Environmental Science and Health, Part A 44(1), 48-56.

7 Erklärung zur vorliegenden Arbeit gemäß §22/7 APB

Hiermit erkläre ich, Norman Hembach,
geboren am 15.11.1988,
in Lindlar,

- dass ich in der Vergangenheit weder an der Technische Universität Darmstadt noch an einer anderen Technischen Hochschule oder Universität an einer Promotion gearbeitet oder Ähnliches versucht habe
- dass meine Dissertation nur unter Einbeziehung der von mir genannten Hilfen von mir selbständig verfasst und angefertigt wurde.

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift

Anhang

7.1 Protokoll der DNA-Extraktion

Das verwendete Protokoll ist leicht angepasst an die DNA-Extraktion aus Abwasserproben. Alle verwendeten Lösungen sind im Fast DNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) enthalten.

- Zugabe von 827 µL Sodium Phosphat-Puffer
- Zugabe von 122 µL MT Puffer
- Aufschluss der Probe durch Rybolyser (40s bei Stufe 6). FASTPREP® Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) enthalten
- 60 Sek. bei 13000 g zentrifugieren
- Überstand in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 250 µL PBS-Puffer
- 10x invertieren um Lösungen zu homogenisieren
- 5 Min. bei 13000 g zentrifugieren
- Überstand in neues 2 mL Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 1 mL der Binding Matrix
- 2 Min. von Hand schütteln
- Matrix 5 Min. absetzen lassen
- 1500 µL des Überstand verwerfen
- Binding Matrix im verbleibenden Überstand resuspendieren und in SPIN TM Filter Tubes überführen
- 1 Min. bei 13000 g zentrifugieren
- Eluat verwerfen
- Zugabe von 500 µL SEWS-M
- 1 Min. bei 13000 g zentrifugieren
- Eluat verwerfen
- 2 Min. bei 13000 g zentrifugieren
- SPIN TM Filter in neues Reaktionsgefäß überführen
- Filter 5 Min. bei geöffnetem Reaktionsgefäß trocknen lassen
- 50 µL DES zugeben
- 1 Min. bei 13000 g zentrifugieren
- Filter verwerfen

7.2 Kalibriergeraden

7.2.1 *E. coli*-Markergen *yccT*

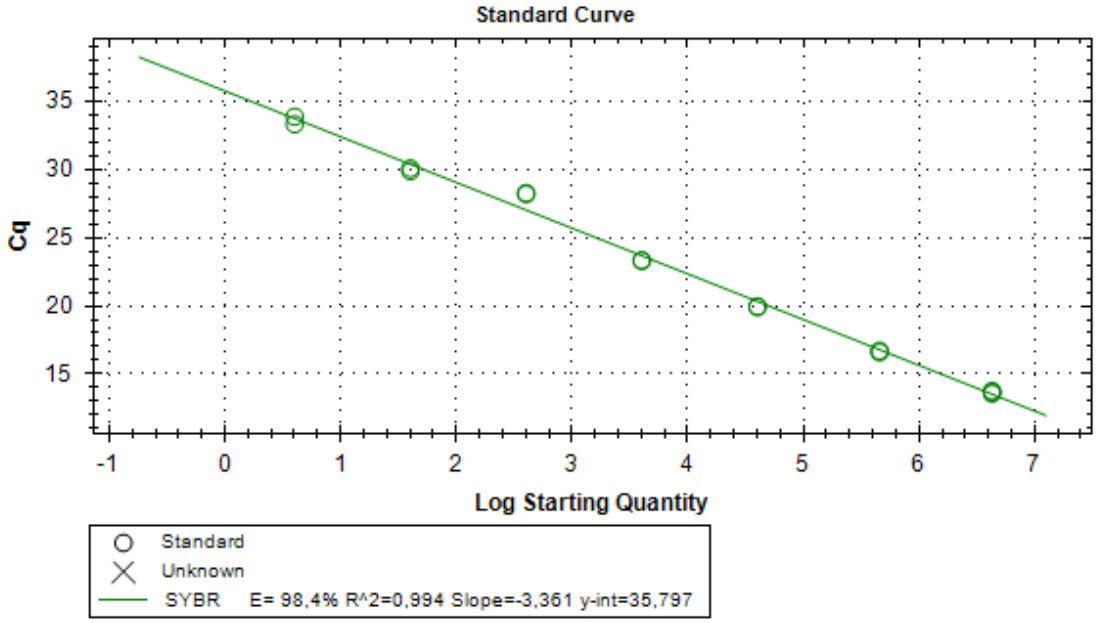

Abbildung 36: Kalibriergerade von ycct. Die Effizienz E=98,4 % spiegelt die Steigung S=-3,361 wider, während das Bestimmtheitsmaß R^2=0,994 beträgt. Der durchschnittliche Ct-Wert der 10-5-Verdünnung liegt mit 28,26 zu hoch um im linearen Bereich zu sein. Das Detektionslimit entspricht 4,01 Zelläquivalente.

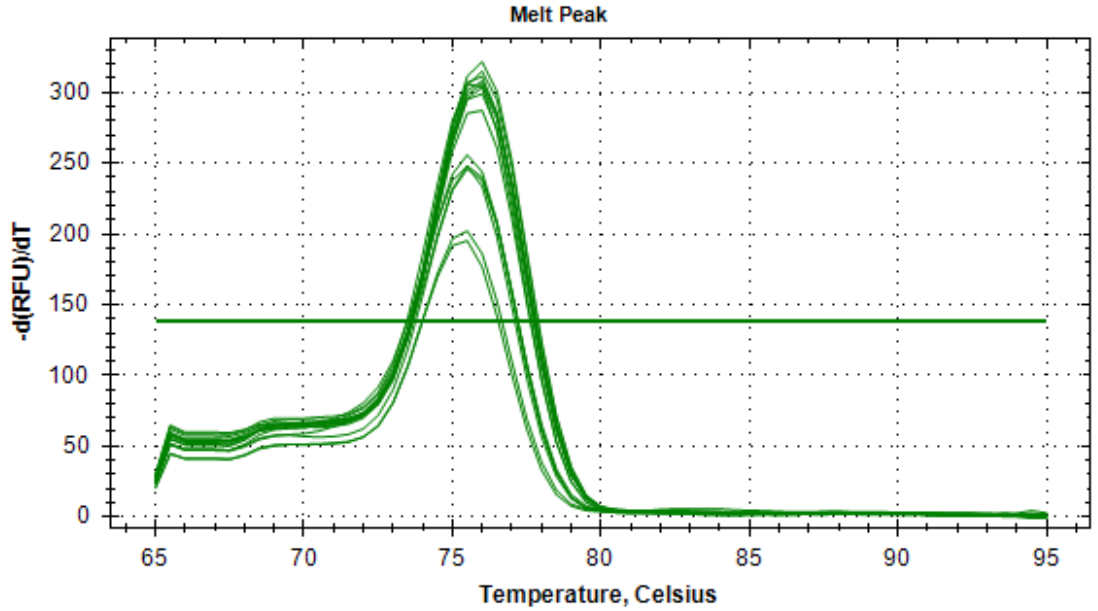

Abbildung 37: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *yccT*. Die Schmelzkurve zeigt eine größtenteils einheitliche Schmelztemperatur von 76 °C. Die Verdünnungen 10^{-5} bis 10^{-7} liegen mit 75,5 °C etwas tiefer und zeigen ein schwächeres Signal.

7.2.2 *P. aeruginosa*-Markergen ecfx

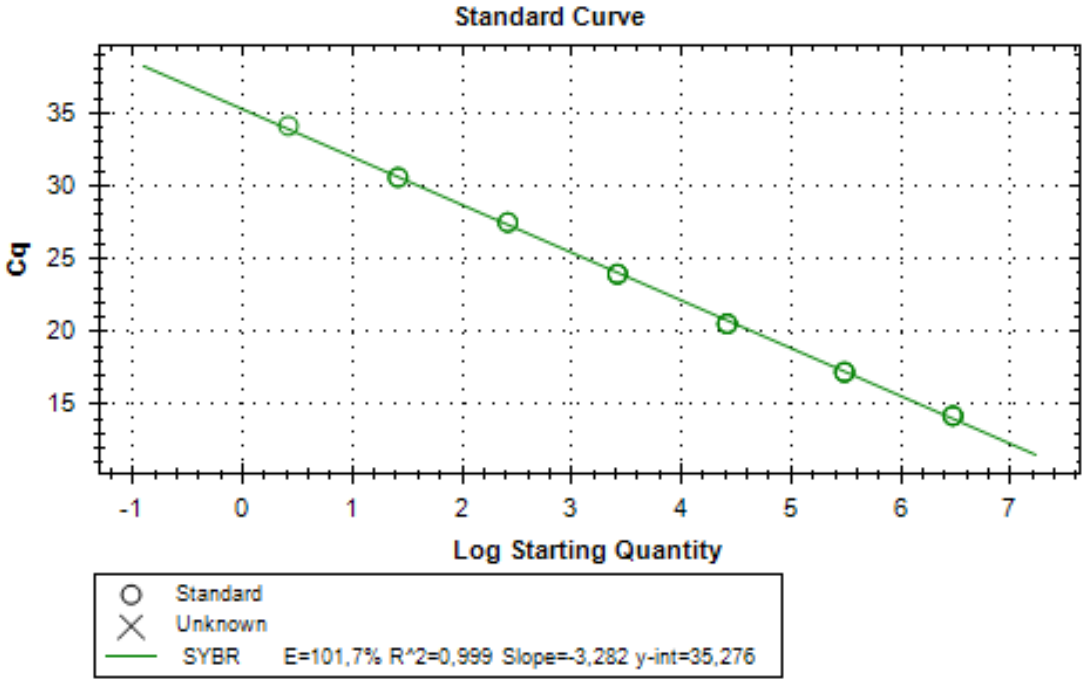

Abbildung 38: Kalibriergerade von *ecfx*. Mit einer Effizienz von E=101,7 % bei einer Steigung von S=-3,282 zeigt die Kalibriergerade sehr gute Eigenschaften. Alle Werte liegen im linearen Bereich, was am Bestimmtheitsmaß von R^2 =0,999 ersichtlich wird. Das Detektionslimit entspricht 2,61 Zelläquivalente.

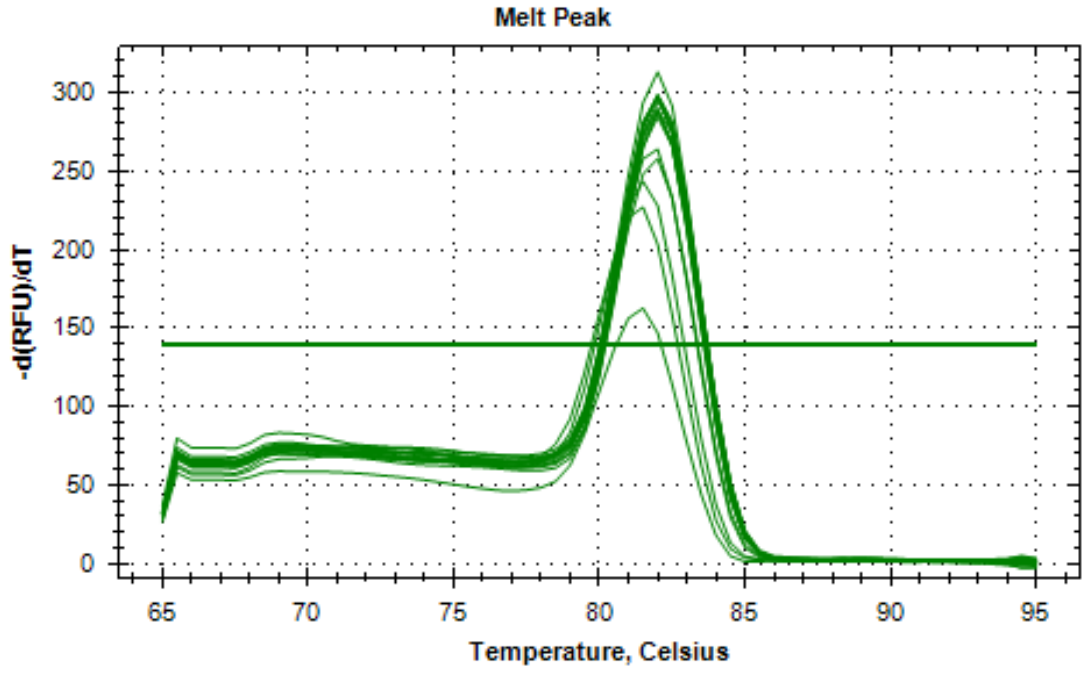

Abbildung 39: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *ecfx*. Die Schmelzkurve zeigt eine Schmelztemperatur von 82 °C. Die Schmelztemperaturen der 10^{-6} und 10^{-7}-Verdünnungen liegen mit 81,5 °C etwas tiefer und zeigen ein schwächeres Signal.

7.2.3 *K. pneumoniae*-Markergen gltA

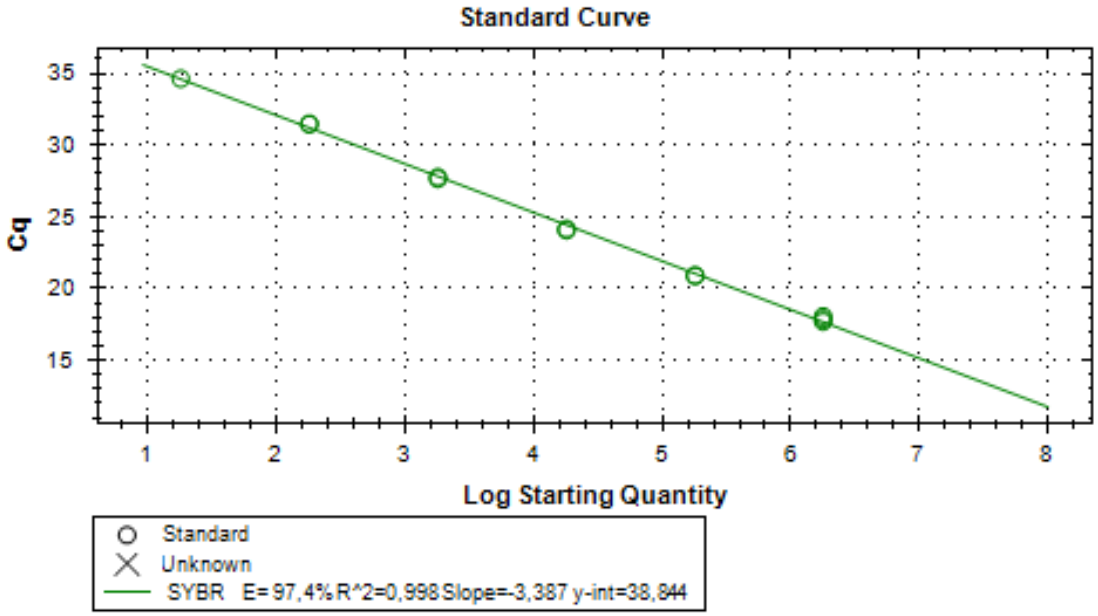

Abbildung 40: Kalibriergerade von *gltA*. Die Effizienz liegt bei E=97,4 % bei einer Steigung von S=-3,387. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R2=0,998). Das Detektionslimit entspricht 18 Zelläquivalente.

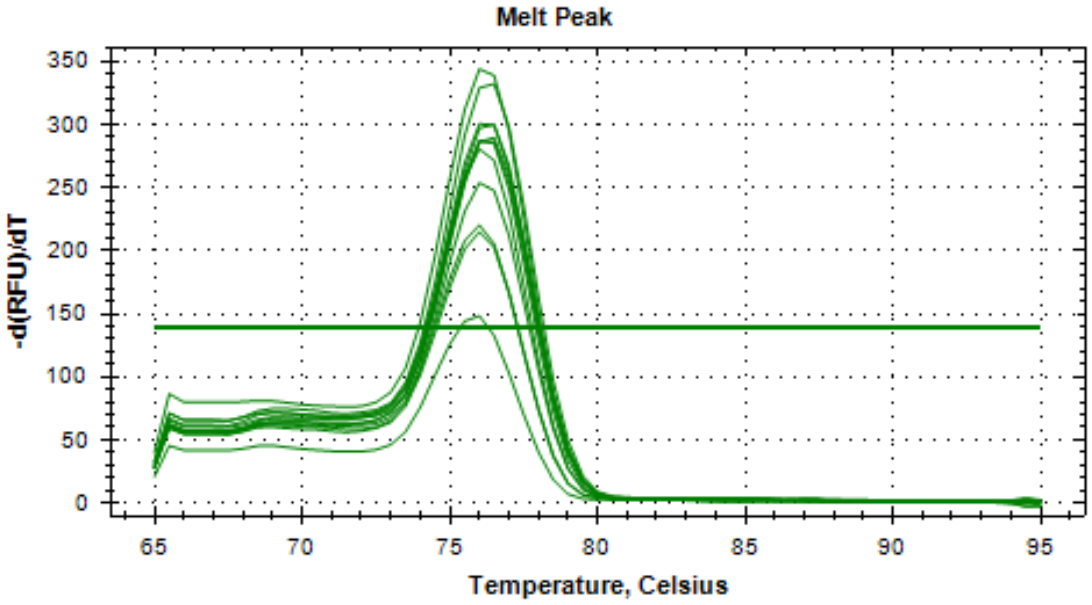

Abbildung 41: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *gltA*. Die Schmelzkurve zeigt Schmelztemperaturen zwischen 76 und 76,5 °C. Die Intensitäten des Signals nehmen mit höherer Verdünnung ab.

7.2.4 Cephalosporin-Resistenzgen- *bla*CTX-*M -32*

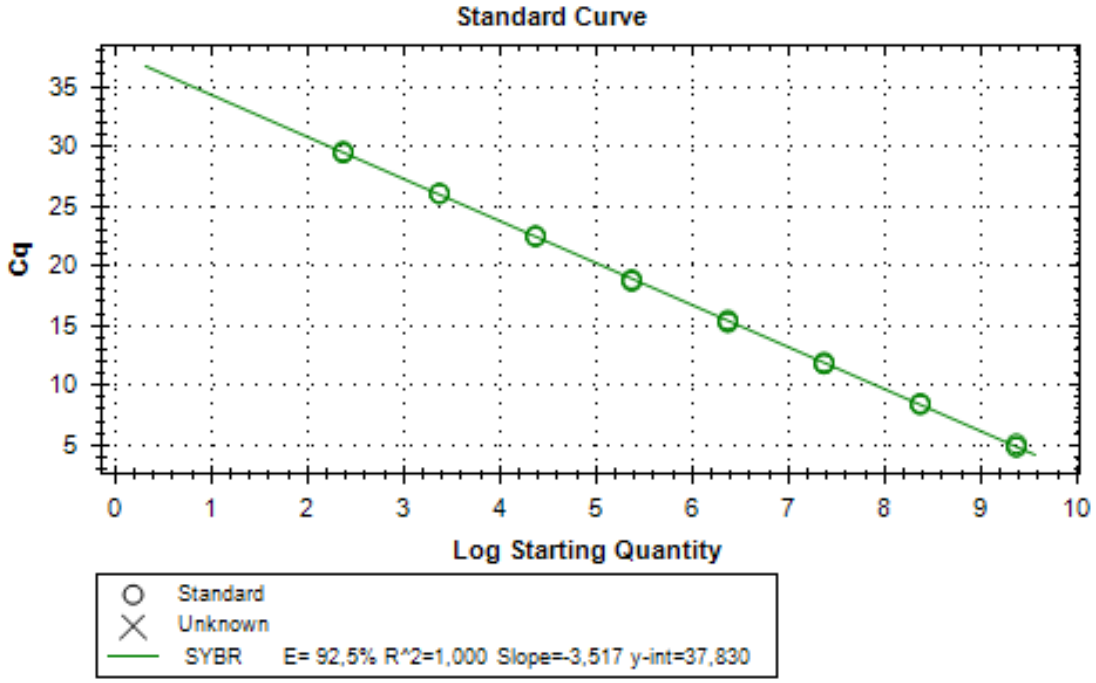

Abbildung 42: Kalibriergerade *von bla*CTX-*M -32*. Die Effizienz liegt bei E=92,5 % bei einer Steigung von S=-3,517. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R2=1). Das Detektionslimit entspricht 235 Genkopien.

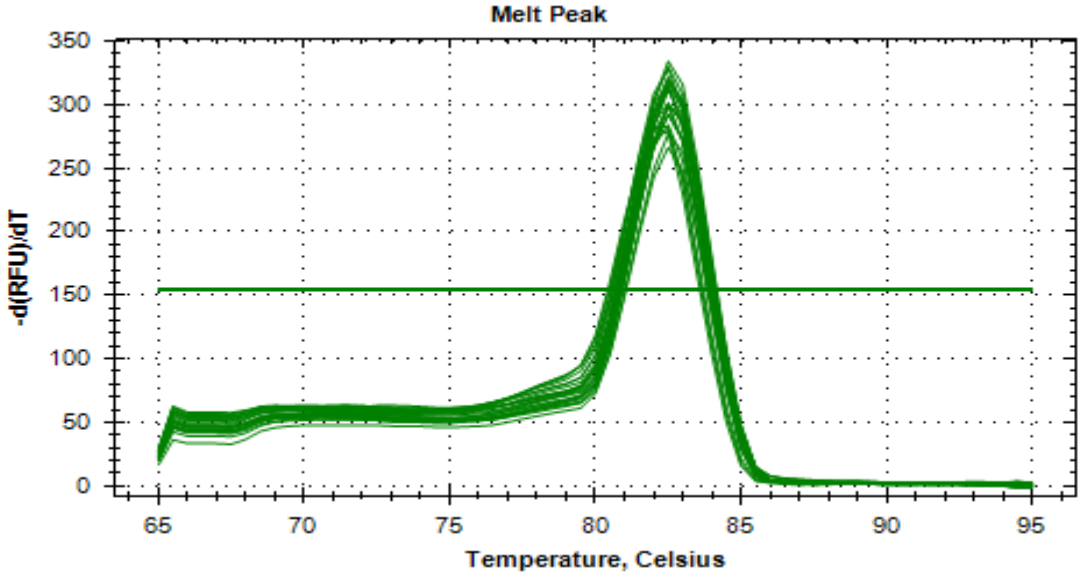

Abbildung 43: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *bla*CTX-*M -32*. Die Schmelzkurve zeigt sowohl einheitliche Schmelztemperaturen von 82,5 °C als auch einheitliche Intensitäten.

7.2.5 Integron Typ 1 Integrase-*int1*

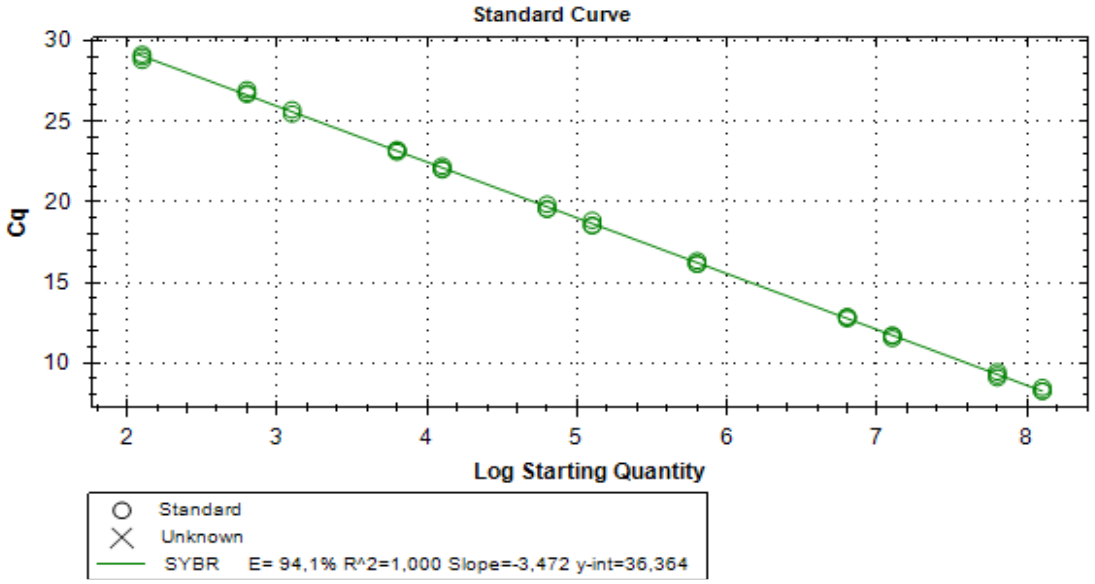

Abbildung 44: Kalibriergerade von *int1*. Die Effizienz liegt bei E=94,1 % bei einer Steigung von S=-3,472. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R2=1). Das Detektionslimit entspricht 126 Genkopien. In dieser Verdünnungsreihe wurden Zwischenschritte (1: 5x10x) zwischen die 1: 10 Schritte eingefügt.

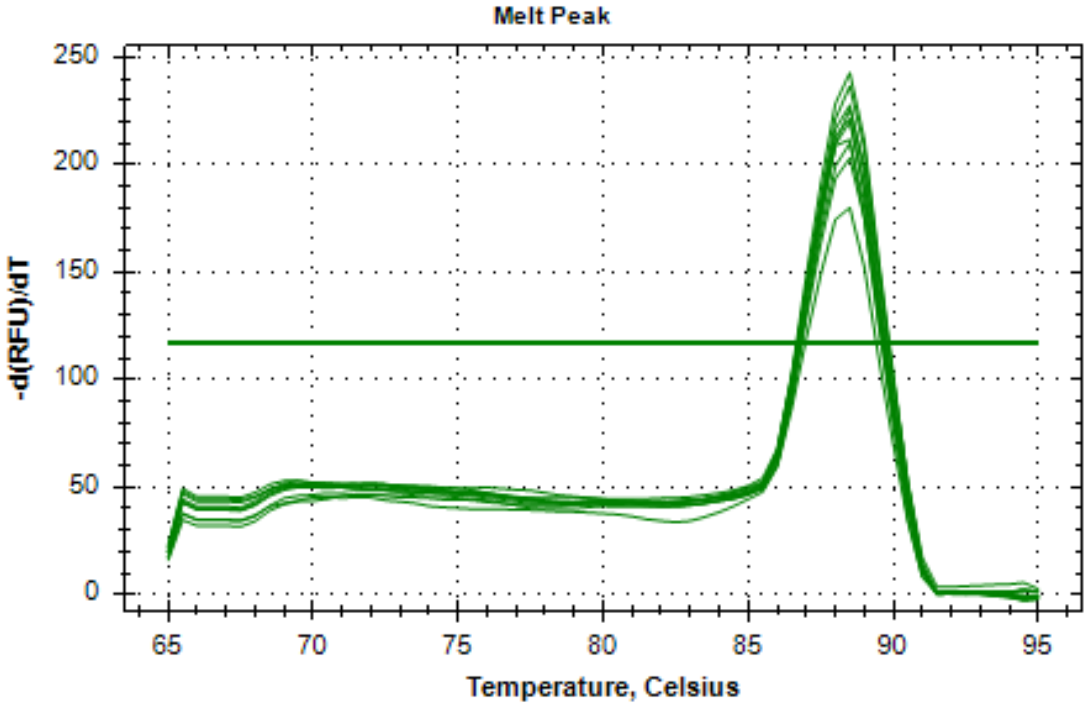

Abbildung 45: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *int1* Die Schmelzkurve zeigt sowohl einheitliche Schmelztemperaturen von 88,5 °C als auch einheitliche Intensitäten.

7.2.6 *A. Baumannii*-Markergen-*secE*

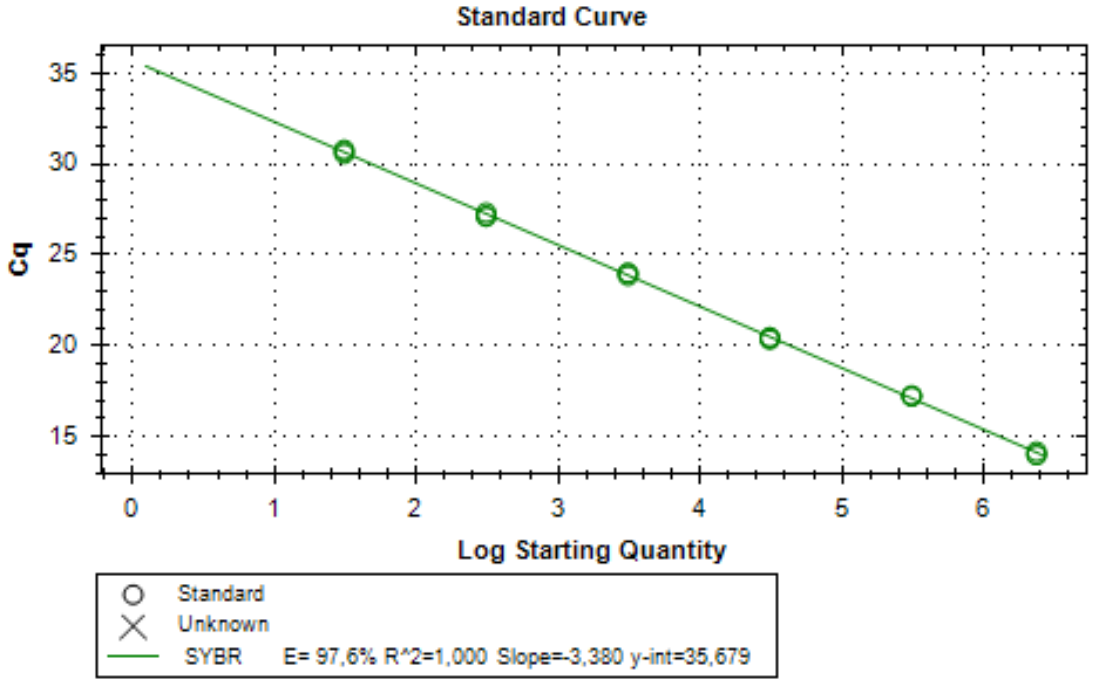

Abbildung 46: Kalibriergerade von *secE*. Die Effizienz liegt bei E=97,6 % bei einer Steigung von S=-3,380. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=1). Das Detektionslimit entspricht 31 Zelläquivalente.

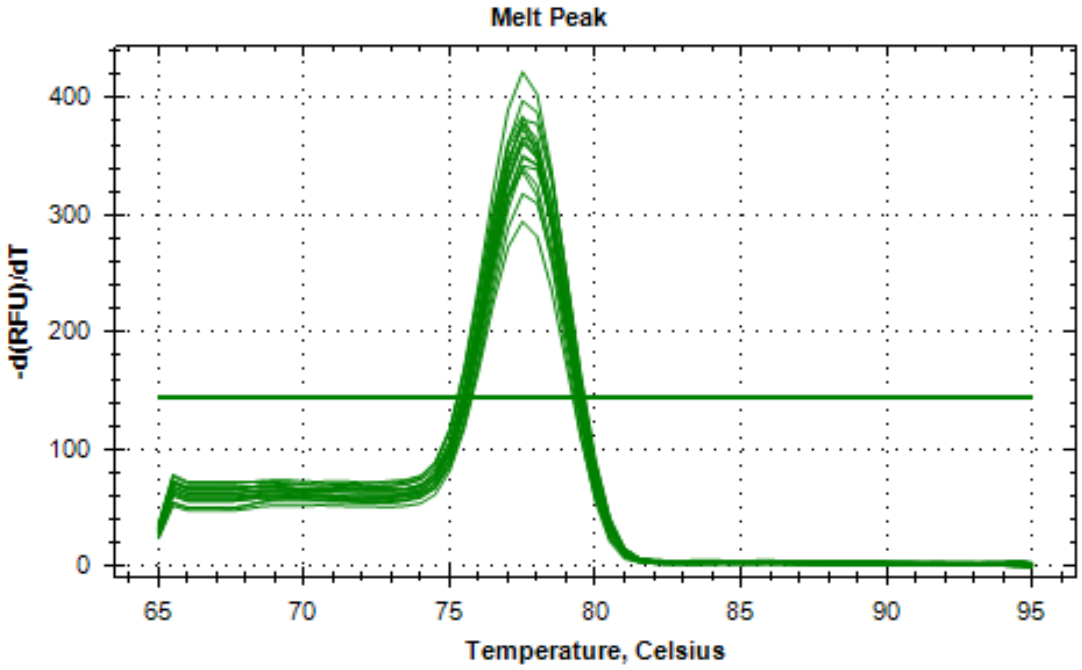

Abbildung 47: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *secE*. Die Schmelzkurve zeigt Schmelztemperaturen von 77,5 °C. Die Intensitäten des Signals nehmen mit höherer Verdünnung ab.

7.2.7 New-Deli-β-Lactamase Gen-*bla*NDM

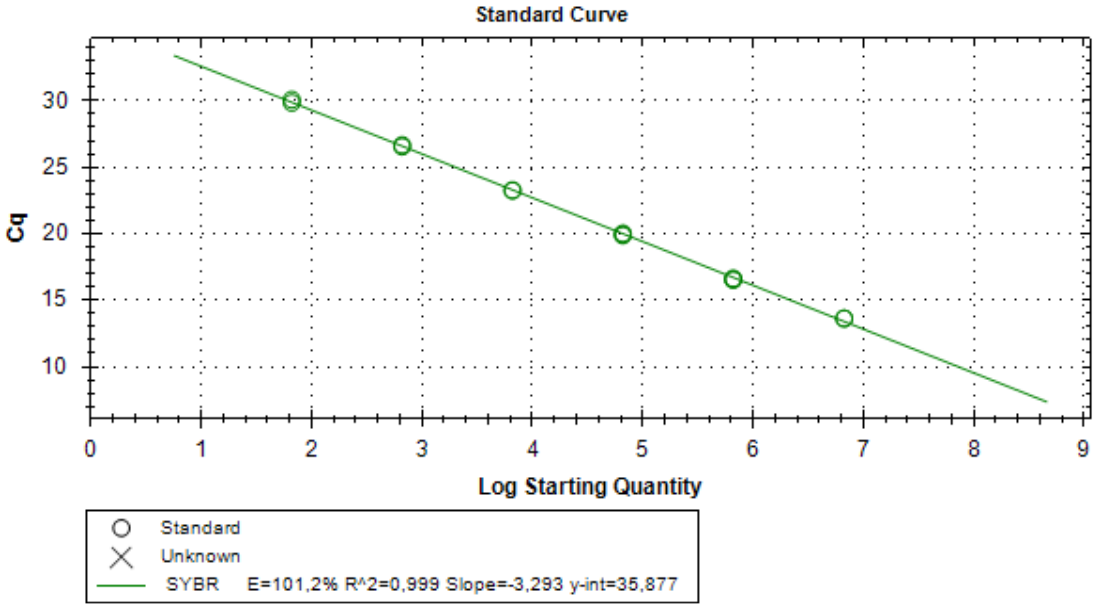

Abbildung 48: Kalibriergerade von *bla*NDM. Die Effizienz liegt bei E=101,2 % bei einer Steigung von S=-3,293. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=0,999). Das Detektionslimit entspricht 66,1 Zelläquivalente.

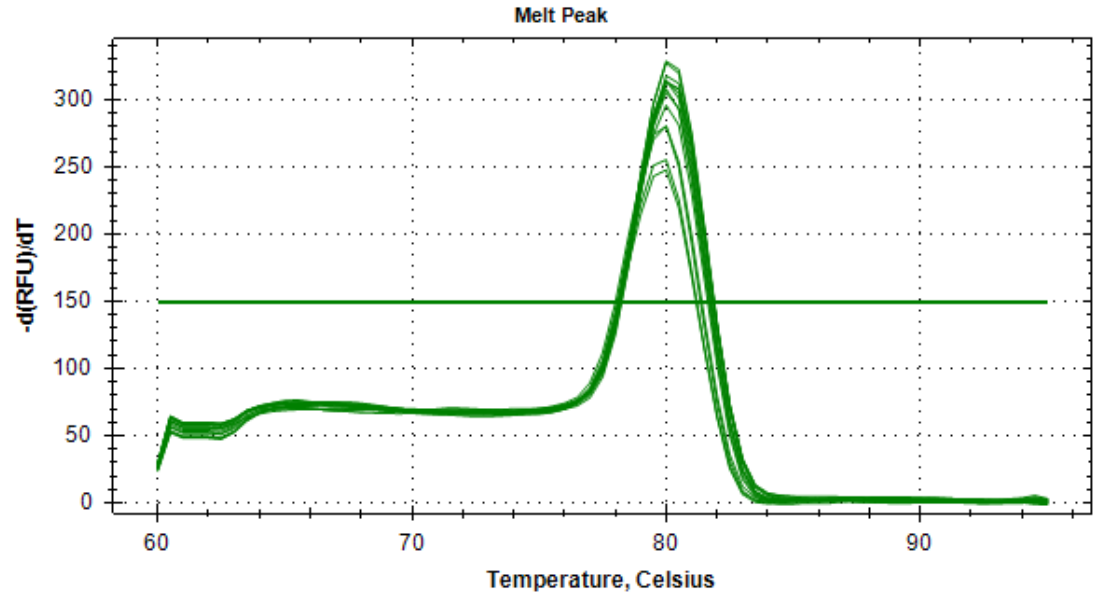

Abbildung 49: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *bla*NDM. Die Schmelzkurve zeigt Schmelztemperaturen von 80 °C. Die Intensitäten des Signals nehmen mit höherer Verdünnung ab.

7.2.8 Serin-β-Lactamase Gen *bla*Oxa-48

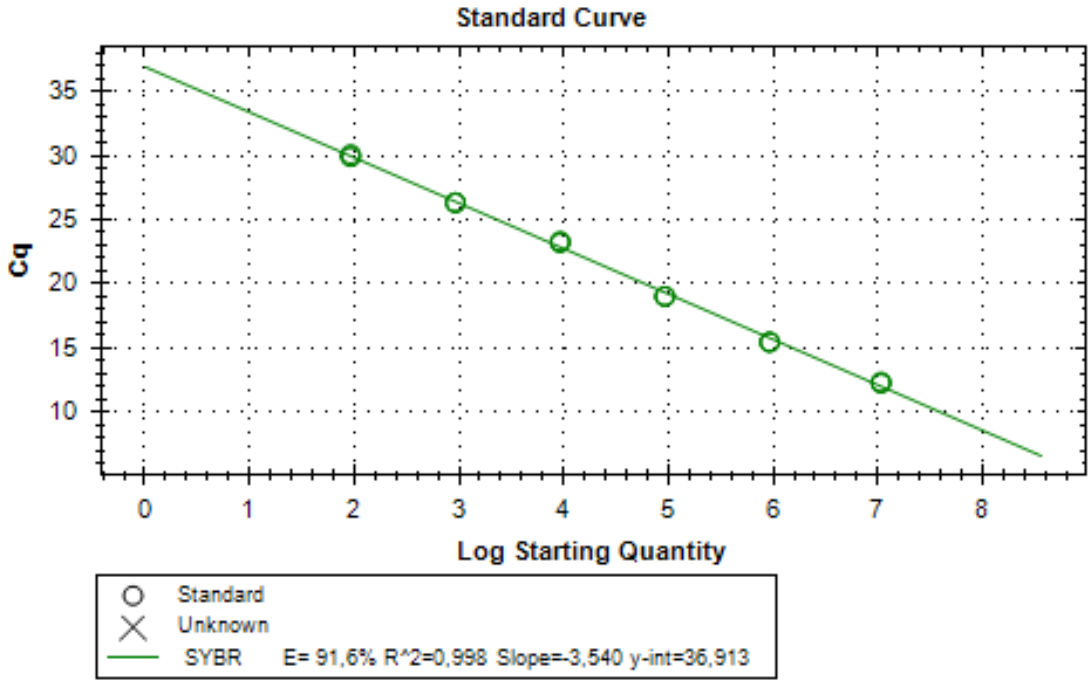

Abbildung 50: Kalibriergerade von *bla*Oxa-48. Die Effizienz liegt bei E=91,6 % bei einer Steigung von S=-3,54. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=0,998). Das Detektionslimit entspricht 92,3 Zelläquivalente.

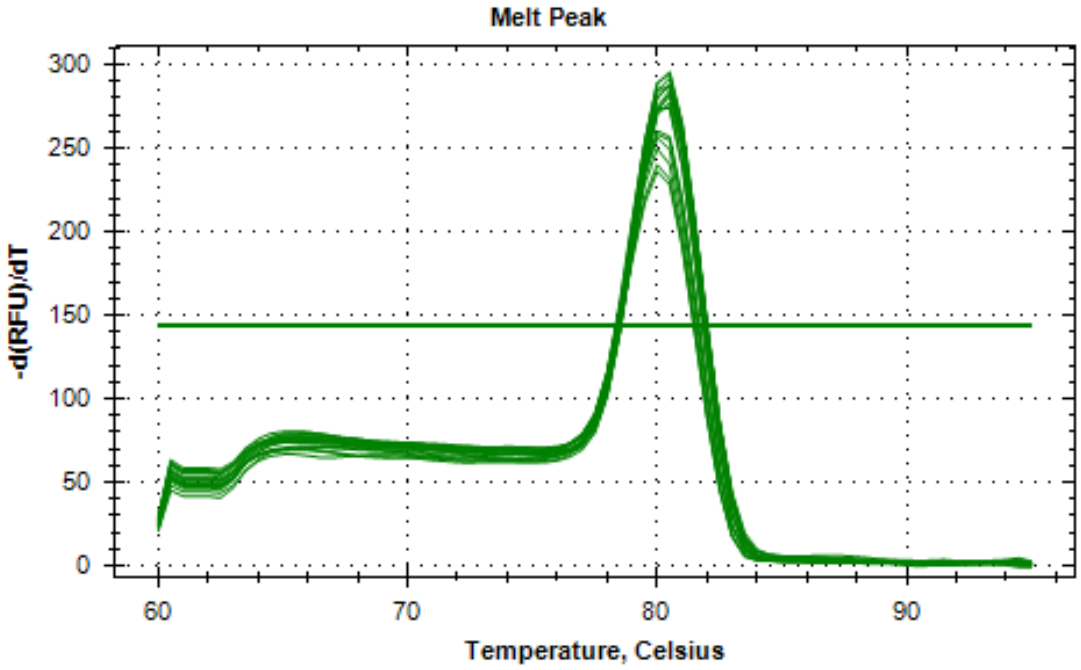

Abbildung 51: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *bla*Oxa-48. Die Schmelzkurve zeigt Schmelztemperaturen zwischen 80 und 80,5 °C. Die Intensitäten des Signals nehmen mit höherer Verdünnung ab.

7.2.9 Imipenem-Resistenzgen *bla*VIM

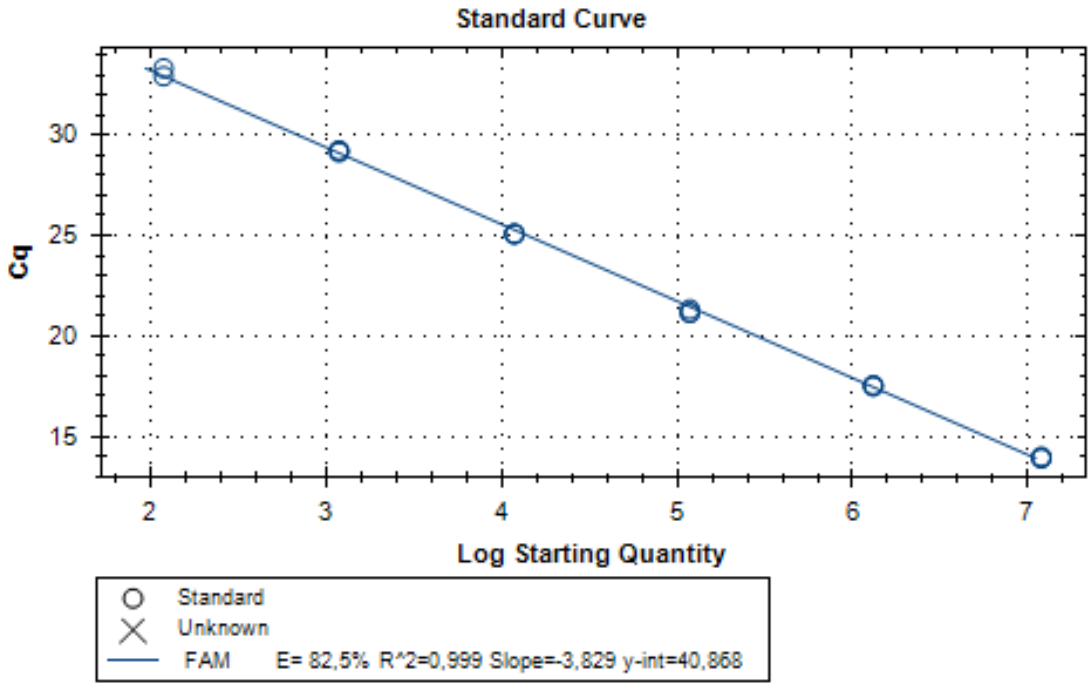

Abbildung 52: Kalibriergerade von *bla*VIM. Die Effizienz liegt bei E=82,5 % bei einer Steigung von S=-3,829. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=0,999). Das Detektionslimit entspricht 118 Zelläquivalente. Die Effizienz liegt deutlich unter den geforderten 90 %. Laut van der Zee et al. (2014) ist eine gute Qualität des Nachweises dennoch gewährleistet (van der Zee et al. 2014).

Aufgrund der Verwendung eines Taqman-Systems konnte für das *bla*VIM Detektiosnsystem keine Schmelzkurve erstellt werden.

7.2.10 Cephalosporin-Resistenzgen *blaCMY-2*

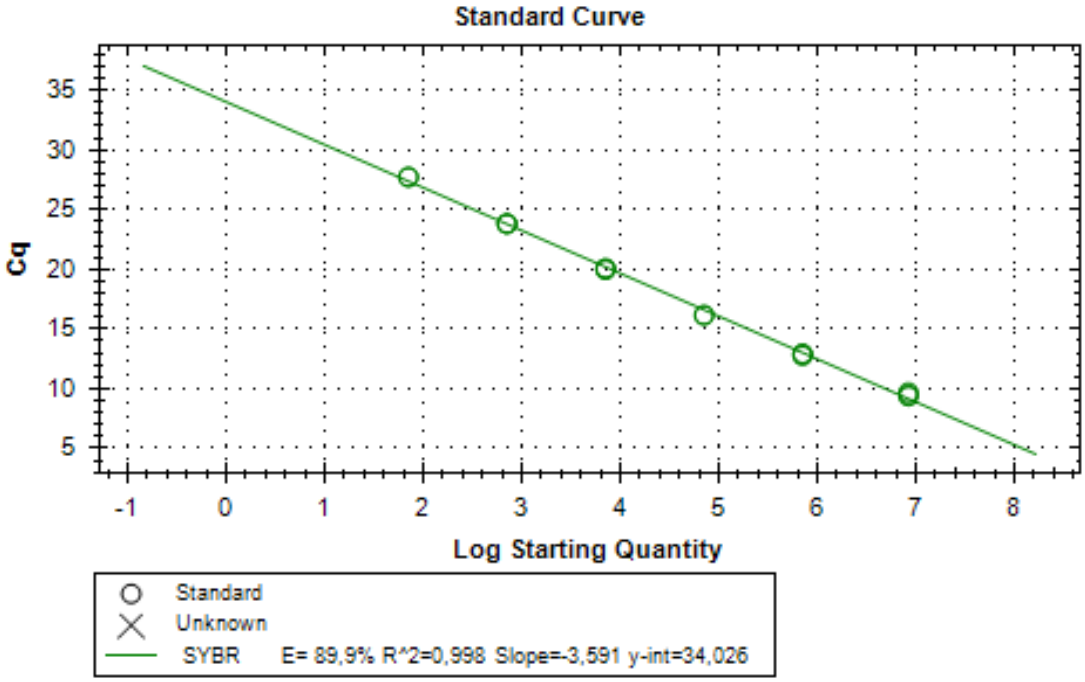

Abbildung 53: Kalibriergerade von *bla*CMY-2. Die Effizienz liegt bei E=89,9 % bei einer Steigung von S=-3,591. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=0,998). Das Detektionslimit entspricht 70,6 Zelläquivalente.

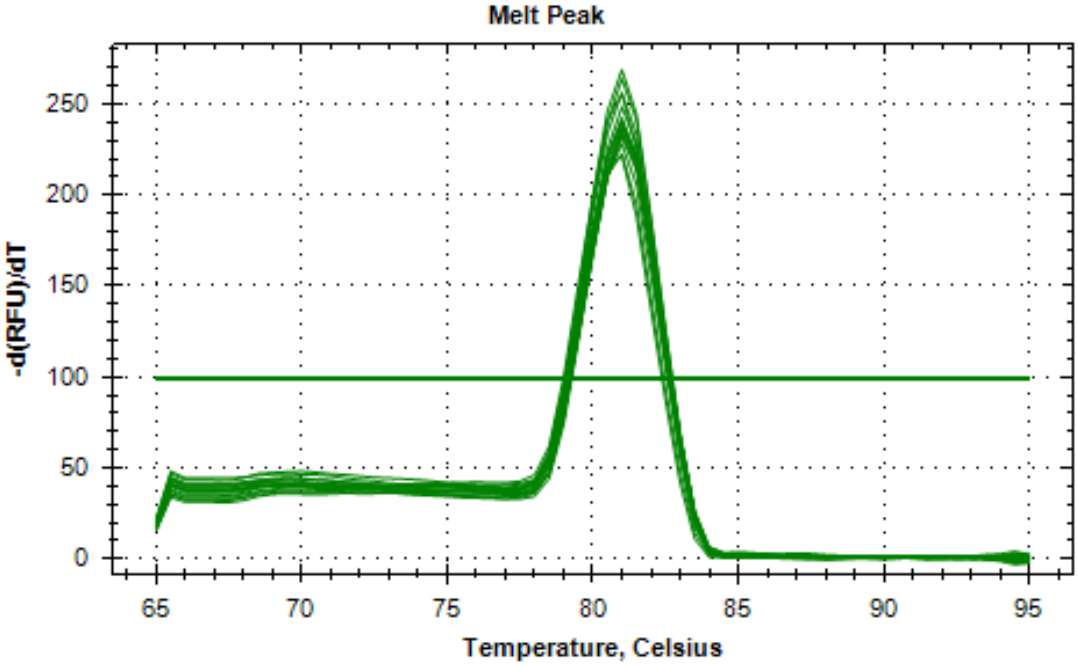

Abbildung 54: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *cmy-2*. Die Schmelzkurve zeigt sowohl einheitliche Schmelztemperaturen von 81 °C als auch einheitliche Intensitäten.

7.2.11 Vancomycin-Resistenzgen *van*A

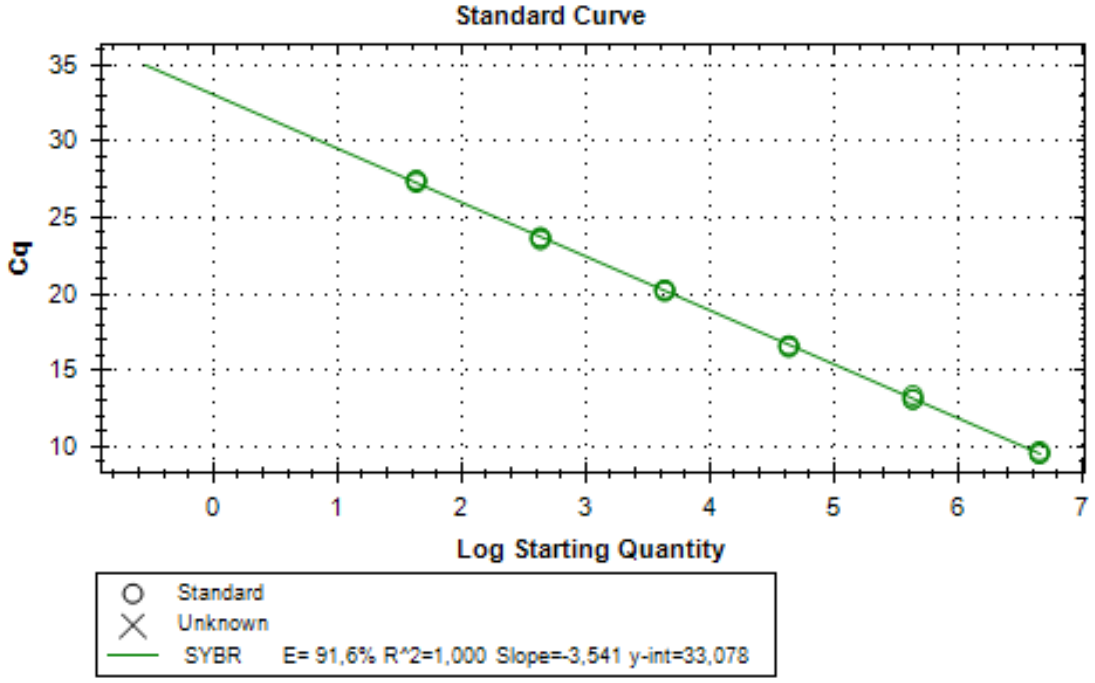

Abbildung 55Kalibriergerade von *van*A. Die Effizienz liegt bei E=91,6 % bei einer Steigung von S=-3,541. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=1). Das Detektionslimit entspricht 43,1 Zelläquivalente.

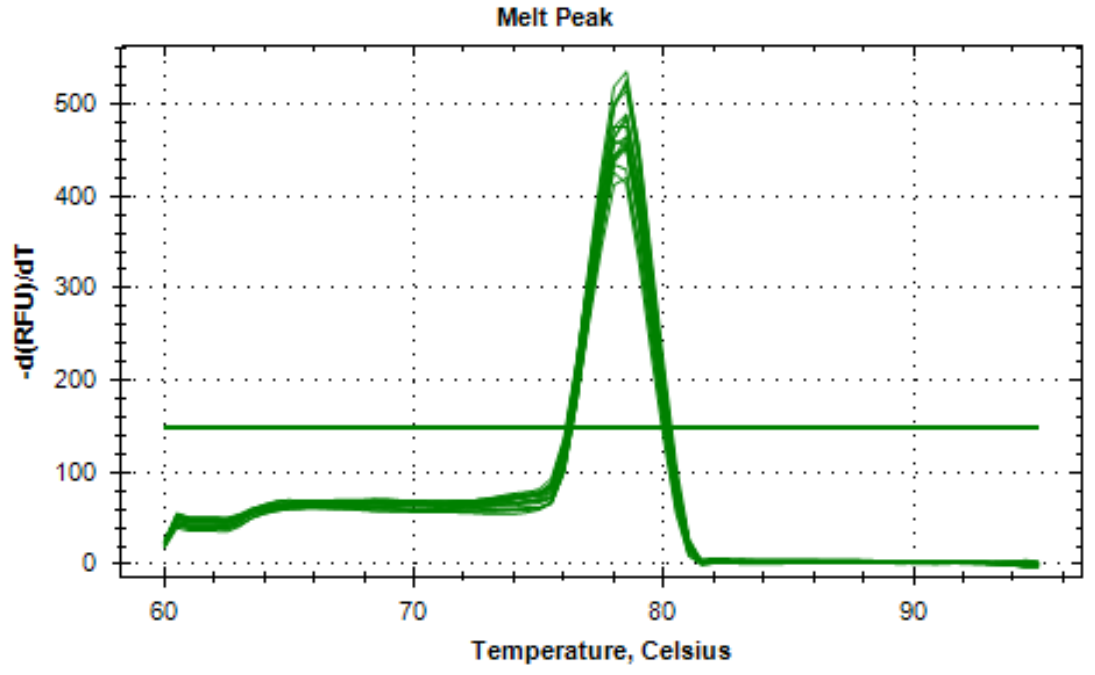

Abbildung 56: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *vanA*. Die Schmelzkurve zeigt Schmelztemperaturen zwischen 78 und 78,5 °C bei geringfügig verschiedenen Intensitäten.

7.2.12 Sulfonamid-Resistenzgen *sul*1

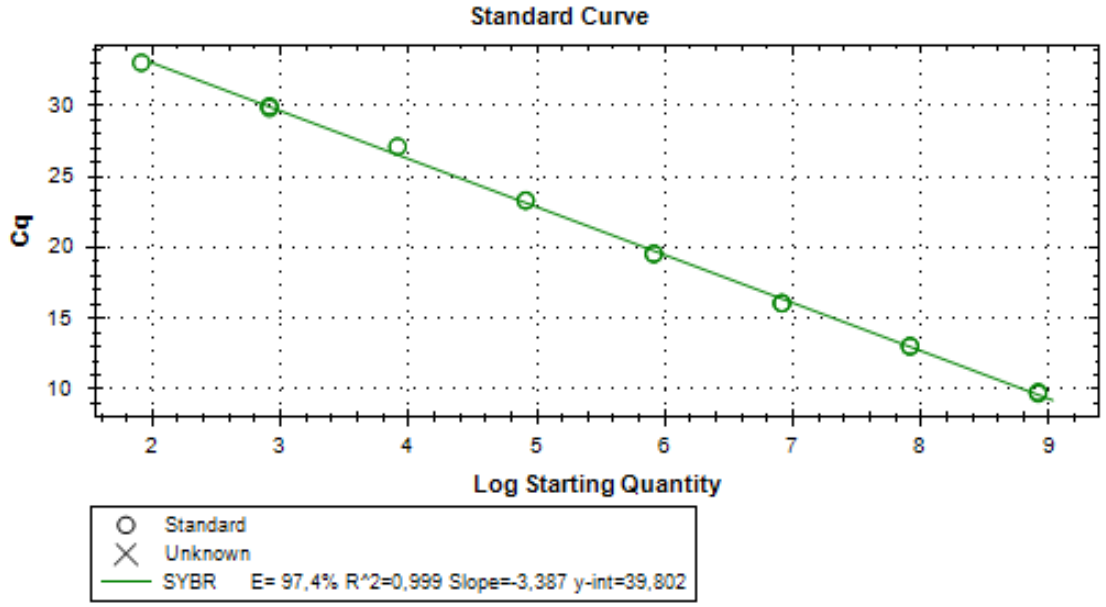

Abbildung 57: Kalibriergerade von *sul1*. Die Effizienz liegt bei E=97,6 % bei einer Steigung von S=-3,387. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=0,999). Das Detektionslimit entspricht 80,18 Genkopien.

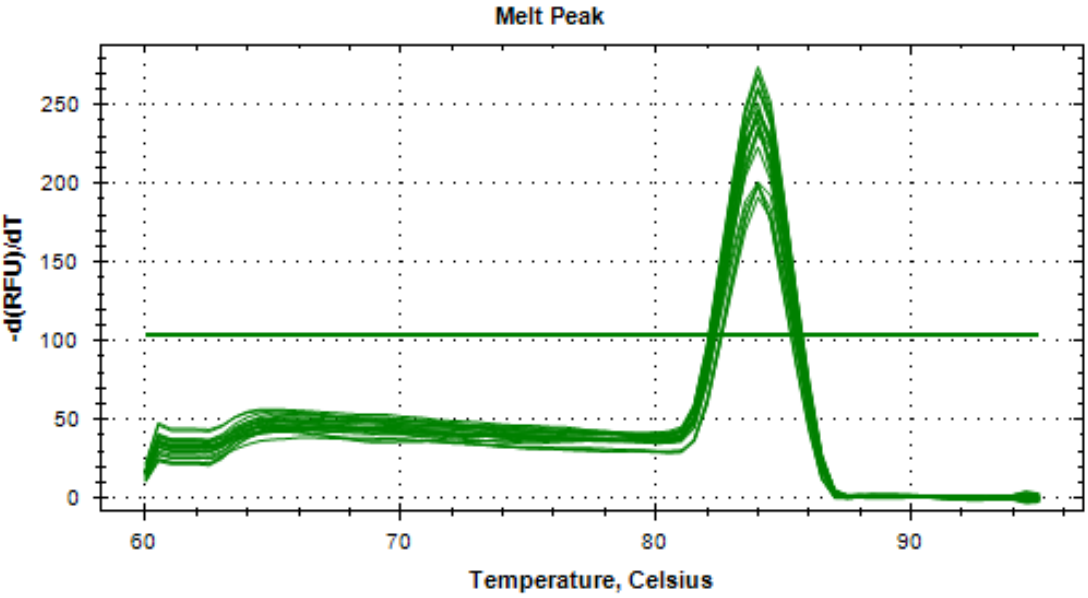

Abbildung 58: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *sul1*. Die Schmelzkurve zeigt einheitliche Schmelztemperaturen von 84 °C. Die Intensität des Signals variiert leicht.

7.2.13 Ampicillin-Resistenzgen *bla*TEM

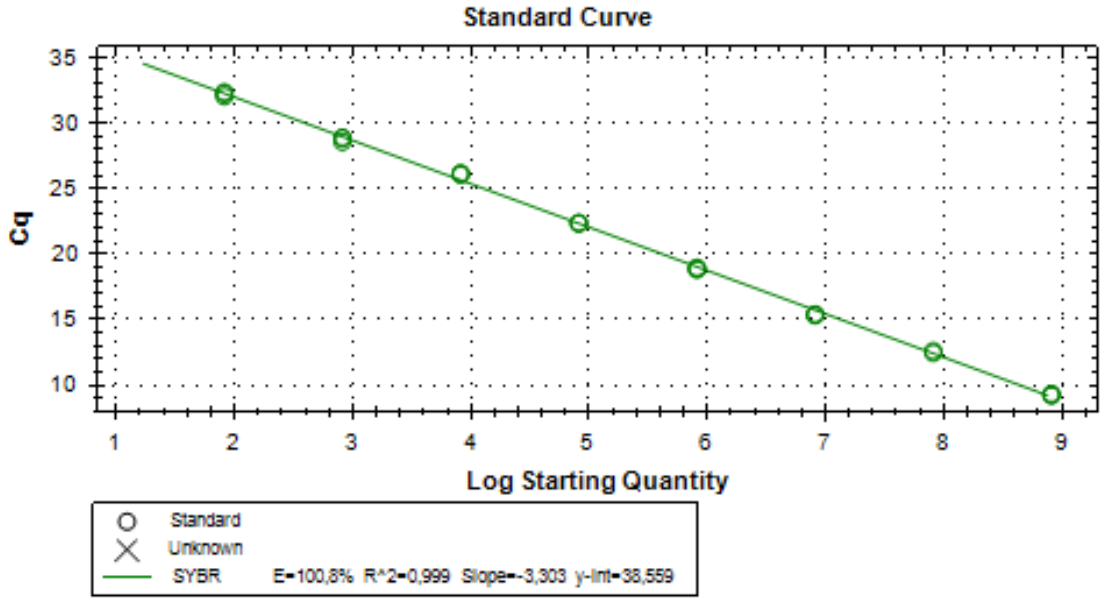

Abbildung 59: Kalibriergerade von *bla*TEM. Die Effizienz liegt bei E=100,8 % bei einer Steigung von S=-3,303. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=0,999). Das Detektionslimit entspricht 80,1 Genkopien.

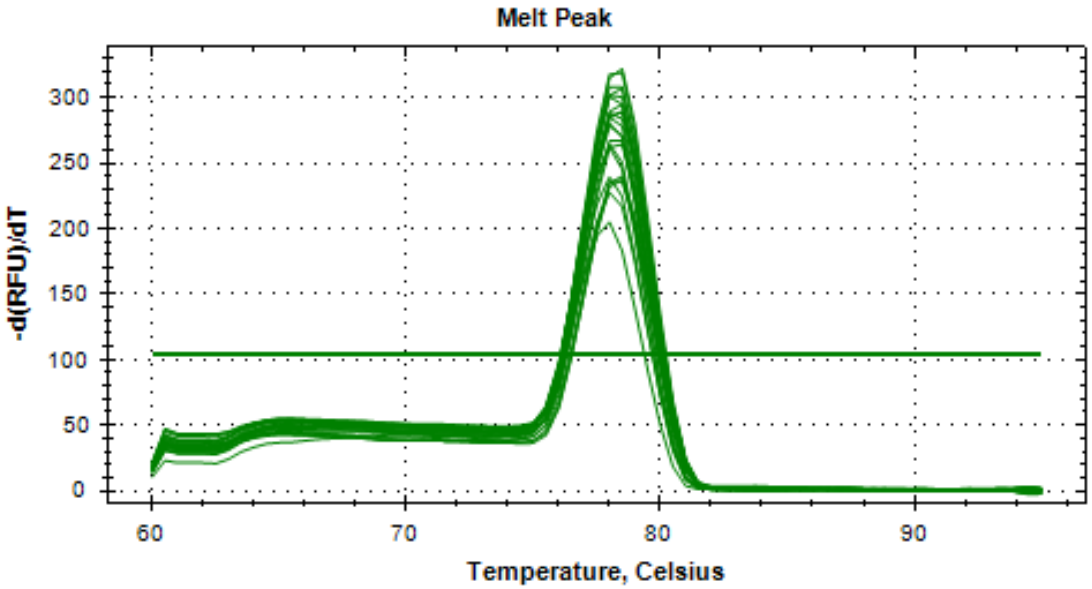

Abbildung 60: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *bla*TEM. Die Schmelzkurve zeigt Schmelztemperaturen zwischen 78 und 78,5 °C. Die Intensität des Signals variiert leicht.

7.2.14 Cephalosporin-Resistenzgen *bla*CTX-M

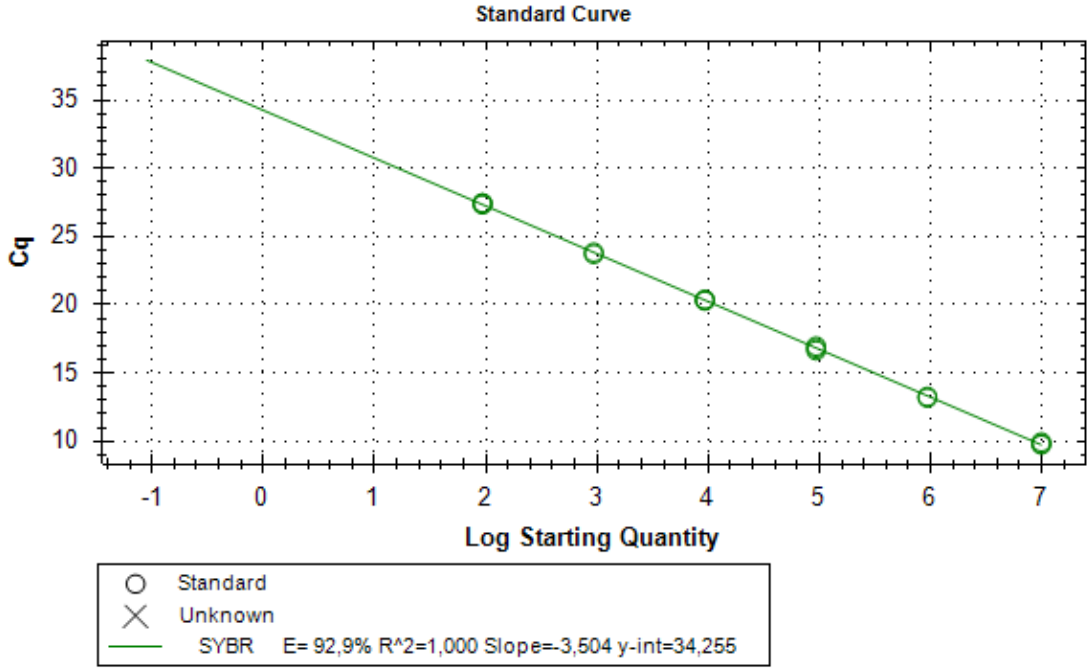

Abbildung 61: Kalibriergerade von *bla*CTX-M. Die Effizienz liegt bei E=92,9 % bei einer Steigung von S=-3,504. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=1). Das Detektionslimit entspricht 93,1 Genkopien.

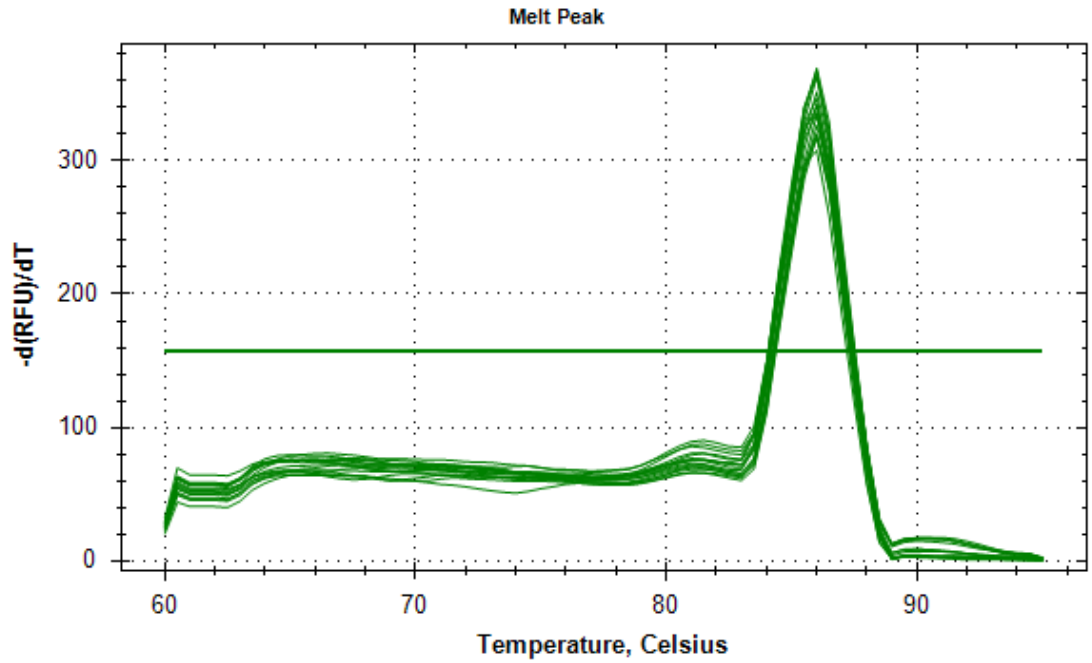

Abbildung 62: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *bla*CTX -M. Die Schmelzkurve zeigt sowohl einheitliche Schmelztemperaturen von 86 °C als auch einheitliche Intensitäten.

7.2.15 Tetracyclin-Resistenzgen *tet*M

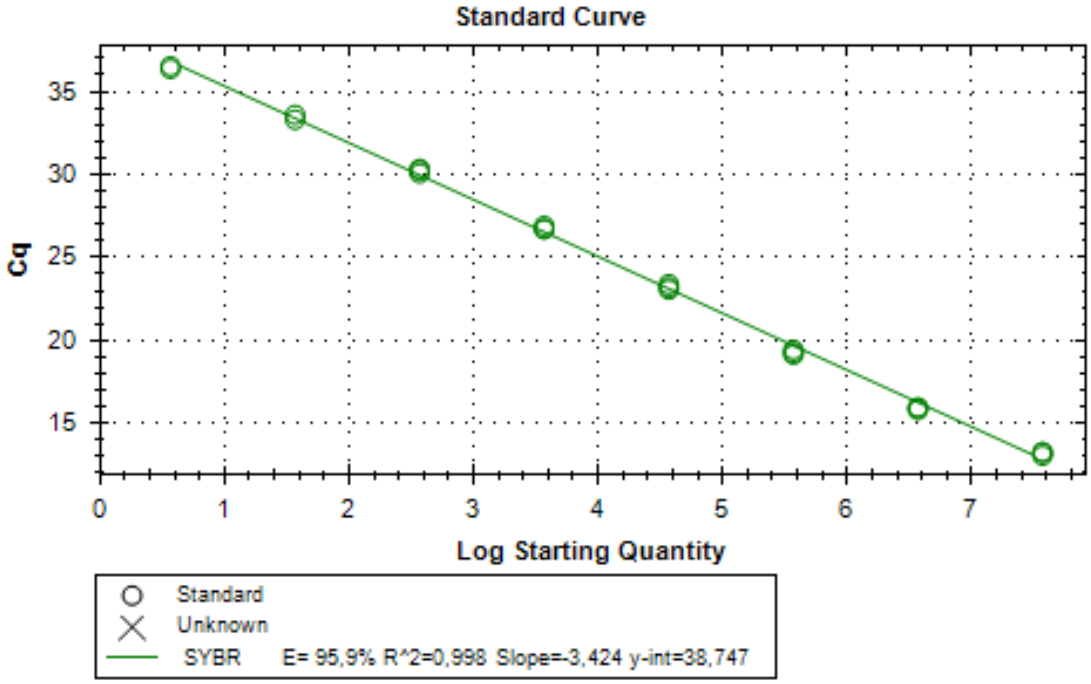

Abbildung 63: Kalibriergerade von *tetM*. Die Effizienz liegt bei E=95,9 % bei einer Steigung von S=-3,424. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=0,998). Das Detektionslimit entspricht 3,69 Genkopien. Der Stamm wurde mit Ampicillin (100 µg/mL) im Medium kultiviert. Anschließend wurde die plasmidäre DNA extrahiert und eine Verdünnungsreihe von 10 log-Stufen erstellt.

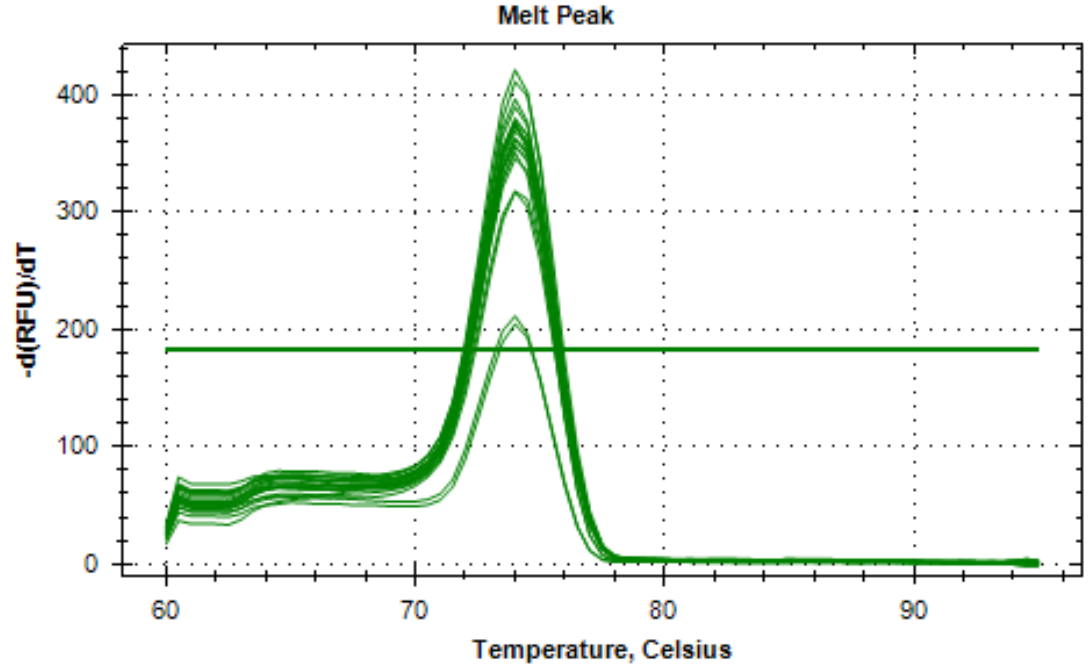

Abbildung 64: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *tetM*. Die Schmelzkurve zeigt einheitliche Schmelztemperaturen von 74 °C. Die Schmelzkurve zeigt bei sehr hohen und sehr niedrigen Konzentrationen eine geringere Intensität.

7.2.16 Enterokokken-Markergen 23SrRNA

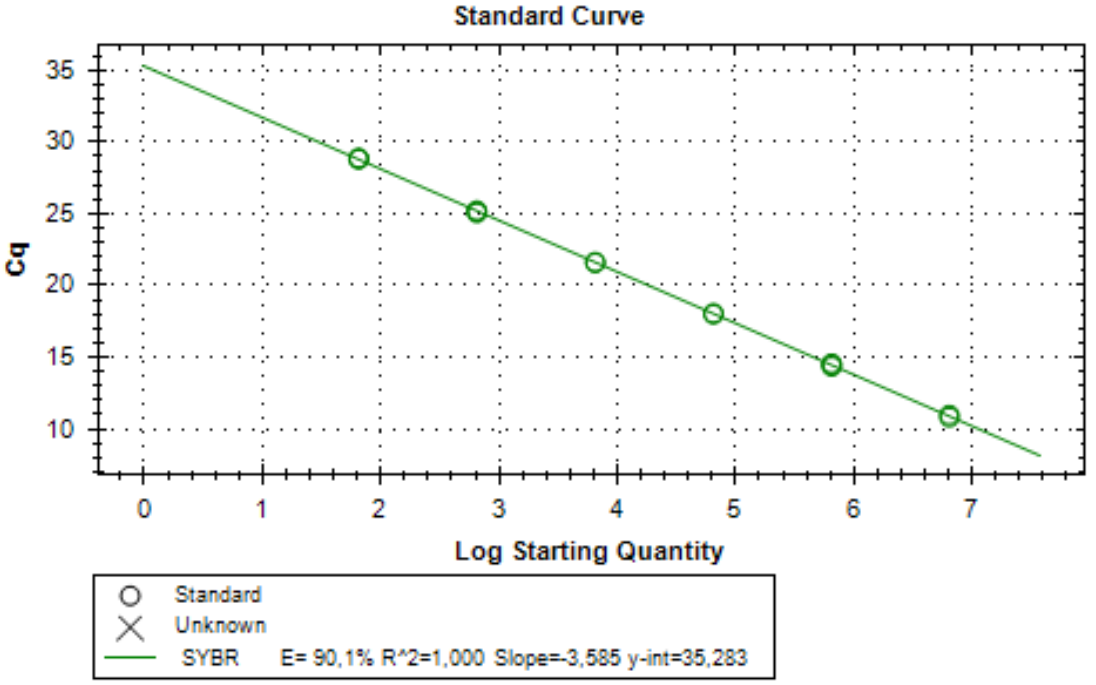

Abbildung 65: Kalibriergerade von Enterokokken-*23SrRNA*. Die Effizienz liegt bei E=90,1 % bei einer Steigung von S=-3,585. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=1). Das Detektionslimit entspricht 64,8 Zelläquivalente.

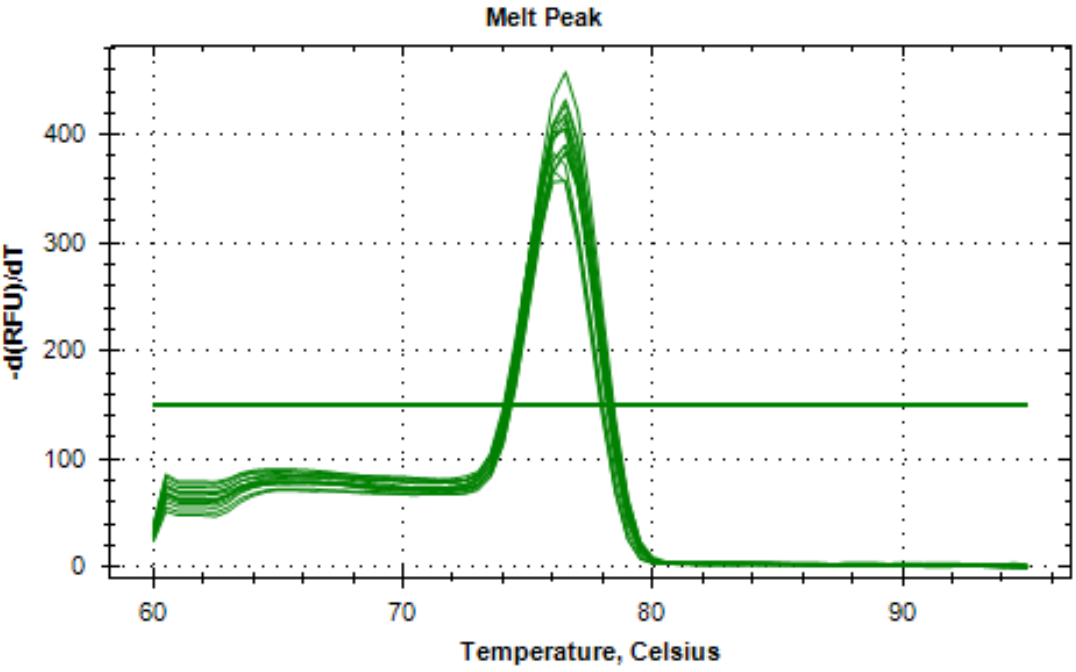

Abbildung 66: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *23SrRNA*. Die Schmelzkurve zeigt Schmelztemperaturen von 76 – 76,5 °C. Die Intensität des Signals variiert leicht.

7.2.17 Methicillin-Resistenzgen *mec*A

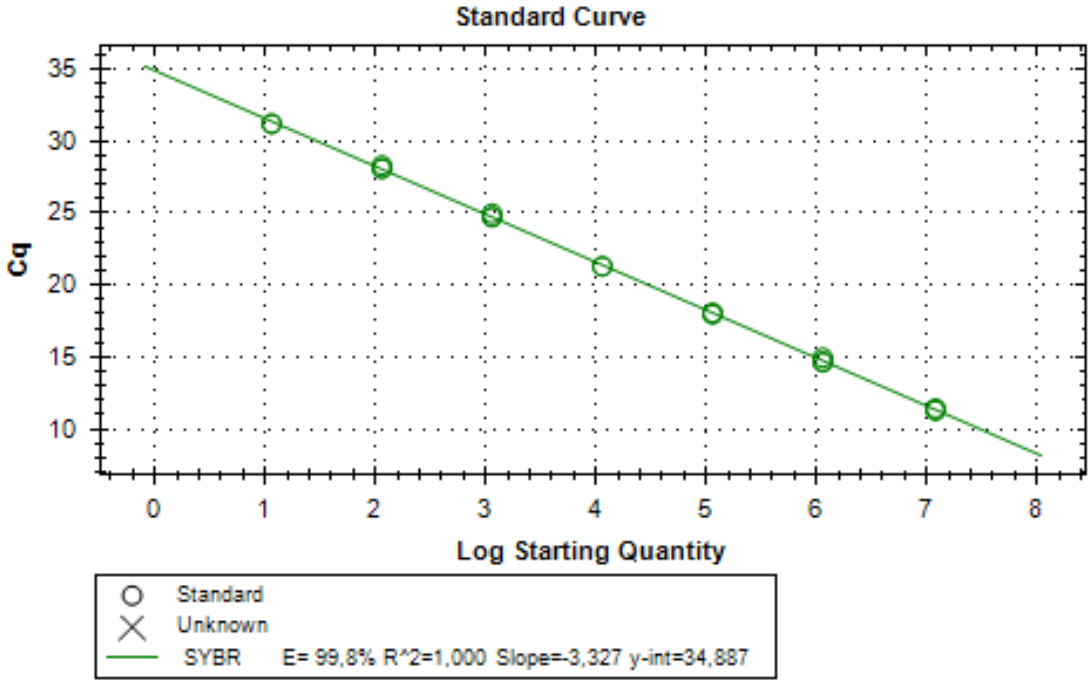

Abbildung 67: Kalibriergerade von *mec*A. Die Effizienz liegt bei E=99,8 % bei einer Steigung von S=-3,327. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=1). Das Detektionslimit entspricht 11,4 Zelläquivalente.

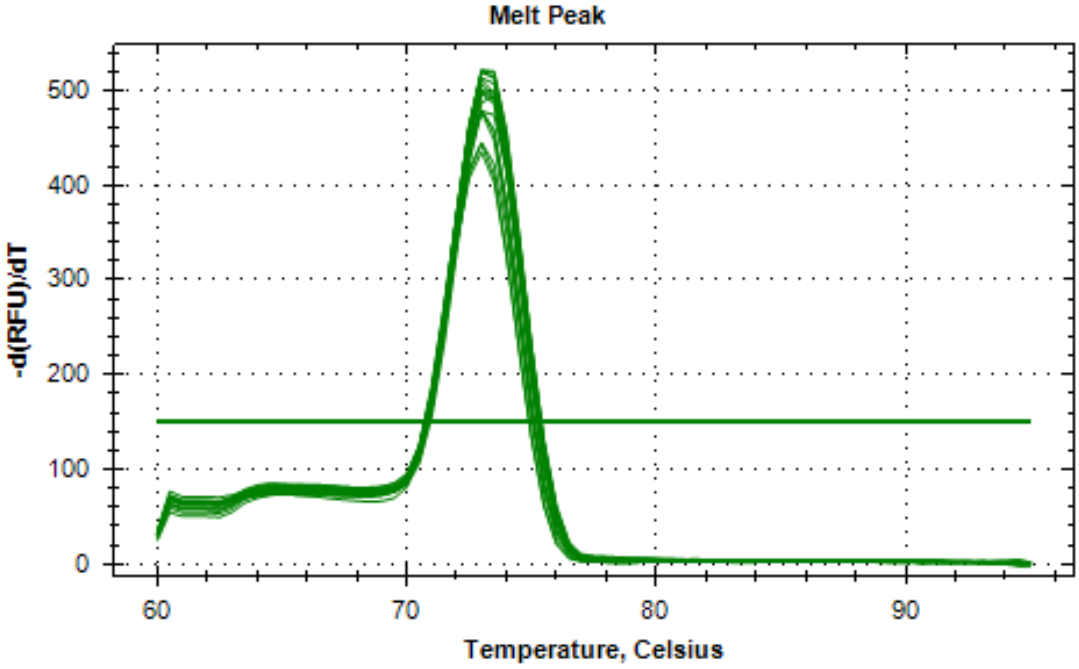

Abbildung 68: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *mec*A. Die Schmelzkurve zeigt Schmelztemperaturen von 73 – 73,5 °C. Die Intensität des Signals nimmt mit höherer Verdünnung ab.

7.2.18 Erythromycin-Resistenzgen *ermB*

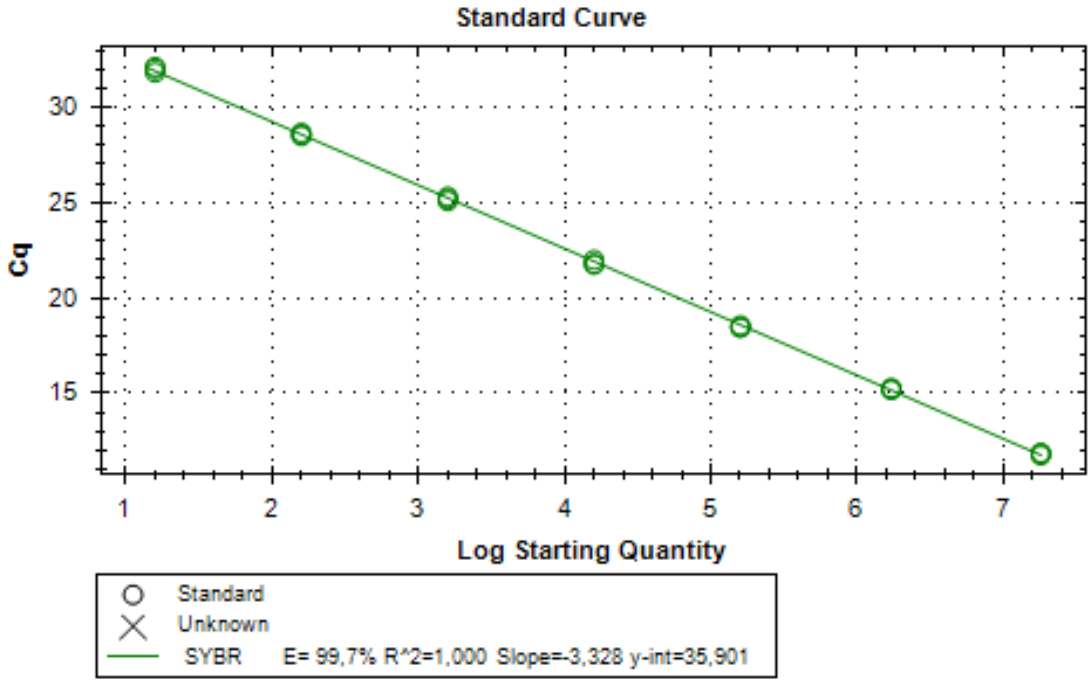

Abbildung 69: Kalibriergerade von *ermB*. Die Effizienz liegt bei E =99,7 % bei einer Steigung von S=-3,328. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=1). Das Detektionslimit entspricht 16 Zelläquivalente.

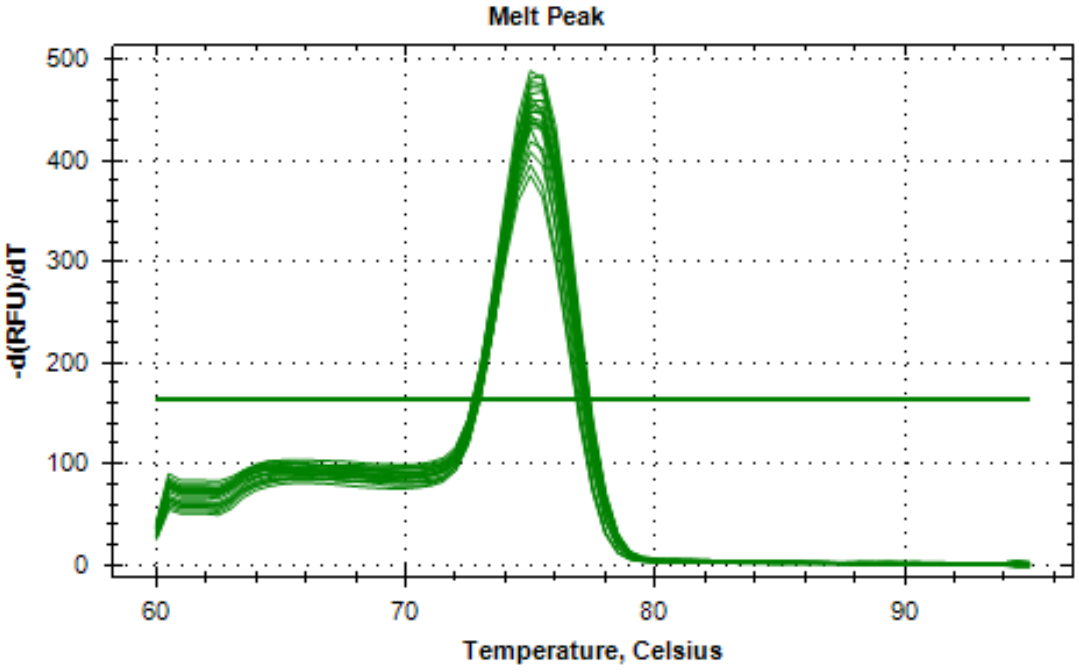

Abbildung 70: Schmelzkurve der Kalibriergerade von *ermB*. Die Schmelzkurve zeigt Schmelztemperaturen von 75 – 75,5 °C. Die Intensität des Signals nimmt mit höherer Verdünnung ab.

7.2.19 *E. faecalis*-Markergen dll

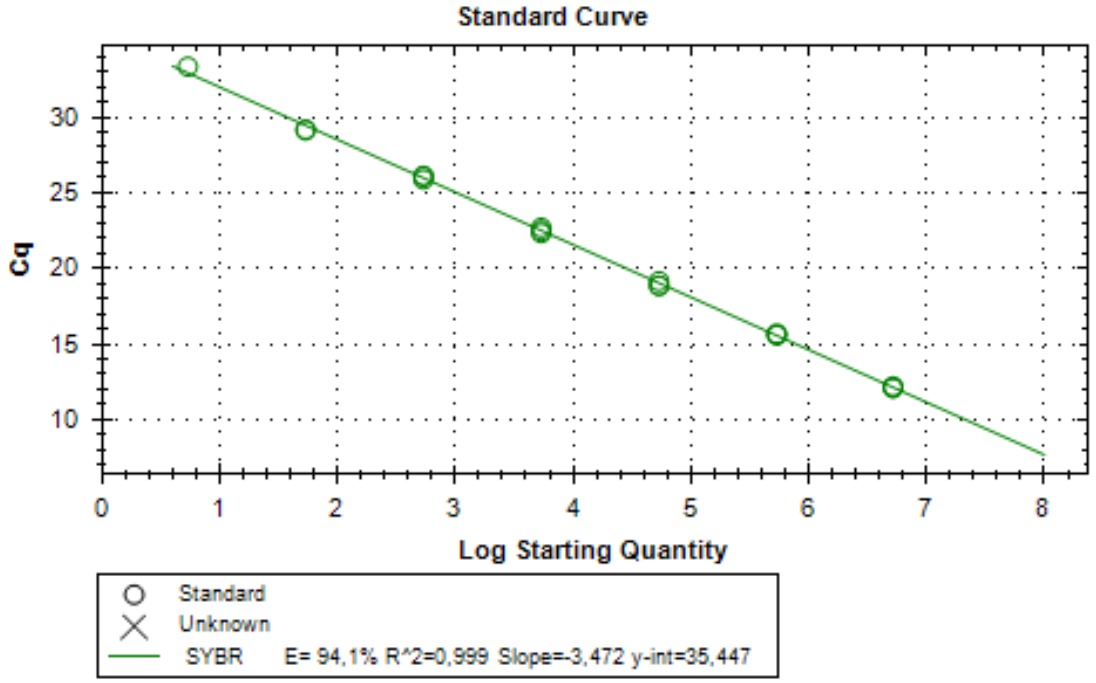

Abbildung 71: Kalibriergeraden von *E. faecalis-dll*. Die Effizienz liegt bei E=94,1 % bei einer Steigung von S=-3,472. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=0,999). Das Detektionslimit entspricht 5,36 Zelläquivalente.

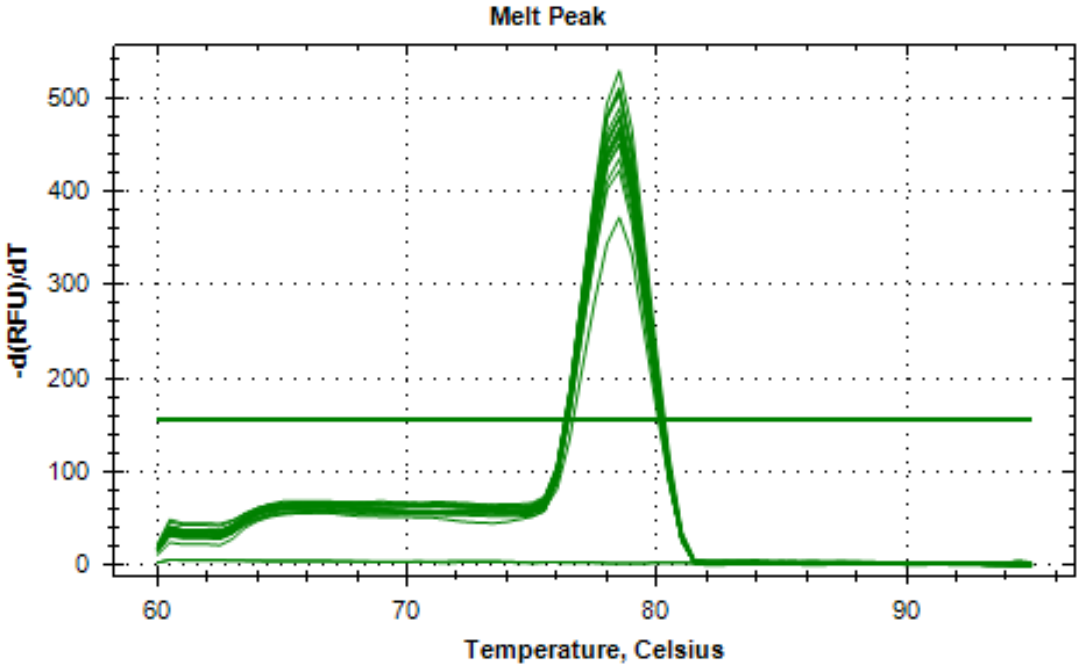

Abbildung 72: Schmelzkurve der Kalibriergeraden von *E. faecalis-dll*. Die Schmelzkurve zeigt einheitliche Schmelztemperaturen von 78,5 °C. Die Schmelzkurve zeigt bei sehr hohen und sehr niedrigen Konzentrationen eine geringere Intensität.

7.2.20 Colistin-Resistenzgen *mcr*-1

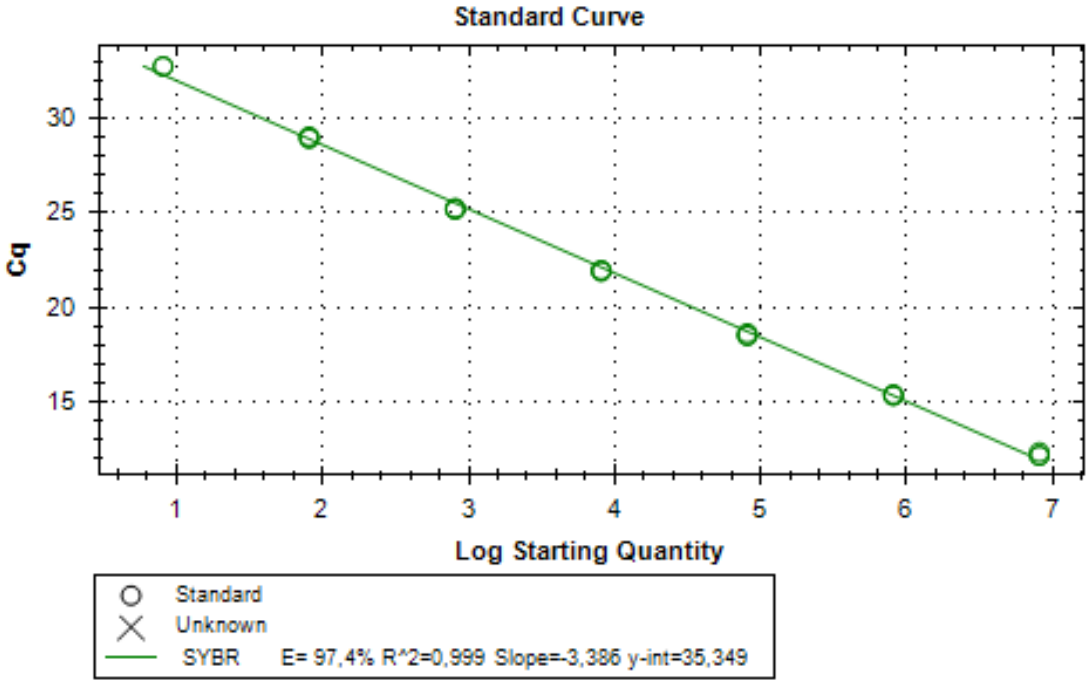

Abbildung 73: Kalibriergerade von *mcr-1*. Zur Erstellung der Kalibriergerade wurde die plasmidäre DNA extrahiert. Die Effizienz liegt bei E=97,4 % bei einer Steigung von S=-3,386. Alle Werte liegen im linearen Bereich (R^2=0,999). Das Detektionslimit entspricht 8 Genkopien.

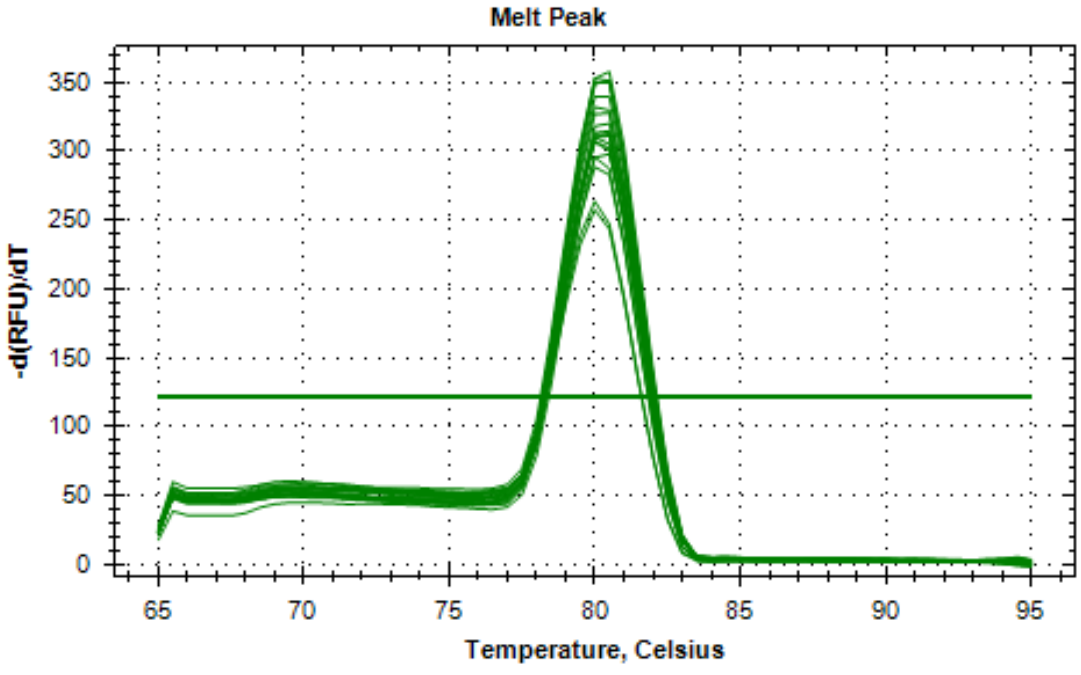

Abbildung 74: Schmelzkurve der Kalibriergeraden von *mcr-1*. Die Schmelzkurve zeigt Schmelztemperaturen von 80 – 80,5 °C. Die Intensität des Signals nimmt mit höherer Verdünnung ab.

7.3 Abundanzen und Standardabweichung an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Zulauf der Kläranlagen 1-7

Tabelle 15: Abundanz in Zelläquivalente/100 mL sowie die Standardabweichung der untersuchten fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresitenzgene and den sieben untersuchten Kläranlagen (n=3).

	KA 1	Abweichung	KA 2	Abweichung	KA 3	Abweichung	KA 4	Abweichung	KA 5	Abweichung	KA 6	Abweichung	KA 7	Abweichung
Enterokokken	2,013E+05	8,865E+04	3,718E+05	1,303E+05	4,648E+05	9,940E+04	7,299E+05	6,609E+04	1,628E+06	9,280E+05	9,860E+05	4,415E+05	6,315E+06	3,539E+06
E. faecalis	1,279E+03	8,342E+02	8,934E+02	2,311E+02	5,675E+02	1,495E+02	4,615E+03	2,671E+03	1,129E+04	7,154E+03	1,333E+04	8,444E+03	1,403E+04	1,443E+04
P. aeruginosa	3,622E+03	1,197E+01	1,823E+03	2,504E+02	5,226E+03	1,483E+03	2,667E+03	8,178E+02	4,409E+03	2,156E+03	1,119E+04	4,630E+03	1,297E+04	2,155E+03
K. pneumoniae	3,969E+05	2,047E+05	3,463E+05	4,016E+05	3,277E+05	2,223E+05	2,752E+05	2,632E+04	1,438E+06	8,700E+05	8,345E+05	2,419E+05	1,712E+06	1,417E+06
A. baumannii	2,268E+05	7,859E+04	1,049E+05	5,098E+04	2,202E+04	9,324E+02	1,241E+05	7,924E+04	1,087E+05	5,830E+04	9,743E+04	5,099E+04	1,889E+06	4,755E+05
E. coli	3,144E+05	7,748E+04	3,706E+05	3,126E+04	1,958E+05	9,389E+04	8,548E+05	3,009E+05	1,088E+06	6,316E+05	8,213E+05	4,554E+05	7,376E+06	3,194E+06
*erm*B	1,270E+07	5,506E+06	3,007E+06	9,951E+05	1,209E+07	3,369E+06	1,007E+07	3,371E+06	1,619E+07	1,121E+07	6,188E+06	7,507E+06	1,710E+08	8,050E+07
*int*l1	4,075E+07	1,168E+07	1,992E+07	9,443E+06	6,725E+07	2,089E+07	2,878E+07	9,811E+06	4,662E+07	5,476E+07	1,542E+07	1,261E+07	1,230E+08	1,380E+07
tetM	1,035E+07	2,279E+05	9,500E+06	4,870E+06	2,984E+06	2,202E+06	1,041E+07	1,943E+06	2,758E+06	1,633E+06	5,987E+06	3,603E+06	2,763E+07	1,718E+07
*bla*TEM	1,042E+07	1,347E+06	2,421E+07	1,879E+07	1,091E+07	8,326E+06	8,173E+06	5,159E+06	1,561E+07	1,216E+07	2,955E+06	3,620E+06	1,768E+08	7,487E+07
*sul*1	1,918E+08	2,559E+07	1,065E+08	5,179E+07	1,313E+08	4,977E+07	1,380E+08	3,276E+07	6,011E+07	3,529E+07	6,904E+07	4,691E+07	3,798E+08	8,131E+07
*bla*CTX-M	6,502E+04	2,560E+04	3,073E+04	1,437E+04	3,074E+04	8,496E+03	5,022E+05	3,267E+05	7,171E+04	5,439E+04	2,365E+05	3,334E+05	1,590E+05	1,044E+05
*bla*CTX -M-32	6,463E+05	4,472E+05	2,436E+06	3,228E+06	1,648E+05	1,012E+05	1,536E+06	1,801E+06	3,822E+05	3,016E+05	4,455E+05	5,648E+05	3,384E+06	1,698E+06
*bla*OXA-48	6,051E+05	2,513E+05	1,060E+07	1,110E+07	3,287E+05	1,909E+05	3,615E+06	4,914E+06	7,648E+05	1,027E+06	4,582E+06	6,386E+06	1,585E+05	1,161E+05
*bla*CMY-2	7,274E+03	4,362E+03	3,191E+05	2,222E+05	7,488E+03	5,536E+03	9,186E+05	6,410E+05	1,886E+04	1,117E+04	1,406E+03	8,676E+02	7,485E+05	9,219E+05
*bla*VIM	0,000E+00	-	0,000E+00	-	0,000E+00	-	0,000E+00	-	0,000E+00	-	0,000E+00	-	3,677E+06	3,298E+06
*van*A	7,292E+02	5,156E+02	0,000E+00	-	2,742E+00	3,878E+00	0,000E+00	-	1,861E+02	9,038E+01	0,000E+00	-	8,642E+02	6,581E+02
*mec*A	4,213E+02	1,518E+02	7,692E+02	9,349E+02	4,796E+02	5,531E+02	4,256E+02	2,669E+02	1,482E+03	1,008E+03	5,032E+02	3,213E+02	4,084E+03	4,150E+03
mcr-1	9,055E+03	1,281E+04	5,460E+02	7,721E+02	8,357E+01	1,182E+02	8,289E+03	1,172E+04	1,654E+03	2,339E+03	0,000E+00	-	2,861E+04	1,530E+04
*bla*NDM	0,000E+00	-	0,000E+00	-	5,500E+02	5,282E+02	4,097E+02	2,897E+02	2,194E+02	9,248E+01	0,000E+00	-	5,345E+03	4,865E+03

7.4 Signifikanz der Reduktion einzelner Kläranlagen

Tabelle 16: Genaue Signifikanz der mikrobiellen Reduktion der konventionellen Klärung an den sieben untersuchten Kläranlagen.

		KA1	KA2	KA3	KA4	KA5	KA6	KA7
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,04043
	E. faecalis	0,02967	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,04043
	P. aeruginosa	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,04043
	K. pneumoniae	0,0361	0,18434	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,04043
	A. baumannii	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,04043
	E. coli	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,04043
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043	0,09522	0,04043
	*int*l1	0,04043	0,19137	0,04043	0,04043	0,09522	0,19137	0,04043
	tetM	0,0361	0,0361	0,0361	0,0361	0,03826	0,0361	0,04043
	*bla*TEM	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043
	*sul*1	0,0361	0,32655	0,0361	0,0361	0,0361	0,18434	0,04043
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043
	*bla*CTX -M-32	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043	0,04043	0,09522	0,04043
	*bla*OXA-48	0,04043	0,04043	0,04043	0,19137	0,04043	0,19137	0,09522
	*bla*CMY-2	0,0361	0,0361	0,0361	0,18434	0,03826	0,09202	0,04043
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,04043
	*van*A	0,09382	0,5	0,25249	0,5	0,02967	0,74751	0,03826
	*mec*A	0,0361	0,0361	0,18434	0,08876	0,0361	0,02967	0,0367
	mcr-1	0,5	0,25249	0,25249	0,25249	0,25249	0,5	0,0318
	*bla*NDM	0,5	0,5	0,32142	0,09382	0,02967	0,5	0,0318

7.5 Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen nach adsorptiven Behandlung mit nachfolgender Sandfiltration

Tabelle 17: Zelläquivalente im Zulauf der Aktivkohlebehandlung (Ablauf des Nachklärbeckens) und Ablauf der Sandfiltration sowie der p-Wert der Reduktion während des Prozesses.

Zelläquivalente/100 mL		Zulauf	Ablauf	Abweichung $S_{\bar{x}}$	p-Wert Reduktion
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	1,50E+04	1,04E+04	2,83E+03	0,500
	E. faecalis	3,62E+01	4,44E+01	1,88E+01	0,659
	P. aeruginosa	6,72E+02	1,38E+02	9,71E+01	0,071
	K. pneumoniae	1,27E+04	7,29E+03	3,65E+03	0,373
	A. baumannii	1,56E+03	7,83E+02	3,33E+02	0,274
	E. coli	4,34E+04	1,77E+04	5,82E+03	0,500
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	1,94E+05	8,93E+04	2,37E+04	0,421
	*int*l1	3,19E+06	1,33E+06	3,25E+05	0,210
	tetM	1,33E+05	4,53E+04	1,38E+04	0,365
	*bla*TEM	2,34E+06	6,90E+05	4,01E+05	0,210
	*sul*1	1,37E+07	4,73E+06	1,35E+06	0,056
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	2,23E+03	1,47E+03	4,77E+02	0,500
	*bla*CTX-M-32	2,53E+04	7,61E+04	6,11E+04	0,111
	*bla*OXA-48	3,37E+04	5,27E+03	3,18E+03	0,151
	*bla*CMY-2	3,27E+03	2,07E+03	1,13E+03	0,421
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	8,35E+03	8,93E+03	5,70E+03	0,448
	*van*A	1,56E+00	1,98E+01	1,55E+01	0,722
	*mec*A	2,92E+01	3,81E+01	2,80E+01	0,345
	mcr-1	1,26E+01	2,08E+02	1,28E+02	0,976
	*bla*NDM	1,08E+01	3,42E+01	1,87E+01	0,917

7.6 Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen nach der adsorptiven Behandlung

Tabelle 18: Mittelwerte, Standardabweichung sowie Signifikanz der Zelläquivalente/100 mL von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Ablauf des Nachklärbeckens (Zulauf) und Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Zulauf	Ablauf	$S_{\bar{x}}$ Ablauf	Signifikanz p-Wert
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	1,50E+04	1,25E+04	5,36E+03	0,635
	E. faecalis	3,62E+01	4,56E+01	3,34E+01	0,452
	P. aeruginosa	6,72E+02	1,40E+02	3,38E+01	0,452
	K. pneumoniae	1,27E+04	9,12E+03	4,51E+03	0,397
	A. baumannii	1,56E+03	1,14E+03	3,54E+02	0,452
	E. coli	4,34E+04	2,79E+04	9,75E+03	0,548
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	1,94E+05	1,41E+05	4,07E+04	0,635
	*int*l1	3,19E+06	1,64E+06	3,58E+05	0,365
	tetM	1,33E+05	5,99E+04	1,51E+04	0,557
	*bla*TEM	2,34E+06	3,63E+05	1,10E+05	0,365
	*sul*1	1,37E+07	5,00E+06	1,15E+06	0,100
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	2,23E+03	1,03E+03	3,65E+02	0,365
	*bla*CTX-M-32	2,53E+04	1,90E+04	8,35E+03	0,365
	*bla*OXA-48	3,37E+04	8,48E+03	6,09E+03	0,365
	*bla*CMY-2	3,27E+03	1,35E+03	8,15E+02	0,452
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	8,35E+03	1,16E+04	5,56E+03	0,794
	*van*A	1,56E+00	5,82E-01	2,91E-01	0,357
	*mec*A	2,92E+01	<LOD	-	0,040
	mcr-1	1,26E+01	1,62E+02	8,57E+01	0,952
	*bla*NDM	1,08E+01	5,36E+01	5,78E+01	0,778

7.7 Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen nach UV-Bestrahlung

Tabelle 19: Zelläquivalente vor und nach der UV-Bestrahlung mit 400 J/m ² sowie der p-Wert der Reduktion während des Prozesses (1 L Batch-Verfahren). LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Vorher	Nachher	Abweichung $S_{\bar{x}}$	p-Wert Reduktion
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	1,50E+04	1,06E+04	5,47E+03	0,452
	E. faecalis	3,62E+01	2,35E+01	2,04E+01	0,357
	P. aeruginosa	6,72E+02	2,23E+02	9,94E+01	0,548
	K. pneumoniae	1,27E+04	1,07E+04	4,73E+03	0,492
	A. baumannii	1,56E+03	8,48E+02	2,42E+02	0,365
	E. coli	4,34E+04	2,36E+04	6,06E+03	0,635
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	1,94E+05	1,38E+05	6,69E+04	0,452
	*int*l1	3,19E+06	2,01E+06	5,63E+05	0,452
	tetM	1,33E+05	5,46E+04	2,85E+04	0,243
	*bla*TEM	2,34E+06	1,01E+06	5,12E+05	0,452
	*sul*1	1,37E+07	6,30E+06	1,81E+06	0,171
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	2,23E+03	7,91E+02	2,70E+02	0,365
	*bla*CTX-M-32	2,53E+04	3,80E+04	1,30E+04	0,794
	*bla*OXA-48	3,37E+04	9,49E+03	7,15E+03	0,365
	*bla*CMY-2	3,27E+03	4,02E+02	2,86E+02	0,143
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	8,35E+03	1,32E+04	9,46E+03	0,548
	*van*A	1,56E+00	<LOD	-	0,119
	*mec*A	2,92E+01	3,87E+01	2,20E+01	0,548
	mcr-1	1,26E+01	<LOD	-	0,014
	*bla*NDM	1,08E+01	<LOD	-	0,500

7.8 Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen nach Ozonbehandlung

Tabelle 20: Zelläquivalente im Zu- und Ablauf der Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC und 8 Min. Kontaktzeit sowie p-Wert der Reduktion während des Prozesses. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Zulauf	Ablauf	Abweichung $S_{\bar{X}}$	p-Wert Reduktion
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	1,50E+04	1,49E+02	8,30E+01	0,032
	E. faecalis	3,62E+01	<LOD	-	0,119
	P. aeruginosa	6,72E+02	4,21E+02	3,41E+02	0,095
	K. pneumoniae	1,27E+04	<LOD	-	0,040
	A. baumannii	1,56E+03	1,86E+00	1,61E+00	0,040
	E. coli	4,34E+04	5,86E+03	5,00E+03	0,056
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	1,94E+05	2,04E+03	6,53E+02	0,056
	*int*l1	3,19E+06	2,38E+04	5,97E+03	0,056
	tetM	1,33E+05	3,55E+02	1,25E+02	0,014
	*bla*TEM	2,34E+06	1,70E+04	5,84E+03	0,008
	*sul*1	1,37E+07	4,79E+04	2,19E+04	0,014
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	2,23E+03	<LOD	-	0,040
	*bla*CTX-M-32	2,53E+04	3,55E+03	1,68E+03	0,008
	*bla*OXA-48	3,37E+04	<LOD	-	0,008
	*bla*CMY-2	3,27E+03	1,23E+01	1,06E+01	0,016
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	8,35E+03	<LOD	-	0,040
	*Van*A	1,56E+00	<LOD	-	0,119
	*mec*A	2,92E+01	<LOD	-	0,071
	mcr-1	1,26E+01	<LOD	-	0,556
	*bla*NDM	1,08E+01	<LOD	-	0,500

7.9 Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen nach Ozonbehandlung mit sequentieller UV-Bestrahlung

Tabelle 21: Zelläquivalente im Zu- und Ablauf der Ozonbehandlung mit 1 g Ozon/g DOC und 8 Min. Kontaktzeit mit nachgeschalteter UV-Bestrahlung mit 400 J/m² bei 254 nm sowie der p-Wert der Reduktion während des Prozesses. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Zulauf	Ablauf	Abweichung $S_{\bar{x}}$	p-Wert Reduktion
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	1,50E+04	1,80E+03	1,52E+03	0,056
	E. faecalis	3,62E+01	<LOD	-	0,119
	P. aeruginosa	6,72E+02	5,97E+00	5,17E+00	0,008
	K. pneumoniae	1,27E+04	4,52E+01	2,98E+01	0,056
	A. baumannii	1,56E+03	1,46E+02	1,24E+02	0,087
	E. coli	4,34E+04	1,04E+02	6,16E+01	0,016
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	1,94E+05	1,08E+04	8,82E+03	0,032
	*int*l1	3,19E+06	2,04E+04	9,57E+03	0,032
	tetM	1,33E+05	9,95E+02	7,66E+02	0,014
	*bla*TEM	2,34E+06	4,46E+03	2,00E+03	0,056
	*sul*1	1,37E+07	7,09E+04	3,32E+04	0,014
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	2,23E+03	<LOD	-	0,040
	*bla*CTX-M-32	2,53E+04	2,13E+02	1,28E+02	0,018
	*bla*OXA-48	3,37E+04	<LOD	-	0,008
	*bla*CMY-2	3,27E+03	<LOD	-	0,008
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	8,35E+03	<LOD	-	0,040
	*van*A	1,56E+00	<LOD	-	0,278
	*mec*A	2,92E+01	<LOD	-	0,040
	mcr-1	1,26E+01	<LOD	-	0,556
	*bla*NDM	1,08E+01	<LOD	-	0,500

7.10 Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen nach Ultrafiltration 1

Tabelle 22: Zelläquivalente/100 mL im Zu- und Ablauf der Ultrafiltration 1 sowie der p-Wert der Reduktion während des Prozesses. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Zulauf	Ablauf (UF 1)	Abweichung $S_{\bar{X}}$	p-Wert Reduktion
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	1,50E+04	2,79E-01	2,03E-01	0,008
	E. faecalis	3,62E+01	<LOD	-	0,119
	P. aeruginosa	6,72E+02	3,60E-01	3,12E-01	0,008
	K. pneumoniae	1,27E+04	<LOD	-	0,040
	A. baumannii	1,56E+03	<LOD	-	0,040
	E. coli	4,34E+04	8,28E-01	4,58E-01	0,008
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	1,94E+05	1,51E+00	1,30E+00	0,008
	*int*l1	3,19E+06	5,55E-01	4,80E-01	0,008
	tetM	1,33E+05	<LOD	-	0,014
	*bla*TEM	2,34E+06	1,58E+01	8,99E+00	0,014
	*sul*1	1,37E+07	<LOD	-	0,014
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	2,23E+03	<LOD	-	0,040
	*bla*CTX-M-32	2,53E+04	<LOD	-	0,008
	*bla*OXA-48	3,37E+04	<LOD	-	0,008
	*bla*CMY-2	3,27E+03	<LOD	-	0,008
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	8,35E+03	7,22E-01	6,25E-01	0,040
	*van*A	1,56E+00	<LOD	-	0,119
	*mec*A	2,92E+01	<LOD	-	0,040
	mcr-1	1,26E+01	<LOD	-	0,556
	*bla*NDM	1,08E+01	<LOD	-	0,500

7.11 Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen nach Ultrafiltration 2

Tabelle 23: Zelläquivalente im Zu- und Ablauf der Ultrafiltration 2 sowie der p-Wert der Reduktion während des Prozesses. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Zulauf	Ablauf (UF 2)	Abweichung $S_{\bar{x}}$	p-Wert Reduktion
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	1,50E+04	1,13E+00	8,35E-01	0,008
	E. faecalis	3,62E+01	<LOD	-	0,119
	P. aeruginosa	6,72E+02	7,28E-01	6,31E-01	0,008
	K.pneumoniae	1,27E+04	7,36E-01	6,38E-01	0,040
	A. baumannii	1,56E+03	<LOD	-	0,040
	E. coli	4,34E+04	1,53E+00	1,01E+00	0,008
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	1,94E+05	5,76E-01	4,98E-01	0,008
	*int*l1	3,19E+06	4,61E+01	1,74E+01	0,008
	tetM	1,33E+05	<LOD	-	0,014
	*bla*TEM	2,34E+06	1,48E+01	7,40E+00	0,008
	*sul*1	1,37E+07	3,93E+03	3,36E+03	0,014
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	2,23E+03	<LOD	-	0,040
	*bla*CTX-M-32	2,53E+04	<LOD	-	0,008
	*bla*OXA-48	3,37E+04	<LOD	-	0,008
	*bla*CMY-2	3,27E+03	<LOD	-	0,008
	*bla*VIM	8,35E+03	9,39E-01	8,14E-01	0,040
selten vorkommende Resistenzgene	*van*A	1,56E+00	<LOD	-	0,119
	*mec*A	2,92E+01	<LOD	-	0,040
	mcr-1	1,26E+01	<LOD	-	0,556
	*bla*NDM	1,08E+01	<LOD	-	0,500

7.12 Tagesfrachten an ausgewählten fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Zulauf und Retentat von Ultrafiltration 1

Tabelle 24: Tagesfrachten an ausgewählten fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Zulauf und Retentat von Ultrafiltration 1. Basierend auf der durchschnittlichen täglichen Abwassermenge von 110.000m³ und einem Retentatvolumen von 5000m³.

	UF 1	
	Zulauf	Retentat
E. coli	3,07E+11	6,27E+11
A. baumannii	3,39E+10	1,65E+10
Enterococcus spp.	1,64E+11	7,01E+11
*bla*TEM	3,40E+12	6,02E+12
*erm*B	1,29E+12	3,58E+12
tetM	5,87E+11	1,38E+12
*bla*OXA-48	7,22E+10	1,48E+11
*sul*1	1,90E+14	1,21E+14
*int*I1	1,82E+13	3,74E+13
*bla*CTX-M	-	5,38E+10
*bla*CTX-M-32	-	4,59E+11

7.13 Koloniebildende Einheiten der Verfahren zur weitergehenden Abwasserbehandlung

Tabelle 25: Koloniebildenden Einheiten (KBE) von *E. coli*, intestinale Enterokokken, *Acinetobacter spp*. sowie ESBL-resistente Keime und Vancomycin resistente Enterokokken (VRE) vor und nach der weitergehenden Abwasserbehandlung.

KBE/100 mL		konv. Klärung	Aktivkohle	UV	Ozon	Ozon +UV	UF 1	UF 2
E.coli	Mittelwert	7,20E+04	3,22E+04	1,90E+02	5,76E+01	1,12E+01	2,00E-01	4,11E+00
	Minimal	1,24E+04	1,20E+03	0,00E+00	1,42E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	Maximal	2,35E+05	9,80E+04	9,25E+02	1,22E+02	1,92E+01	1,00E+00	1,00E+01
Intestinale Enterokokken	Mittelwert	9,38E+05	4,94E+03	2,42E+03	2,67E+00	1,98E+01	1,02E+00	1,11E+00
	Minimal	3,47E+05	6,55E+02	4,27E+02	0,00E+00	1,62E+00	3,67E-01	0,00E+00
	Maximal	1,76E+06	1,48E+04	1,14E+04	4,00E+00	7,93E+01	1,89E+00	2,76E+00
Pseudomonas spp.	Mittelwert	3,74E+04	6,86E+03	1,44E+02	2,55E+01	7,66E+00	3,76E-01	2,75E+00
	Minimal	9,00E+02	1,03E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	Maximal	1,34E+05	2,00E+04	4,94E+02	5,47E+01	1,26E+01	1,00E+00	1,00E+01
Acinetobacter spp.	Mittelwert	1,14E+04	1,65E+03	1,00E+02	5,60E+01	1,46E+02	9,78E-01	4,57E+01
	Minimal	0,00E+00	4,00E+01	0,00E+00	5,03E+00	3,33E-01	0,00E+00	0,00E+00
	Maximal	4,24E+04	7,36E+03	3,97E+02	1,62E+02	5,33E+02	2,60E+00	1,70E+02
ESBL	Mittelwert	1,74E+04	5,61E+03	4,35E+02	2,84E+01	6,59E+00	6,24E+00	1,15E+02
	Minimal	2,50E+02	0,00E+00	0,00E+00	3,11E+00	2,22E-01	0,00E+00	2,27E-01
	Maximal	7,72E+04	2,71E+04	1,07E+03	8,27E+01	1,58E+01	2,39E+01	3,39E+02
VRE	Mittelwert	5,44E+03	1,69E+02	5,75E+01	1,37E+01	1,31E+00	2,81E-01	3,21E+01
	Minimal	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	Maximal	2,71E+04	3,37E+02	2,26E+02	5,27E+01	5,17E+00	1,00E+00	9,63E+01

7.14 p-Werte der Abundanzen konventioneller und erweiterter Abwasserreinigung

Tabelle 26: p-Werte der Reduktion durch konventioneller Klärung bei kommunalen Kläranlagen (n=7).

		p-Wert
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	0,00108
	E. faecalis	0,00108
	P. aeruginosa	0,00108
	K. pneumoniae	0,00108
	A. baumannii	0,00108
	E. coli	0,00108
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	0,00108
	*int*l1	0,00108
	tetM	0,00108
	*bla*TEM	0,00108
	*sul*1	0,00247
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	0,00108
	*bla*CTX-M-32	0,00108
	*bla*OXA-48	0,00108
	*bla*CMY-2	0,0053
	*bla*VIM	0,5000
selten vorkommende Resistenzgene	*van*A	0,08943
	*mec*A	0,00108
	mcr-1	0,00476
	*bla*NDM	0,05071

Tabelle 27: p-Werte der Reduktion durch Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung.

	Aktivkohle	Sandfiltration	UV	Ozon	UF 1	UF 2	Kombi
fakultativ pathogene Bakterien	0,34446	0,34446	0,28759	0,02248	0,00239	0,0025	0,03278
häufig vorkommende Resistenzgene	0,26543	0,2017	0,26543	0,00609	0,00397	0,00609	0,01836
intermediär vorkommende Resistenzgene	0,26543	0,33805	0,41727	0,01723	0,00485	0,00375	0,00794
selten vorkommende Resistenzgene	0,5	0,9697	0,5	0,01429	0,01054	0,01326	0,01429

Tabelle 28: p-Werte der Reduktion durch 1,5 g bzw. 2 g Ozon/g DOC ohne und mit nachgeschalteter UV-Behandlung mit 400 J/m² bzw. 600 J/m² bezogen auf den Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens).

	1,5 g Ozon/g DOC			2 g Ozon/g DOC		
	kein UV	400 J/m² UV	600 J/m² UV	kein UV	400 J/m² UV	600J/m² UV
fakultativ pathogene Bakterien	0,08637	0,06377	0,06377	0,04635	0,01001	0,00645
häufig vorkommende Resistenzgene	0,03005	0,01836	0,01836	0,01836	0,01836	0,01079
intermediär vorkommende Resistenzgene	0,04043	0,09522	0,09522	0,01519	0,01326	0,01326
selten vorkommende Resistenzgene	0,21186	0,21186	0,21186	0,07897	0,036	0,036

Tabelle 29: Exakte p-Werte der Reduktion durch 1,5 g bzw. 2 g Ozon/g DOC ohne und mit nachgeschalteter UV-Behandlung mit 400 bzw. 600 J/m² bezogen auf den Zulauf (Ablauf des Sedimentationsbecken der Aktivkohlebehandlung).

	1,5 g Ozon/g DOC			2 g Ozon/g DOC		
	kein UV	400 J/m² UV	600 J/m² UV	kein UV	400 J/m² UV	600 J/m² UV
fakultativ pathogene Bakterien	0,00481	0,01314	0,00481	0,00836	0,00836	0,00836
Häufig vorkommende Resistenzgene	0,00596	0,00609	0,00596	0,00558	0,00596	0,00558
Intermediär vorkommende Resistenzgene	0,01	0,01	0,00888	0,00485	0,00485	0,00375
Selten vorkommende Resistenzgene	0,22663	0,22663	0,22663	0,22663	0,22663	0,22663

Tabelle 30: Exakte p-Werte der Reduktion durch eine Ozonbehandlung mit verlängerter Verweilzeit von 30 Min. und 60 Min. bei 1 g Ozon/g DOC in Bezug auf den Ablauf des Nachklärbeckens.

	30 Min. Ozone	30 Min. Ozone+ UV	60 Min. Ozone	60 Min. Ozone +UV
fakultativ pathogene Bakterien	0,11488	0,01001	0,00622	0,00217
häufig vorkommende Resistenzgene	0,10504	0,04735	0,00609	0,00609
intermediär vorkommende Resistenzgene	0,03030	0,01326	0,02726	0,01470
selten vorkommende Resistenzgene	0,50000	0,21186	0,21186	0,21186

7.15 Abundanzen nach Ultrafiltration

Tabelle 31: Abundanzen fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Zulauf und Ablauf der beiden Ultrafiltrationsverfahren bei unterschiedlichen Fluxraten (12,5 L/m²h, 50 L/m²h, 90 L/m²h) nach der konventionellen Klärung. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente /100 mL	UF 1 nach Ablauf der Nachklärung				UF 2 nach Ablauf der Nachklärung		
	Zulauf	12,5 L/m²h	50 L/m²h	90 L/m²h	Zulauf	12,5 L/m²h	50 L/m²h
E. coli	2,79E+02	4,85E+00	4,82E-01	<LOD	1,58E+04	6,40E-01	1,66E+00
A. baumannii	3,09E+01	1,06E+00	<LOD	<LOD	4,03E+02	1,51E-01	<LOD
Enterokokken	1,49E+02	1,21E+01	3,11E-01	<LOD	1,79E+04	9,93E-01	2,48E+00
*bla*TEM	3,09E+03	7,08E+01	1,13E+01	<LOD	2,03E+05	2,09E+02	1,01E+02
*erm*B	1,18E+03	1,76E+01	7,83E+01	<LOD	9,96E+04	4,71E+00	9,62E+00
*tet*M	5,34E+02	<LOD	<LOD	<LOD	7,30E+04	2,56E+00	1,08E+01
*bla*OXA-48	6,56E+01	<LOD	<LOD	<LOD	1,83E+04	1,27E+00	1,18E+00
*sul*1	1,72E+05	2,53E+03	1,42E+02	2,48E+01	1,76E+05	7,87E+02	2,18E+03
*int*l1	1,65E+04	1,02E+04	4,02E+02	9,96E+01	2,45E+04	3,59E+01	2,73E+02
*bla*CTX-M	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,80E+05	3,31E+01	<LOD
*bla*CTX-M-32	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,03E+06	2,63E+02	<LOD

Tabelle 32: Abundanzen fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Zulauf und Ablauf der beiden Ultrafiltrationsverfahren bei unterschiedlichen Fluxraten (12,5 L/m²h, 50 L/m²h, 90 L/m²h) nach der adsorptiven Reinigung. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente /100 mL	UF 1 nach dem Sedimentationsbecken der adsorptiven Reinigungsstufe				UF 2 nach Sedimentationsbecken der adsorptiven Reinigungsstufe		
	Zulauf	12,5 L/m²h	50 L/m²h	90 L/m²h	Zulauf	12,5 L/m²h	50 L/m²h
E. coli	4,60E+04	<LOD	<LOD	<LOD	2,27E+04	2,37E+02	2,45E+02
A. baumannii	6,63E+02	<LOD	<LOD	<LOD	6,14E+02	7,69E+00	6,53E+00
Enterokokken	1,40E+03	<LOD	<LOD	<LOD	5,26E+03	6,11E+01	1,33E+02
*bla*TEM	3,53E+05	1,87E+02	5,59E+01	4,98E+01	2,84E+05	2,90E+03	2,58E+03
*erm*B	1,53E+05	7,49E-01	1,77E+00	2,78E-01	1,03E+05	1,05E+03	8,17E+02
*tet*M	4,12E+04	<LOD	<LOD	1,31E+00	6,30E+04	6,39E+02	5,89E+02
*bla*OXA-48	4,59E+03	<LOD	<LOD	<LOD	5,58E+03	6,13E+01	1,35E+02
*sul*1	4,66E+06	6,29E+02	9,31E+01	<LOD	4,62E+06	6,67E+02	4,85E+04
*int*l1	1,24E+06	2,68E+03	2,06E+02	<LOD	1,46E+06	1,73E+02	1,73E+04
*bla*CTX-M	2,08E+03	<LOD	<LOD	2,47E+00	2,82E+03	4,79E-01	1,36E+01
ctx-M-32	2,07E+04	<LOD	<LOD	4,45E+00	2,18E+04	4,98E+00	1,69E+02

7.16 Antibiogramme ausgewählter Isolate nach der weitergehenden Abwasserbehandlung

Tabelle 33: Antibiogramm der relevanten Isolate. +: phänotypisch resistent, -phänotypisch sensibel, I= semiresistent, Leer: nicht untersucht.

Isolat-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	18	19	20	21	22	28	29	30	31	32	33	34	36	39
MALDI	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*P. putida*	*P. fluorescens*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*E. faecium*	*K. pneumoniae*	*E. faecium*	*P. fluorescens*	*E. faecium*	*K. oxytoca*	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*S. fonticola*	*E. coli*
Ampicillin											+		+		+									
Temocillin	-	-	-	-	-	-			-	-		-				-	-	-	-	-	-	-	+	-
Piperacillin	+	+	+	+	+	+			+	+		+				+	+	+	+	+	+	+	+	+
Piperacillin/ Tazobactam	+	-	-	-	-	-			+	+		-				-	-	+	+	-	-	-	-	-
Cefotaxim	+	+	+	+	+	+			+	+		+				+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ceftriaxon																								
Ceftazidim	+	+	+	+	+	+			+	+		+				+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ceftazidim/ Avibactam	-	-	-	-	-	-			-	-		-				-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftolozan/ Tazobactam	+	-	-	+	+	-			+	+		-				-	-	I	+	-	-	I	-	-
Imipenem	-	-	-	-	-	-			-	-		-				-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meropenem	-	-	-	-	-	-			I	-		-				-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicin											+		I		+									
Amikacin	-	-	-	-	-	-			-	-		-				-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobramycin																								
Tigecyclin	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin	+	+	+	+	I	-			+	+		+				+	I	+	+	+	+	+	+	+
Levofloxacin	+	+	+	I	-	-			+	+		+				+	-	+	+	+	+	+	+	+
Chlor-amphenicol	-	-	-	-	-	+			+	-		-				-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	+	-	-	-	-	-			+	+	+	-	+		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Fosfomycin	+	+	-	-	-	-			+	+	+	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colistin	-	-	-	-	-	-			+	-		-				-	-	-	-	-	-	-	+	+
Vancomycin											+		+		+									
3-MRGN	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

7.17 Liste aller nachgewiesenen Antibiotikaresistenzgene im Retentat der Ultrafiltration

Tabelle 34: Liste aller gefundener Antibiotikaresistenzgene im Retentat der Ultrafiltration.

Methicillin Resistenz	Erythromycin Resistenz	Tetracyclin Resistenz	Vancomycin Resistenz		Imipenem Resistenz	β-lactamasen	Metallo β-lactamasen
*mec*A	*erm*B	*tet*A	*van*A	*van*SB	*bla*VIM1	*bla*OXA-2	*bla*KPC
*mec*R1	*erm*BP	*tet*B	*van*A2	*van*SC	*bla*VIM2	*bla*OXA -9	*bla*NDM
	*erm*C	*tet*D	*van*B	*van*SD	*bla*VIM3	*bla*OXA -46	Various others
	*erm*F	*tet*G	*van*D	*van*SE	*bla*VIM4	*bla*OXA -53	
	*erm*G	*tet*H	*van*D5	*van*TG	*bla*VIM5	*bla*OXA -28	
	ermGN	*tet*L	*van*E	*van*U	*bla*VIM8	*bla*OXA -10	
	*erm*X	*tet*M	*van*G	*van*W	*bla*VIM9	*bla*OXA -1	
		*tet*O	*van*H	*van*WB	*bla*VIM10	*bla*OXA -47	
		*tet*Q	*van*H		*bla*VIM11	*blaCTX*-M-7	
		*tet*R	*van*HB	*van*X	*bla*VIM12	*blaCTX*-M-33	
		*tet*S	*van*R	*van*XB	*bla*VIM18	*blaCTX*-M-3	
		*tet*T	*van*RB	*van*XB		*blaCTX*-M-9	
		*tet*W	*van*RD	*van*Y		*blaCTX*-M-2	
		*tet*X2	*van*RE	*van*YB		*blaCTX*-M-30	
		*tet*Y	*van*S	*van*YG		*blaCTX*-M-1	
			*van*S	*van*Z		*blaCTX*-M-37	
						blaCTX-M-15	
						blaCTX-M-26	
						*bla*TEM	
						Various others	

7.18 Abundanzen und Standardabweichung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Ablauf der Nachklärung und nach Behandlung mit 1,5 bzw 2 g Ozon/ g DOC und 400 bzw. 600 J/m²

Tabelle 35: Zelläquivalente/100 mL fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens) und nach einer Behandlung mit 1,5 g Ozon/g DOC ohne UV-Bestrahlung und mit nachfolgender 400 J/m² und 600 J/m² UV-Bestrahlung. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		1,5 g Ozon/g DOC							
		Zulauf		kein UV		400 J/m²		600 J/m²	
		Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	1,24E+04	4,78E+03	2,48E+01	1,26E+01	3,62E+01	1,48E+01	2,22E+02	1,51E+02
	E. faecalis	9,00E+00	7,35E+00	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	P. aeruginosa	1,92E+01	7,88E+00	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	K. pneumoniae	2,83E+04	1,11E+04	1,58E+02	1,29E+02	1,05E+02	8,59E+01	1,63E+02	1,33E+02
	A. baumannii	5,54E+02	1,87E+02	9,48E+01	5,72E+01	4,63E+01	3,78E+01	6,66E+01	5,44E+01
	E. coli	2,00E+04	8,76E+03	5,63E+02	3,03E+02	1,45E+02	4,18E+01	1,59E+02	1,95E+01
häufig vorkommende Resistenzgene	ermB	3,66E+04	2,34E+04	2,89E+02	3,96E+01	1,64E+02	5,66E+01	8,96E+02	3,82E+02
	int1	1,10E+06	4,16E+05	1,23E+04	3,17E+03	5,01E+03	8,31E+02	9,93E+03	3,39E+03
	tetM	2,76E+04	1,17E+04	2,62E+02	2,59E+01	1,91E+02	3,89E+01	1,95E+02	4,63E+01
	*bla*TEM	1,02E+05	3,80E+04	5,14E+04	2,15E+04	4,26E+04	1,74E+04	6,24E+05	4,76E+05
	sul1	3,76E+06	1,30E+06	2,84E+04	1,08E+03	1,06E+04	2,52E+03	1,98E+04	8,45E+03
intermediär vorkommende Resistenzg	*bla*CTX-M	9,14E+02	4,16E+02	3,04E+02	2,48E+02	5,67E+01	4,63E+01	6,09E+01	4,53E+01
	*bla*CTX-M-32	3,69E+03	2,44E+03	4,13E+02	2,24E+02	5,98E+02	3,20E+02	6,24E+02	2,86E+02
	*bla*OXA-48	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-

Zelläquivalente/100 mL		1,5 g Ozon/g DOC							
		Zulauf		kein UV		400 J/m²		600 J/m²	
		Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$
	*bla*CMY-2	5,70E+02	2,06E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	1,32E+03	1,08E+03	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*van*A	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*mec*A	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	mcr-1	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*NDM	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-

Tabelle 36: Zelläquivalente/100 mL fakultativ-pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens) und nach einer Behandlung mit 2 g Ozon/g DOC ohne UV-Bestrahlung und mit nachfolgender 400 J/m² und 600 J/m² UV-Bestrahlung. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		2 g Ozon/g DOC							
		Zulauf		kein UV		400 J/m²		600 J/m²	
		Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	2,02E+04	7,97E+03	1,21E+02	5,95E+01	1,50E+01	6,61E+00	1,70E+02	1,23E+02
	E. faecalis	3,78E+01	1,55E+01	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	P. aeruginosa	1,55E+02	4,47E+01	1,96E+02	1,60E+02	2,38E+02	1,94E+02	7,83E+00	6,40E+00
	K. pneumoniae	5,79E+04	2,67E+04	2,38E+02	1,94E+02	<LOD	-	<LOD	-
	A. baumannii	1,56E+03	6,59E+02	3,54E+01	2,89E+01	3,51E+01	2,87E+01	2,31E+01	1,89E+01
	E. coli	4,23E+04	1,69E+04	3,83E+02	1,11E+02	1,15E+02	9,39E+01	3,12E+01	1,33E+01
häufig vorkommende Resistenzgene	ermB	8,10E+04	4,51E+04	8,44E+02	4,67E+02	3,28E+02	1,97E+02	9,04E+02	5,14E+02
	int1	1,64E+06	2,21E+05	1,95E+04	1,14E+04	7,36E+03	2,92E+03	8,63E+03	3,77E+03
	tetM	5,04E+04	1,09E+04	2,55E+02	7,68E+01	2,63E+02	9,68E+01	2,34E+02	2,01E+01
	*bla*TEM	5,15E+06	4,10E+06	2,68E+05	1,89E+05	3,48E+05	2,59E+05	5,30E+04	2,50E+04
	sul1	5,85E+06	1,44E+05	4,82E+04	3,01E+04	1,33E+04	6,32E+03	1,06E+04	6,56E+02
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	1,82E+03	7,05E+02	2,25E+01	1,27E+01	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*CTX-M-32	6,88E+03	3,70E+03	4,51E+02	6,65E+01	4,28E+02	5,03E+01	5,30E+02	2,56E+02
	*bla*OXA-48	6,02E+02	4,92E+02	5,34E+01	4,36E+01	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*CMY-2	8,91E+02	2,69E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*VIM	2,08E+03	1,70E+03	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
selten vorkommende Resistenzgene	*van*A	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*mec*A	5,78E+01	4,72E+01	2,30E+01	1,87E+01	<LOD	-	<LOD	-
	mcr-1	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*NDM	1,13E+02	9,26E+01	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-

7.19 Koloniebildende Einheiten der Auswirkungen einer Veränderung von Ozonkonzentration und UV-Dosis nach der konventionellen Klärung

Tabelle 37: Koloniebildenden Einheiten (KBE)/100 mL von *E. coli*, Enterokokken, *Acinetobacter spp.* und *Pseudomonas* spp. im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens) und nach 1,5 g Ozon/g DOC ohne und mit nachgeschalteter UV-Behandlung mit 400 J/m² bzw. 600 J/m².

KBE/100 mL		1,5 g Ozon/g DOC			
		Zulauf	kein UV	400 J/m³	600 J/m³
E. coli	Mittelwert	15833	26	2	3
	Minimal	2500	1	2	3
	Maximal	33000	103	4	11
Enterokokken	Mittelwert	1297	1	0	0
	Minimal	0	0	0	0
	Maximal	3820	2	0	0
Pseudomonas spp.	Mittelwert	4800	471	54	178
	Minimal	0	3	0	0
	Maximal	8700	1381	240	632
Acinetobacter spp.	Mittelwert	67497	17	1	4
	Minimal	3100	0	0	0
	Maximal	100000	36	2	7

Tabelle 38: Koloniebildenden Einheiten (KBE)/100 mL von E. coli, Enterokokken, Acinetobacter sowie ESBL-resistente Keime, MRSA und Vancomycin resistente Enterokokken im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens) und nach 2 g Ozon/g DOC ohne und mit nachgeschalteter UV-Behandlung mit 400 J/m² bzw. 600 J/m².

KBE/100 mL		2 g Ozon/g DOC			
		Zulauf	kein UV	400J/m³	600J/m³
E. coli	*Mittelwert*	24133	6	0	1
	Minimal	20000	0	0	1
	Maximal	29500	11	1	3
Enterokokken	Mittelwert	2161	0	0	0
	Minimal	0	0	0	0
	Maximal	3700	1	0	0
Pseudomonas spp.	Mittelwert	57667	75	53	5
	Minimal	0	0	0	0
	Maximal	120000	239	212	20
Acinetobacter spp.	Mittelwert	77440	1	1	2
	Minimal	5000	0	0	0
	Maximal	149880	3	1	7

7.20 Abundanzen und Standardabweichung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen nach der adsorptiven Reinigung und nach Behandlung mit 1,5 bzw 2 g Ozon/g DOC und 400 bzw. 600 J/m²

Tabelle 39: Zelläquivalent/100 mL fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene im Zulauf (Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung) und nach einer Behandlung mit 1,5 g Ozon/g DOC ohne UV-Bestrahlung und mit nachfolgender 400 J/m² und 600 J/m² UV-Bestrahlung. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		1,5 g Ozon/g DOC							
		Zulauf		kein UV		400 J/m²		600 J/m²	
		Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	3,11E+03	1,16E+03	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	E. faecalis	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	P. aeruginosa	4,31E+01	3,05E+01	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	K. pneumoniae	1,35E+04	6,99E+03	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	A. baumannii	2,01E+02	8,28E+01	<LOD	-	7,58E+01	5,36E+01	<LOD	-
	E. coli	9,53E+03	8,69E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	9,68E+03	3,14E+03	1,26E+01	8,92E+00	1,03E+02	2,57E+01	8,27E+00	5,85E+00
	*intI*1	1,21E+06	5,99E+05	6,71E+02	6,04E+00	1,73E+03	4,64E+02	7,98E+02	2,67E+02
	*tet*M	6,93E+03	8,38E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*TEM	5,48E+04	7,48E+03	1,41E+04	6,95E+03	1,27E+04	7,82E+03	1,11E+04	4,64E+03
	*sul*1	1,96E+06	4,91E+05	1,12E+03	1,01E+02	1,95E+03	4,35E+02	1,10E+03	3,34E+02
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	1,45E+03	5,44E+02	2,17E+01	1,53E+01	3,01E+01	2,13E+01	<LOD	-
	*bla*CTX-M-32	7,29E+03	2,34E+03	2,53E+02	1,79E+02	2,97E+02	2,10E+02	2,33E+02	1,65E+02
	*bla*Oxa-48	1,47E+02	1,04E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*CMY-2	3,61E+02	1,80E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-

Zelläquivalente/100 mL		1,5 g Ozon/g DOC							
		Zulauf		kein UV		400 J/m²		600 J/m²	
		Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	3,81E+02	2,70E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*van*A	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*mec*A	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	mcr-1	3,26E+02	2,06E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*NDM	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-

Tabelle 40: Zelläquivalente/100 mL fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgene im Zulauf (Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung) und nach einer Behandlung mit 2 g Ozon/g DOC ohne UV-Bestrahlung und mit nachfolgender 400 J/m² und 600 J/m² UV-Bestrahlung. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		2 g Ozon/g DOC							
		Zulauf		kein UV		400 J/m²		600 J/m²	
		Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	3,32E+04	2,22E+04	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	E. faecalis	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	P. aeruginosa	1,58E+01	1,12E+01	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	K. pneumoniae	2,42E+04	1,32E+04	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	A. baumannii	6,41E+02	1,92E+02	5,77E+00	4,08E+00	5,29E+00	3,74E+00	3,33E+00	2,35E+00
	E. coli	3,44E+04	1,61E+04	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	4,64E+04	2,38E+04	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*intI*1	1,51E+06	8,74E+05	1,02E+03	3,07E+02	7,73E+02	1,44E+02	1,07E+03	2,85E+02
	*tet*M	7,68E+03	2,50E+03	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*TEM	1,31E+05	3,66E+04	1,18E+04	8,33E+03	1,79E+04	9,89E+03	1,27E+04	7,38E+03
	*sul*1	2,23E+06	1,04E+06	1,62E+03	5,05E+02	1,82E+03	4,78E+02	6,27E+02	4,44E+02
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	3,63E+03	1,66E+03	1,07E+01	7,60E+00	1,16E+01	8,22E+00	<LOD	-
	*bla*CTX-M-32	1,78E+04	6,50E+03	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*Oxa-48	6,19E+03	4,38E+03	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*CMY-2	3,73E+02	1,09E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	2,87E+02	2,03E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*van*A	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*mec*A	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	mcr-1	3,92E+02	2,49E+02	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*NDM	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-

7.21 Koloniebildende Einheiten der Auswirkungen einer Veränderung von Ozonkonzentration und UV-Dosis nach adsorptiver Reinigung

Tabelle 41: Koloniebildende Einheiten (KBE)/100 mL von E. coli, Enterokokken, Acinetobacter im Zulauf (Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung) und nach 1,5 g Ozon/g DOC ohne-und mit nachgeschalteter UV-Behandlung mit 400 J/m² bzw. 600 J/m².

KBE/100 mL		1,5 g Ozon/g DOC			
		Zulauf	kein UV	400 J/m²	600 J/m²
E. coli	Mittelwert	9375	0	0	0
	Minimal	5200	0	0	0
	Maximal	13550	1	0	0
Intestinale Enterokokken	Mittelwert	860	0	0	0
	Minimal	793	0	0	0
	Maximal	927	0	0	0
Pseudomonas spp.	Mittelwert	4625	1	0	0
	Minimal	0	0	0	0
	Maximal	9250	2	0	0
Acinetobacter spp.	Mittelwert	42502	1	0	0
	Minimal	1657	0	0	0
	Maximal	83347	3	0	0

Tabelle 42: Koloniebildende Einheiten (KBE)/100 mL von E. coli, Enterokokken, Acinetobacter im Zulauf (Aktivkohle) und nach 2 g Ozon/g DOC ohne-und mit nachgeschalteter UV-Behandlung mit 400 bzw. 600 J/m².

KBE/100 mL		2 g Ozon/g DOC			
		Zulauf	kein UV	400 J/m²	600 J/m²
E. coli	Mittelwert	6450	1	0	0
	Minimal	6450	0	0	0
	Maximal	6450	1	0	0
Intestinale Enterokokken	Mittelwert	850	0	0	0
	Minimal	500	0	0	0
	Maximal	1200	0	0	0
Pseudomonas spp.	Mittelwert	2250	3	0	0
	Minimal	0	0	0	0
	Maximal	4500	6	0	0
Acinetobacter spp.	Mittelwert	3742	8	0	0
	Minimal	1837	0	0	0
	Maximal	5647	15	1	1

7.22 Abundanz und Standardabweichung von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Ablauf der Nachklärung und nach weitergehender 1g Ozon/g DOC und einer Verweilzeit von 30 und 60 Min. sowie sequentieller UV-Behandlung

Tabelle 43: Zelläquivalente/100 mL an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens), nach einer Behandlung mit 1 g Ozon/g DOC (30 Min. Verweilzeit) und mit Ozonbehandlung sowie nachfolgender UV-Bestrahlung mit 400 J/m². LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		30 Min. Ozon					
		Zulauf		kein UV		400 J/m² UV	
		Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	7,55E+03	2,33E+03	4,32E+02	1,70E+02	5,89E+01	3,38E+01
	E. faecalis	1,55E+01	1,26E+01	<LOD	-	<LOD	-
	P. aeruginosa	1,28E+03	9,93E+02	6,00E+01	3,73E+01	1,61E+01	1,31E+01
	K. pneumoniae	1,08E+04	6,02E+03	8,79E+03	6,95E+03	<LOD	-
	A. baumannii	7,52E+02	2,72E+02	6,34E+02	4,36E+02	1,47E+01	7,61E+00
	E. coli	1,89E+04	1,14E+04	1,62E+03	1,15E+03	2,28E+02	1,38E+02
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	8,54E+04	3,60E+04	6,71E+03	4,13E+03	1,33E+03	6,19E+02
	*intI*1	1,93E+06	1,27E+06	3,50E+05	2,78E+05	4,73E+04	3,58E+04
	*tet*M	3,34E+04	1,30E+04	7,02E+02	3,15E+02	4,42E+02	2,54E+02
	*bla*TEM	3,05E+06	2,47E+06	1,64E+06	1,31E+06	5,07E+04	3,16E+04
	*sul*1	5,46E+06	3,17E+06	6,30E+05	4,98E+05	1,46E+05	1,14E+05
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	3,04E+03	1,41E+03	1,59E+02	9,38E+01	<LOD	-
	*bla*CTX-M-32	2,08E+04	1,20E+04	2,45E+03	8,45E+02	1,61E+02	6,60E+01
	*bla*Oxa-48	2,98E+03	1,65E+03	5,77E+02	4,71E+02	<LOD	-
	*bla*CMY-2	6,88E+02	3,57E+02	6,19E+01	5,06E+01	<LOD	-
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	5,10E+02	4,16E+02	<LOD	-	<LOD	-
	*van*A	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*mec*A	<LOD	-	2,71E+01	2,22E+01	<LOD	-
	mcr-1	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	*bla*NDM	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-

Tabelle 44: Zelläquivalente/100 mL an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens), nach einer Behandlung mit 1 g Ozon/g DOC (60 Min. Verweilzeit) und mit Ozonbehandlung sowie nachfolgender UV-Bestrahlung mit 400 J/m². LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		60 Min. Ozon					
		Zulauf		kein UV		400 J/m² UV	
		Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$	Abundanz	Abweichung $S_{\bar{x}}$
fakultativ pathogene Bakterien	Enterokokken	1,02E+04	4,15E+03	3,59E+00	2,93E+00	1,11E+01	9,09E+00
	E. faecalis	3,46E+01	2,83E+01	<LOD		<LOD	
	P. aeruginosa	2,31E+01	1,08E+01	<LOD		<LOD	
	K. pneumoniae	3,69E+03	3,01E+03	<LOD		<LOD	
	A. baumannii	3,57E+02	1,83E+02	2,83E+01	1,95E+01	1,11E+01	4,59E+00
	E. coli	4,37E+03	1,80E+03	2,54E+01	2,07E+01	<LOD	
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	4,55E+04	1,89E+04	4,52E+01	3,69E+01	1,69E+01	1,38E+01
	*intI*1	4,82E+05	2,99E+05	9,16E+02	6,82E+02	3,67E+02	2,05E+02
	*tet*M	1,65E+04	6,77E+03	3,24E+01	2,64E+01	<LOD	
	*bla*TEM	2,75E+04	2,01E+04	1,02E+04	8,27E+03	6,52E+03	5,29E+03
	*sul*1	1,52E+06	1,16E+06	1,46E+03	1,17E+03	6,37E+02	4,13E+02
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	1,61E+03	1,07E+03	<LOD		4,36E+00	3,56E+00
	*bla*CTX-M-32	4,54E+03	2,02E+03	5,73E+02	4,07E+02	4,80E+01	3,92E+01
	*bla*Oxa-48	4,33E+03	3,53E+03	<LOD		<LOD	
	*bla*CMY-2	1,89E+02	1,01E+02	<LOD		<LOD	
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	1,93E+03	1,57E+03	<LOD		<LOD	
	*van*A	<LOD		<LOD		<LOD	
	*mec*A	<LOD		<LOD		<LOD	
	mcr-1	<LOD		<LOD		<LOD	
	*bla*NDM	<LOD		<LOD		<LOD	

7.23 Koloniebildenden Einheiten nach einer sequenziellen Ozon/UV-Behandlung mit verlängerter Ozonkontaktzeit

Tabelle 45: Koloniebildende Einheiten (KBE)/100 mL von *E. coli*, intestinalen Enterokokken, *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. im Zulauf (Ablauf des Nachklärbeckens) und nach 30 bzw. 60 Min. Behandlung mit 1 g Ozon/g DOC mit und ohne nachfolgender UV-Bestrahlung mit 400 J/m².

KBE/100 mL		30 Min. Verweilzeit			60 Min. Verweilzeit		
		Zulauf	1 g Ozon/g DOC Kein UV	1 g Ozon/g DOC +400 J/m² UV	Zulauf	1 g Ozon/g DOC Kein UV	1 g Ozon/g DOC +400 J/m² UV
E. coli	Mittelwert	21667	10	1	51333	1	41
	minimal	14000	0	0	0	0	0
	maximal	27000	24	3	139000	3	122
Intestinale Enterokokken	Mittelwert	3931	8	1	1276	0	1
	minimal	2727	3	0	0	0	0
	maximal	5667	15	2	2427	0	3
Pseudomonas spp.	Mittelwert	23650	7	9	13833	2	11
	minimal	0	0	1	0	0	0
	maximal	61500	14	23	32500	7	34
Acinetobacter spp.	Mittelwert	47380	1	4	670	0	0
	minimal	47380	1	0	0	0	0
	maximal	47380	1	8	1340	0	0

7.24 Einzelwerte der Abundanzen an einzelnen Probenahmentagen

7.24.1 Abundanz an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene an den einzelnen Probenahmetagenen im Ablauf der Nachklärung an den untersuchten Kläranlagen

Tabelle 46: Einzelwerte der Abundanzen der ersten Probenahme an fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Zu-und Ablauf der sieben untersuchten Kläranlagen in Zelläquivalente/100 mL. LOD: Detektionslimit.

Probe-nahme1	Zelläquivalente /100 mL	ZK1	AK1	ZK2	AK2	ZK3	AK3	ZK4	AK4	ZK5	AK5	ZK6	AK6	ZK7	AK7
fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	1,49E+10	3,63E+08	4,68E+09	5,99E+08	1,73E+09	3,15E+08	3,87E+09	7,19E+08	4,87E+09	2,06E+08	5,21E+09	7,70E+08	3,89E+11	4,59E+10
	Enterokokken	2,64E+05	1,60E+03	2,80E+05	4,41E+03	5,35E+05	2,05E+03	7,77E+05	5,60E+03	2,28E+06	9,00E+03	1,30E+06	4,38E+03	5,44E+06	4,62E+04
	E. faecalis	1,87E+03	<LOD	1,06E+03	3,08E+01	6,73E+02	<LOD	6,50E+03	4,56E+01	1,64E+04	6,39E+01	1,93E+04	8,28E+01	6,98E+03	9,40E+01
	P. aeruginosa	3,63E+03	1,80E+02	2,00E+03	3,56E+02	4,18E+03	<LOD	3,25E+03	1,13E+03	5,93E+03	1,01E+02	1,45E+04	8,56E+02	1,49E+04	1,47E+03
	K. pneumoniae	5,42E+05	6,10E+03	6,24E+04	2,79E+03	1,71E+05	1,83E+03	2,94E+05	2,99E+03	2,05E+06	1,56E+04	1,01E+06	4,74E+03	4,93E+05	3,94E+04
	A. baumannii	2,82E+05	4,02E+02	1,41E+05	1,90E+03	2,14E+04	2,27E+02	1,80E+05	3,58E+02	1,50E+05	1,85E+02	1,33E+05	5,36E+02	2,49E+06	2,79E+03
	E. coli	3,69E+05	6,62E+03	3,93E+05	<LOD	1,29E+05	<LOD	1,07E+06	1,33E+04	1,54E+06	1,50E+04	1,14E+06	1,14E+04	3,31E+06	1,54E+05
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	8,87E+06	4,75E+04	1,62E+06	3,52E+04	7,56E+06	1,67E+05	1,27E+07	8,03E+04	2,65E+07	1,10E+05	1,68E+07	1,68E+05	1,80E+08	6,11E+05
	*intI*1	2,48E+07	2,00E+06	1,12E+07	2,24E+06	3,95E+07	6,96E+05	2,74E+07	4,99E+06	1,48E+07	9,90E+05	1,44E+07	3,96E+06	1,41E+08	8,32E+06
	*tet*M	1,05E+07	6,51E+04	6,06E+06	1,02E+05	1,43E+06	2,66E+04	1,18E+07	1,24E+06	3,91E+06	1,64E+05	8,54E+06	6,78E+04	2,38E+07	3,89E+05
	*bla*TEM	8,70E+06	2,65E+04	5,84E+06	5,21E+04	1,63E+06	1,26E+04	1,52E+07	1,92E+05	1,52E+07	8,26E+04	8,05E+06	3,03E+04	7,28E+07	1,58E+06
	*sul*1	1,74E+08	5,00E+06	6,98E+07	1,51E+07	9,61E+07	3,88E+06	1,61E+08	2,21E+07	8,51E+07	6,51E+06	1,02E+08	2,68E+07	4,63E+08	2,57E+07
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	8,99E+04	6,82E+02	1,58E+04	3,22E+02	1,88E+04	7,20E+01	5,44E+05	<LOD	6,48E+04	5,52E+02	<LOD	<LOD	1,13E+05	6,44E+03
	*bla*CTX-M-32	1,15E+06	1,14E+04	1,44E+05	4,58E+03	1,72E+05	1,20E+03	4,07E+06	7,93E+03	7,71E+05	5,57E+03	8,21E+04	2,39E+03	1,16E+06	6,76E+04
	*bla*Oxa-48	3,23E+05	3,28E+03	2,61E+07	1,23E+04	7,58E+04	<LOD	5,23E+04	<LOD	6,53E+04	2,73E+03	1,27E+05	9,16E+04	1,89E+05	1,55E+05
	*bla*CMY-2	1,04E+04	3,21E+02	4,76E+05	1,57E+03	3,57E+03	5,39E+01	1,37E+06	1,57E+04	2,68E+04	6,37E+02	2,02E+03	5,36E+02	1,69E+04	1,62E+03

Probe-nahme1	Zelläquivalente /100 mL	ZK1	AK1	ZK2	AK2	ZK3	AK3	ZK4	AK4	ZK5	AK5	ZK6	AK6	ZK7	AK7
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,96E+05	2,56E+04
	*van*A	1,09E+03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,50E+02	<LOD	<LOD	<LOD	6,35E+02	<LOD
	*mec*A	3,14E+02	2,36E+01	1,08E+02	<LOD	8,85E+01	<LOD	6,14E+02	<LOD	2,20E+03	<LOD	7,30E+02	<LOD	2,48E+03	6,80E+01
	mcr-1	2,72E+04	4,44E+02	1,64E+03	<LOD	2,51E+02	<LOD	2,49E+04	<LOD	4,96E+03	<LOD	<LOD	<LOD	1,01E+04	<LOD
	*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3,87E+02	<LOD	6,14E+02	<LOD	2,85E+02	<LOD	<LOD	<LOD	1,13E+03	<LOD

Tabelle 47: Einzelwerte der Abundanzen der zweiten Probenahme an fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Zu-und Ablauf der sieben untersuchten Kläranlagen. LOD: Detektionslimit.

Proben-nahme2	Zelläquivalente /100 mL	ZK1	AK1	ZK2	AK2	ZK3	AK3	ZK4	AK4	ZK5	AK5	ZK6	AK6	ZK7	AK7
fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit													2,35E+10	2,35E+10
	Enterokokken	7,59E+04	2,26E+02	5,56E+05	1,01E+03	3,24E+05	8,66E+03	6,36E+05	2,11E+03	3,16E+05	6,28E+03	3,62E+05	5,74E+03	2,49E+06	5,20E+01
	E. faecalis	9,97E+01	<LOD	5,67E+02	7,26E+00	3,56E+02	6,93E+00	8,38E+02	3,04E+01	1,18E+03	3,19E+01	1,39E+03	2,75E+01	9,59E+02	<LOD
	P. aeruginosa	3,61E+03	7,93E+01	1,47E+03	1,21E+03	7,32E+03	1,52E+02	1,51E+03	1,30E+03	1,36E+03	1,48E+02	4,64E+03	3,51E+02	9,96E+03	3,53E+01
	K. pneumoniae	1,07E+05	1,88E+03	9,14E+05	1,81E+05	6,42E+05	4,38E+04	2,38E+05	1,22E+04	2,08E+05	9,75E+03	4,92E+05	9,95E+03	9,42E+05	<LOD
	A. baumannii	1,16E+05	9,37E+01	3,28E+04	3,54E+02	2,33E+04	6,66E+02	1,21E+04	1,14E+02	2,62E+04	1,44E+02	2,53E+04	2,53E+03	1,85E+06	<LOD
	E. coli	2,05E+05	6,14E+03	3,26E+05	1,28E+05	3,29E+05	1,38E+04	4,29E+05	3,33E+04	1,95E+05	1,46E+04	1,77E+05	2,17E+04	7,71E+06	1,75E+02
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	2,05E+07	4,13E+04	3,89E+06	7,81E+04	1,31E+07	2,04E+05	1,22E+07	1,65E+04	5,97E+05	1,31E+04	1,71E+06	1,88E+04	6,81E+07	8,89E+02
	*intI*1	4,48E+07	8,90E+05	3,30E+07	2,78E+07	7,23E+07	1,57E+06	1,75E+07	3,80E+06	1,38E+06	1,17E+05	4,87E+05	1,46E+05	1,07E+08	2,26E+04
	*tet*M	1,00E+07	4,53E+04	1,64E+07	1,29E+05	6,10E+06	1,92E+05	7,66E+06	1,12E+05	4,49E+05	1,37E+04	8,91E+05	1,17E+04	8,79E+06	<LOD
	*bla*TEM	1,06E+07	2,98E+04	5,00E+07	1,11E+05	2,18E+07	1,25E+05	6,40E+06	8,55E+04	9,28E+05	2,12E+04	8,02E+05	3,65E+04	2,46E+08	8,27E+04
	*sul*1	2,28E+08	7,51E+06	1,80E+08	2,26E+08	2,02E+08	1,30E+07	9,17E+07	2,11E+07	1,02E+07	6,07E+05	2,69E+06	1,17E+06	4,06E+08	<LOD
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	7,53E+04	1,46E+03	5,01E+04	2,45E+02	3,80E+04	2,39E+03	8,26E+04	2,60E+04	8,84E+03	2,37E+02	1,41E+03	<LOD	6,09E+04	<LOD
	*bla*CTX-M-32	7,27E+05	8,18E+02	1,63E+05	2,52E+03	2,85E+05	6,23E+03	5,24E+05	6,23E+03	3,58E+04	1,09E+03	1,12E+04	2,62E+02	5,28E+06	1,83E+04
	*bla*Oxa-48	5,58E+05	7,63E+03	5,10E+06	1,54E+04	5,37E+05	4,56E+03	2,31E+05	1,25E+04	1,17E+04	3,88E+02	6,32E+03	1,58E+03	2,83E+05	2,45E+01
	*bla*CMY-2	1,11E+03	1,65E+01	4,89E+03	1,38E+02	1,53E+04	3,94E+02	1,21E+04	8,18E+02	3,06E+03	1,53E+02	1,79E+02	1,34E+01	1,80E+05	3,06E+01
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	8,22E+06	<LOD
	*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	8,23E+00	<LOD	<LOD	<LOD	5,82E+01	<LOD	<LOD	1,93E+01	1,76E+03	<LOD
	*mec*A	6,36E+02	6,57E+01	2,09E+03	6,66E+01	1,26E+03	2,36E+02	4,81E+01	1,82E+02	5,60E+01	1,62E+01	4,88E+01	<LOD	<LOD	<LOD
	mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,76E+04	<LOD
	*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,26E+03	9,22E+02	<LOD	<LOD	8,86E+01	<LOD	<LOD	<LOD	2,74E+03	<LOD

Tabelle 48: Einzelwerte der Abundanzen der dritten Probenahme an fakultativ pathogener Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen im Zu-und Ablauf der sieben untersuchten Kläranlagen. LOD: Detektionslimit.

Proben-nahme3	Zelläquivalente /100 mL	ZK1	AK1	ZK2	AK2	ZK3	AK3	ZK4	AK4	ZK5	AK5	ZK6	AK6	ZK7	AK7
fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit													9,17E+10	4,32E+08
	Enterokokken	2,64E+05	1,60E+03	2,80E+05	4,41E+03	5,35E+05	2,05E+03	7,77E+05	5,60E+03	2,28E+06	9,00E+03	1,30E+06	4,38E+03	1,10E+07	7,83E+03
	E. faecalis	1,87E+03	<LOD	1,06E+03	3,08E+01	6,73E+02	<LOD	6,50E+03	4,56E+01	1,64E+04	6,39E+01	1,93E+04	8,28E+01	3,41E+04	3,45E+01
	P. aeruginosa	3,63E+03	1,80E+02	2,00E+03	3,56E+02	4,18E+03	<LOD	3,25E+03	1,13E+03	5,93E+03	1,01E+02	1,45E+04	8,56E+02	1,41E+04	9,25E+01
	K. pneumoniae	5,42E+05	6,10E+03	6,24E+04	2,79E+03	1,71E+05	1,83E+03	2,94E+05	2,99E+03	2,05E+06	1,56E+04	1,01E+06	4,74E+03	3,70E+06	1,43E+04
	A. baumannii	2,82E+05	4,02E+02	1,41E+05	1,90E+03	2,14E+04	2,27E+02	1,80E+05	3,58E+02	1,50E+05	1,85E+02	1,33E+05	5,36E+02	1,32E+06	3,04E+03
	E. coli	3,69E+05	6,62E+03	3,93E+05	<LOD	1,29E+05	<LOD	1,07E+06	1,33E+04	1,54E+06	1,50E+04	1,14E+06	1,14E+04	1,11E+07	3,40E+04
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	8,75E+06	5,19E+04	3,51E+06	6,22E+04	1,56E+07	2,64E+05	5,32E+06	1,61E+05	2,15E+07	2,99E+04	9,22E+04	7,14E+04	2,65E+08	9,66E+04
	*intI*1	5,26E+07	1,48E+06	1,55E+07	9,82E+06	9,00E+07	1,12E+07	4,14E+07	6,64E+06	1,24E+08	1,46E+06	3,13E+07	1,19E+06	1,21E+08	2,00E+06
	*tet*M	1,05E+07	6,51E+04	6,06E+06	1,02E+05	1,43E+06	2,66E+04	1,18E+07	1,24E+06	3,91E+06	<LOD	8,54E+06	6,78E+04	5,03E+07	5,16E+04
	*bla*TEM	1,20E+07	5,87E+04	1,67E+07	1,35E+05	9,26E+06	2,55E+05	2,93E+06	9,97E+04	3,07E+07	1,38E+05	8,39E+03	2,03E+04	2,12E+08	2,98E+05
	*sul*1	1,74E+08	5,00E+06	6,98E+07	1,51E+07	9,61E+07	3,88E+06	1,61E+08	2,21E+07	8,51E+07	6,51E+06	1,02E+08	2,68E+07	2,70E+08	9,01E+06
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	2,98E+04	1,48E+03	2,63E+04	4,18E+03	3,54E+04	1,52E+04	8,80E+05	1,27E+04	1,42E+05	1,64E+03	7,08E+05	4,67E+03	3,04E+05	1,61E+03
	*bla*CTX-M-32	6,28E+04	8,20E+03	7,00E+06	2,13E+04	3,74E+04	2,45E+04	1,91E+04	1,56E+04	3,40E+05	9,10E+03	1,24E+06	2,25E+04	3,71E+06	1,17E+04
	*bla*Oxa-48	9,34E+05	7,34E+03	6,20E+05	1,99E+04	3,73E+05	2,82E+04	1,06E+07	2,73E+05	2,22E+06	8,52E+03	1,36E+07	8,80E+04	3,40E+03	1,67E+03
	*bla*CMY-2	1,04E+04	3,21E+02	4,76E+05	1,57E+03	3,57E+03	5,39E+01	1,37E+06	1,57E+04	2,68E+04	<LOD	2,02E+03	<LOD	2,05E+06	1,39E+04
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,31E+06	9,24E+03
	*van*A	1,09E+03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,50E+02	<LOD	<LOD	<LOD	1,98E+02	2,56E+00
	*mec*A	3,14E+02	2,36E+01	1,08E+02	<LOD	8,85E+01	<LOD	6,14E+02	<LOD	2,20E+03	<LOD	7,30E+02	<LOD	9,78E+03	1,73E+01
	mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,81E+04	<LOD
	*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6,14E+02	<LOD	2,85E+02	<LOD	<LOD	<LOD	1,22E+04	<LOD

7.24.2 Abundanzen der fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen an den einzelnen Probenahmetagenen nach den Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung

Tabelle 49: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung an den einzelnen Probenahmetagen. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Datum der Probenahme			
		20170217	20170509	20171023	20171127
fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	7,56E+09	2,22E+08	4,23E+08	4,64E+10
	Enterokokken	3,08E+04	3,56E+03	6,60E+03	9,18E+03
	E. faecalis	1,60E+02	<LOD	2,24E+01	<LOD
	P. aeruginosa	2,30E+02	5,08E+01	1,72E+02	1,06E+02
	K. pneumoniae	2,26E+04	1,90E+03	1,20E+04	<LOD
	A. baumannii	1,77E+03	2,13E+02	6,86E+02	1,87E+03
	E. coli	5,83E+04	7,40E+03	3,09E+04	1,50E+04
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	2,01E+05	2,85E+04	9,98E+04	2,33E+05
	*intI*1	2,23E+06	4,71E+05	1,65E+06	2,22E+06
	*tet*M	8,36E+04	1,06E+04	8,55E+04	6,01E+04
	*bla*TEM	4,86E+05	3,09E+04	3,15E+05	6,22E+05
	*sul*1	7,80E+06	1,40E+06	5,59E+06	5,21E+06
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	2,18E+03	2,14E+02	6,46E+02	1,09E+03
	*bla*CTX-M-32	2,03E+04	1,49E+03	8,82E+03	4,55E+04
	*bla*Oxa-48	2,94E+04	5,39E+02	<LOD	3,98E+03
	*bla*CMY-2	9,10E+02	1,86E+02	4,13E+03	1,82E+02
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	3,06E+04	2,53E+03	7,36E+03	5,82E+03
	*van*A	<LOD	<LOD	1,19E+00	1,14E+00
	*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	mcr-1	4,02E+02	2,47E+02	<LOD	<LOD
	*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	2,68E+02

Tabelle 50: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der Sandfiltration an den einzelnen Probenahmetagen. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Datum der Probenahme				
		20161026	20170217	20170509	20171023	20171127
fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	6,25E+08	4,02E+09	1,98E+07	2,33E+09	1,56E+10
	Enterokokken	1,79E+04	1,41E+04	3,24E+02	1,37E+04	6,21E+03
	E. faecalis	5,81E+01	1,13E+02	<LOD	5,15E+01	<LOD
	P. aeruginosa	<LOD	5,69E+02	4,30E+01	8,01E+01	<LOD
	K. pneumoniae	5,73E+03	7,63E+03	5,56E+02	2,25E+04	<LOD
	A. baumannii	5,32E+02	1,06E+03	4,14E+01	2,10E+03	1,81E+02
	E. coli	1,78E+04	2,15E+04	6,90E+02	3,95E+04	9,30E+03
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	1,20E+05	1,37E+05	1,03E+03	1,32E+05	5,60E+04
	*intI*1	1,48E+06	1,80E+06	5,04E+04	2,18E+06	1,12E+06
	*tet*M	5,35E+04	6,46E+04	5,88E+02	8,71E+04	2,10E+04
	*bla*TEM	2,89E+05	2,46E+06	4,23E+03	4,20E+05	2,74E+05
	*sul*1	6,12E+06	7,81E+06	1,02E+05	7,31E+06	2,32E+06
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	3,03E+03	2,29E+03	2,79E+01	1,19E+03	8,21E+02
	*bla*CTX-M-32	1,25E+04	3,49E+05	<LOD	1,14E+04	7,41E+03
	*bla*Oxa-48	8,45E+03	1,79E+04	<LOD	0,00E+00	<LOD
	*bla*CMY-2	2,73E+02	3,72E+03	4,33E+00	6,27E+03	8,41E+01
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	2,47E+03	3,39E+04	<LOD	7,51E+03	7,97E+02
	*van*A	9,29E+00	8,88E+01	<LOD	<LOD	1,19E+00
	*mec*A	2,01E+01	1,63E+02	<LOD	<LOD	7,55E+00
	mcr-1	8,07E+01	7,72E+02	<LOD	1,38E+02	4,81E+01
	*bla*NDM	8,52E+01	<LOD	<LOD	8,58E+01	1,00E+00

Tabelle 51: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der UV-Behandlung an den einzelnen Probenahmetagen. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Datum der Probenahme			
		20170217	20170509	20171023	20171127
fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	8,14E+08	1,18E+08	6,96E+08	3,13E+08
	Enterokokken	2,94E+04	2,93E+03	4,11E+03	5,80E+03
	E. faecalis	9,41E+01	<LOD	<LOD	<LOD
	P. aeruginosa	1,29E+02	4,48E+01	1,57E+02	5,59E+02
	K. pneumoniae	2,47E+04	4,46E+03	1,36E+04	<LOD
	A. baumannii	1,04E+03	3,81E+02	1,56E+03	4,20E+02
	E. coli	4,02E+04	1,07E+04	3,01E+04	1,34E+04
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	3,58E+05	1,42E+04	4,92E+04	1,32E+05
	*intI*1	2,85E+06	3,06E+05	1,72E+06	3,18E+06
	*tet*M	1,52E+05	8,05E+03	2,71E+04	3,14E+04
	*bla*TEM	9,88E+05	1,68E+05	2,00E+05	2,69E+06
	*sul*1	1,06E+07	7,17E+05	6,05E+06	7,79E+06
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	1,72E+03	5,05E+02	5,82E+02	3,61E+02
	*bla*CTX-M-32	7,63E+04	4,63E+04	8,40E+03	2,09E+04
	*bla*Oxa-48	3,42E+04	9,67E+02	<LOD	2,80E+03
	*bla*CMY-2	1,39E+03	1,11E+02	<LOD	1,06E+02
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	4,60E+04	1,99E+03	3,18E+03	1,73E+03
	*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*mec*A	4,81E+01	<LOD	1,07E+02	<LOD
	mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tabelle 52: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der Ozonbehandlung an den einzelnen Probenahmetagen. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Datum der Probenahmen			
		20170217	20170509	20171023	20171127
fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	5,71E+07	3,91E+06	3,06E+06	3,60E+06
	Enterokokken	1,32E+02	3,12E+01	4,25E+02	8,62E+00
	E. faecalis	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	P. aeruginosa	1,60E+03	2,44E+01	2,25E+01	3,30E+01
	K. pneumoniae	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	A. baumannii	<LOD	<LOD	7,43E+00	<LOD
	E. coli	2,32E+04	1,42E+02	8,41E+01	4,66E+01
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	2,77E+03	1,13E+03	3,79E+03	4,90E+02
	*intI*1	4,00E+04	2,31E+04	6,39E+03	2,57E+04
	*tet*M	7,87E+02	1,97E+02	2,14E+02	2,22E+02
	*bla*TEM	2,14E+04	3,41E+04	4,90E+03	7,61E+03
	*sul*1	1,13E+05	6,11E+04	1,73E+04	<LOD
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*CTX-M-32	5,03E+03	8,35E+03	5,21E+02	3,03E+02
	*bla*Oxa-48	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*CMY-2	4,90E+01	<LOD	<LOD	<LOD
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*mec*A	<LOD	<LOD	8,29E+00	<LOD
	mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tabelle 53: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der Ultrafiltration 1 an den einzelnen Probenahmetagen. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Datum der Probenahmen			
		20170217	20170509	20171023	20171127
fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	6,38E+03	6,06E+02	1,00E+01	2,10E+03
	Enterokokken	9,75E-01	<LOD	1,41E-01	<LOD
	E. faecalis	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	P. aeruginosa	<LOD	1,44E+00	<LOD	<LOD
	K. pneumoniae	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	A. baumannii	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E. coli	1,10E+00	2,21E+00	<LOD	<LOD
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	6,02E+00	<LOD	<LOD	<LOD
	*intI*1	<LOD	<LOD	2,22E+00	<LOD
	*tet*M	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*TEM	1,96E+01	4,37E+01	<LOD	<LOD
	*sul*1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*CTX-M-32	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*Oxa-48	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*CMY-2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	<LOD	<LOD	2,89E+00	<LOD
	*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tabelle 54: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der Ultrafiltration 2 an den einzelnen Probenahmetagen. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Datum der Probenahme			
		20170217	20170509	20171023	20171127
fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	3,23E+03	1,41E+04	2,46E+05	2,96E+04
	Enterokokken	<LOD	5,24E-01	4,00E+00	<LOD
	E. faecalis	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	P. aeruginosa	<LOD	2,91E+00	<LOD	<LOD
	K. pneumoniae	<LOD	<LOD	2,94E+00	<LOD
	A. baumannii	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E. coli	<LOD	4,91E+00	1,23E+00	<LOD
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	<LOD	<LOD	2,30E+00	<LOD
	*intI*1	<LOD	9,73E+01	4,95E+01	3,76E+01
	*tet*M	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*TEM	3,10E+01	2,81E+01	<LOD	<LOD
	*sul*1	<LOD	5,75E+01	1,56E+04	1,01E+02
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*CTX-M-32	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*Oxa-48	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*CMY-2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	<LOD	<LOD	3,76E+00	<LOD
	*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tabelle 55: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der sequentiellen Behandlung mit Ozon und UV an den einzelnen Probenahmetagen. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL		Datum der Probenahme			
		20170217	20170509	20171023	20171127
fakultativ pathogene Bakterien	Gesamtheit	3,49E+07	2,95E+06	2,06E+06	1,42E+06
	Enterokokken	7,07E+03	1,79E+01	1,08E+02	<LOD
	E. faecalis	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	P. aeruginosa	<LOD	2,39E+01	<LOD	<LOD
	K. pneumoniae	1,46E+02	3,54E+01	<LOD	<LOD
	A. baumannii	5,77E+02	0,00E+00	<LOD	6,95E+00
	E. coli	3,13E+02	7,04E+01	3,33E+01	<LOD
häufig vorkommende Resistenzgene	*erm*B	4,14E+04	7,95E+02	9,77E+02	2,15E+02
	*intI*1	5,06E+04	7,39E+03	9,12E+02	2,26E+04
	*tet*M	3,65E+03	1,88E+02	7,58E+01	7,09E+01
	*bla*TEM	9,30E+03	1,30E+03	2,79E+03	-
	*sul*1	1,63E+05	1,44E+04	1,83E+03	1,04E+05
intermediär vorkommende Resistenzgene	*bla*CTX-M	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*CTX-M-32	6,27E+02	<LOD	2,25E+02	<LOD
	*bla*Oxa-48	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*CMY-2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
selten vorkommende Resistenzgene	*bla*VIM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

7.24.3 Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen an den einzelnen Probenahmetagenen nach der Erhöhung der Ozonkonzentration und UV-Dosis bei der Verwendung des Ablaufs des Nachklärbeckens als Zulauf

Tabelle 56: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der sequentiellen Behandlung mit unterschiedlichen Ozonkonzentrationen und UV-Dosen bei der ersten Probenahme. Als Zulauf wurde der Ablauf des Nachklärbeckens verwendet. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL	Zulaufreferenz von 1,5 g Ozon/g DOC	1,5 g Ozon/g DOC	1,5 g Ozon/g DOC + 400 J/m² UV	1,5 g Ozon/g DOC+ 600 J/m² UV	Zulaufreferenz von 2 g Ozon/g DOC	2 g Ozon/g DOC	2 g Ozon/g DOC + 400 J/m² UV	2 g Ozon/g DOC + 600 J/m² UV
Gesamtheit	5,68E+08	7,79E+06	3,91E+06	5,46E+06	7,55E+07	4,74E+06	1,93E+06	1,12E+06
Enterokokken	2,16E+04	<LOD	<LOD	<LOD	2,41E+04	5,51E+01	1,73E+01	6,97E+00
E. faecalis	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5,36E+01	<LOD	<LOD	<LOD
P. aeruginosa	3,08E+01	<LOD	<LOD	<LOD	5,50E+01	<LOD	<LOD	<LOD
K. pneumoniae	3,93E+04	<LOD	<LOD	<LOD	5,28E+04	<LOD	<LOD	<LOD
A. baumannii	8,37E+02	<LOD	<LOD	<LOD	1,08E+03	<LOD	<LOD	<LOD
E. coli	1,45E+04	3,29E+02	4,27E+01	1,71E+02	2,25E+04	1,13E+02	<LOD	5,46E+01
*erm*B	9,76E+03	2,28E+02	3,83E+01	8,22E+01	1,02E+04	5,36E+02	1,86E+02	1,24E+02
*intI*1	1,29E+06	1,56E+04	6,63E+03	1,14E+04	1,56E+06	1,04E+04	5,98E+03	1,99E+03
*tet*M	2,22E+04	3,05E+02	2,46E+02	1,92E+02	3,08E+04	4,28E+02	4,98E+02	1,85E+02
*bla*TEM	1,12E+05	6,74E+04	6,45E+04	8,28E+04	1,59E+05	7,54E+04	6,29E+04	5,32E+04
*sul*1	5,27E+06	2,80E+04	1,67E+04	1,65E+04	6,17E+06	2,12E+04	9,52E+03	8,99E+03
*bla*CTX-M	8,69E+02	<LOD	<LOD	<LOD	1,69E+03	1,53E+01	<LOD	<LOD
*bla*CTX-M-32	9,62E+03	9,32E+02	1,34E+03	1,21E+03	1,54E+04	4,84E+02	4,09E+02	1,15E+03
*bla*Oxa-48	0,00E+00	<LOD	<LOD	<LOD	1,81E+03	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*CMY-2	6,28E+02	<LOD	<LOD	<LOD	7,58E+02	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*VIM	3,96E+03	<LOD	<LOD	<LOD	6,24E+03	<LOD	<LOD	<LOD
*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tabelle 57: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der sequentiellen Behandlung mit unterschiedlichen Ozonkonzentrationen und UV-Dosen bei der zweiten Probenahme. Als Zulauf wurde der Ablauf des Nachklärbeckens verwendet. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL	Zulaufreferenz von 1,5 g Ozon/g DOC	1,5 g Ozon/g DOC	1,5 g Ozon/g DOC + 400 J/m² UV	1,5 g Ozon/g DOC+ 600 J/m² UV	Zulaufreferenz von 2 g Ozon/g DOC	2 g Ozon/g DOC	2 g Ozon/g DOC + 400 J/m² UV	2 g Ozon/g DOC + 600 J/m² UV
Gesamtheit	1,15E+08	4,63E+06	8,83E+05	7,09E+05	1,32E+09	1,03E+06	1,08E+06	1,81E+06
Enterokokken	1,55E+03	2,15E+01	5,19E+01	5,89E+02	1,69E+03	4,08E+01	0,00E+00	4,71E+02
E. faecalis	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P. aeruginosa	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,65E+02	<LOD	<LOD	<LOD
K. pneumoniae	1,20E+03	<LOD	<LOD	<LOD	3,99E+03	<LOD	<LOD	<LOD
A. baumannii	9,99E+01	5,30E+01	<LOD	<LOD	4,57E+02	<LOD	<LOD	<LOD
E. coli	4,78E+03	7,21E+01	1,96E+02	1,13E+02	2,07E+04	5,42E+02	<LOD	3,90E+01
*erm*B	6,15E+03	3,85E+02	1,76E+02	1,70E+03	4,27E+04	4,33E+01	<LOD	2,15E+03
*intI*1	1,36E+05	4,51E+03	3,13E+03	2,13E+03	1,22E+06	1,23E+03	1,96E+03	1,75E+04
*tet*M	5,89E+03	2,81E+02	9,58E+01	9,87E+01	4,44E+04	1,05E+02	1,70E+02	2,57E+02
*bla*TEM	1,66E+04	<LOD	<LOD	0,00E+00	1,06E+05	<LOD	<LOD	<LOD
*sul*1	5,82E+05	2,64E+04	7,38E+03	3,81E+03	5,57E+06	2,18E+03	2,22E+03	1,13E+04
*bla*CTX-M	5,57E+01	<LOD	<LOD	1,11E+01	3,93E+02	5,23E+01	<LOD	<LOD
*bla*CTX-M-32	1,45E+03	3,07E+02	4,57E+02	6,60E+02	5,22E+03	2,97E+02	3,33E+02	1,24E+02
*bla*Oxa-48	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*CMY-2	1,07E+02	<LOD	<LOD	<LOD	3,99E+02	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*VIM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,74E+02	6,89E+01	<LOD	<LOD
mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3,40E+02	<LOD	<LOD	<LOD

Tabelle 58: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der sequentiellen Behandlung mit unterschiedlichen Ozonkonzentrationen und UV-Dosen bei der dritten Probenahme. Als Zulauf wurde der Ablauf des Nachklärbeckens verwendet. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL	Zulaufreferenz von 1,5 g Ozon/g DOC	1,5 g Ozon/g DOC	1,5 g Ozon/g DOC + 400 J/m² UV	1,5 g Ozon/g DOC+ 600 J/m² UV	Zulaufreferenz von 2 g Ozon/g DOC	2 g Ozon/g DOC	2 g Ozon/g DOC + 400 J/m² UV	2 g Ozon/g DOC + 600 J/m² UV
Gesamtheit	1,28E+09	4,38E+06	2,61E+06	7,42E+06	1,46E+09	1,95E+07	3,79E+06	3,69E+06
Enterokokken	1,42E+04	5,30E+01	5,66E+01	7,76E+01	3,48E+04	2,66E+02	2,78E+01	3,22E+01
E. faecalis	2,70E+01	<LOD	<LOD	<LOD	5,99E+01	<LOD	<LOD	<LOD
P. aeruginosa	2,67E+01	<LOD	<LOD	<LOD	2,44E+02	5,88E+02	7,14E+02	2,35E+01
K. pneumoniae	4,44E+04	4,73E+02	3,16E+02	4,89E+02	1,17E+05	7,14E+02	<LOD	<LOD
A. baumannii	7,25E+02	2,31E+02	1,39E+02	2,00E+02	3,13E+03	1,06E+02	1,05E+02	6,93E+01
E. coli	4,07E+04	1,29E+03	1,97E+02	1,93E+02	8,36E+04	4,94E+02	3,45E+02	<LOD
*erm*B	9,40E+04	2,54E+02	2,78E+02	9,03E+02	1,90E+05	1,95E+03	7,97E+02	4,40E+02
*intI*1	1,87E+06	1,66E+04	5,28E+03	1,63E+04	2,15E+06	4,68E+04	1,41E+04	6,40E+03
*tet*M	5,47E+04	2,00E+02	2,30E+02	2,95E+02	7,59E+04	2,31E+02	1,20E+02	2,61E+02
*bla*TEM	1,77E+05	8,68E+04	6,34E+04	<LOD	1,52E+07	7,28E+05	9,82E+05	1,06E+05
*sul*1	5,43E+06	3,09E+04	7,57E+03	3,92E+04	5,79E+06	1,21E+05	2,82E+04	1,15E+04
*bla*CTX-M	1,82E+03	9,11E+02	1,70E+02	1,72E+02	3,37E+03	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*CTX-M-32	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5,73E+02	5,43E+02	3,21E+02
*bla*Oxa-48	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,60E+02	<LOD	<LOD
*bla*CMY-2	9,76E+02	<LOD	<LOD	<LOD	1,52E+03	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*VIM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

7.24.4 Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen an den einzelnen Probenahmetagenen nach der Erhöhung der Ozonkonzentration und UV-Dosis bei der Verwendung des Ablaufes des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung als Zulauf

Tabelle 59: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der sequenziellen Behandlung mit unterschiedlichen Ozonkonzentrationen und UV-Dosen bei der ersten Probenahme. Als Zulauf wurde der Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung verwendet. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL	Zulaufreferenz von 1,5 g Ozon/g DOC	1,5 g Ozon/g DOC	1,5 g Ozon/g DOC + 400 J/m² UV	1,5 g Ozon/g DOC+ 600 J/m² UV	Zulaufreferenz von 2 g Ozon/g DOC	2 g Ozon/g DOC	2 g Ozon/g DOC + 400 J/m² UV	2 g Ozon/g DOC + 600 J/m² UV
Gesamtheit	6,61E+08	2,42E+05	3,81E+05	2,75E+05	3,64E+08	2,37E+05	3,10E+05	3,69E+05
Enterokokken	1,46E+03	<LOD	<LOD	<LOD	1,81E+03	<LOD	<LOD	<LOD
E. faecalis	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P. aeruginosa	8,62E+01	<LOD	<LOD	<LOD	3,16E+01	<LOD	<LOD	<LOD
K. pneumoniae	3,60E+03	<LOD	<LOD	<LOD	5,50E+03	<LOD	<LOD	<LOD
A. baumannii	3,18E+02	<LOD	1,52E+02	<LOD	3,69E+02	1,15E+01	1,06E+01	6,65E+00
E. coli	8,30E+03	<LOD	0,00E+00	<LOD	1,16E+04	<LOD	<LOD	<LOD
*erm*B	1,41E+04	2,52E+01	6,64E+01	1,65E+01	1,27E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
*intI*1	3,61E+05	6,79E+02	1,08E+03	4,20E+02	2,70E+05	5,89E+02	5,70E+02	6,66E+02
*tet*M	5,75E+03	<LOD	<LOD	<LOD	4,14E+03	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*TEM	4,42E+04	2,40E+04	2,37E+04	1,76E+04	7,91E+04	2,36E+04	3,19E+04	2,31E+04
*sul*1	1,26E+06	9,80E+02	1,34E+03	1,58E+03	7,56E+05	9,06E+02	2,50E+03	1,25E+03
*bla*CTX-M	6,85E+02	4,34E+01	6,03E+01	0,00E+00	1,27E+03	2,15E+01	2,33E+01	<LOD
*bla*CTX-M-32	3,98E+03	5,06E+02	5,94E+02	4,66E+02	8,58E+03	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*Oxa-48	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*CMY-2	1,07E+02	<LOD	<LOD	<LOD	2,20E+02	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*VIM	7,63E+02	<LOD	<LOD	<LOD	5,74E+02	<LOD	<LOD	<LOD
*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
mcr-1	3,48E+01	<LOD	<LOD	<LOD	3,98E+01	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tabelle 60: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der sequenziellen Behandlung mit unterschiedlichen Ozonkonzentrationen und UV-Dosen bei der zweiten Probenahme. Als Zulauf wurde der Ablauf des Sedimentationsbeckens der Aktivkohlebehandlung verwendet. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL	Zulaufreferenz von 1,5 g Ozon/g DOC	1,5 g Ozon/g DOC	1,5 g Ozon/g DOC + 400 J/m² UV	1,5 g Ozon/g DOC+ 600 J/m² UV	Zulaufreferenz von 2 g Ozon/g DOC	2 g Ozon/g DOC	2 g Ozon/g DOC + 400 J/m² UV	2 g Ozon/g DOC + 600 J/m² UV
Gesamtheit	3,28E+08	2,85E+05	4,55E+05	3,31E+05	3,23E+08	9,07E+05	1,04E+06	5,87E+05
Enterokokken	4,75E+03	<LOD	<LOD	<LOD	6,45E+04	<LOD	<LOD	<LOD
E. faecalis	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P. aeruginosa	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K. pneumoniae	2,34E+04	<LOD	<LOD	<LOD	4,30E+04	<LOD	<LOD	<LOD
A. baumannii	8,39E+01	<LOD	<LOD	<LOD	9,13E+02	<LOD	<LOD	<LOD
E. coli	1,08E+04	<LOD	<LOD	<LOD	5,72E+04	<LOD	<LOD	<LOD
*erm*B	5,24E+03	<LOD	1,39E+02	<LOD	8,01E+04	<LOD	<LOD	<LOD
*intI*1	2,06E+06	6,62E+02	2,39E+03	1,18E+03	2,74E+06	1,46E+03	9,76E+02	1,47E+03
*tet*M	8,12E+03	<LOD	<LOD	<LOD	1,12E+04	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*TEM	6,53E+04	4,32E+03	1,60E+03	4,52E+03	1,83E+05	<LOD	3,91E+03	2,28E+03
*sul*1	2,65E+06	1,27E+03	2,57E+03	6,33E+02	3,70E+06	2,33E+03	1,14E+03	<LOD
*bla*CTX-M	2,22E+03	<LOD	<LOD	<LOD	5,98E+03	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*CTX-M-32	1,06E+04	<LOD	<LOD	<LOD	2,70E+04	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*Oxa-48	2,93E+02	<LOD	<LOD	<LOD	1,24E+04	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*CMY-2	6,15E+02	<LOD	<LOD	<LOD	5,27E+02	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*VIM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
mcr-1	6,18E+02	<LOD	<LOD	<LOD	7,45E+02	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

7.24.5 Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen an den einzelnen Probenahmetagenen nach der Verlängerung der hydraulischen Verweilzeit der Ozonung

Tabelle 61: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der kombinierten Behandlung mit unterschiedlichen Ozonkontaktzeiten bei der ersten Probenahme. Als Zulauf wurde der Ablauf des Nachklärbeckens verwendet. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL	Zulaufreferenz von 30 Min. Kontaktzeit	30 Min. 1 g Ozon/g DOC	30 Min. 1 g Ozon/g DOC+ 400 J/m² UV	Zulaufreferenz von 60 Min. Kontaktzeit	60 Min. 1 g Ozon/g DOC	60 Min. 1 g Ozon/g DOC+ 400 J/m² UV
Gesamtheit	2,23E+08	1,20E+07	2,92E+06	3,60E+08	6,94E+05	4,16E+05
Enterokokken	5,06E+03	6,06E+01	1,51E+01	1,51E+04	1,08E+01	3,34E+01
E. faecalis	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P. aeruginosa	8,75E+00	<LOD	<LOD	2,35E+01	<LOD	<LOD
K. pneumoniae	7,44E+03	5,57E+02	<LOD	1,11E+04	<LOD	<LOD
A. baumannii	6,56E+02	1,64E+02	3,20E+01	7,71E+02	7,57E+01	1,51E+01
E. coli	4,03E+03	3,85E+02	6,17E+01	7,05E+03	<LOD	<LOD
*erm*B	3,78E+04	1,05E+03	6,65E+02	6,11E+04	1,36E+02	5,07E+01
*intI*1	6,37E+05	1,68E+04	5,31E+03	1,20E+06	2,58E+03	8,47E+02
*tet*M	1,98E+04	4,92E+02	1,64E+02	2,33E+04	9,71E+01	<LOD
*bla*TEM	4,19E+04	6,55E+04	2,53E+04	7,65E+04	3,05E+04	1,95E+04
*sul*1	3,24E+06	4,12E+04	1,20E+04	4,35E+06	4,31E+03	1,64E+03
*bla*CTX-M	3,06E+02	9,41E+01	<LOD	6,34E+02	<LOD	1,31E+01
*bla*CTX-M-32	3,48E+03	1,34E+03	2,31E+02	5,11E+03	1,53E+02	1,44E+02
*bla*Oxa-48	1,89E+02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*CMY-2	2,08E+02	<LOD	<LOD	4,22E+02	<LOD	<LOD
*bla*VIM	1,53E+03	<LOD	<LOD	5,79E+03	<LOD	<LOD
*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*mec*A	<LOD	8,14E+01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tabelle 62: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der kombinierten Behandlung mit unterschiedlichen Ozonkontaktzeiten bei der zweiten Probenahme. Als Zulauf wurde der Ablauf des Nachklärbeckens verwendet. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL	Zulaufreferenz von 30 Min. Kontaktzeit	30 Min. 1 g Ozon/g DOC	30 Min. 1 g Ozon/g DOC+ 400 J/m² UV	Zulaufreferenz von 60 Min. Kontaktzeit	60 Min. 1 g Ozon/g DOC	60 Min. 1 g Ozon/g DOC+ 400 J/m² UV
Gesamtheit	1,69E+08	1,89E+06	2,23E+06	1,92E+08	2,24E+05	6,04E+05
Enterokokken	4,35E+03	4,52E+02	1,98E+01	1,54E+04	<LOD	<LOD
E. faecalis	<LOD	<LOD	<LOD	1,04E+02	<LOD	<LOD
P. aeruginosa	1,22E+02	3,03E+01	<LOD	4,57E+01	<LOD	<LOD
K. pneumoniae	<LOD	<LOD	<LOD	0,00E+00	<LOD	<LOD
A. baumannii	2,29E+02	3,73E+01	1,22E+01	2,98E+02	9,24E+00	1,82E+01
E. coli	5,99E+03	4,90E+01	5,52E+01	6,07E+03	7,62E+01	<LOD
*erm*B	4,48E+04	2,28E+03	4,75E+02	7,54E+04	<LOD	<LOD
*intI*1	1,29E+05	2,42E+03	1,54E+03	2,44E+05	1,63E+02	2,53E+02
*tet*M	1,52E+04	1,65E+02	9,87E+01	2,62E+04	<LOD	<LOD
*bla*TEM	8,99E+03	9,82E+02	1,40E+02	5,94E+03	1,88E+02	6,56E+01
*sul*1	1,45E+05	1,32E+03	1,15E+03	2,16E+05	5,45E+01	2,75E+02
*bla*CTX-M	2,58E+03	<LOD	<LOD	4,21E+03	<LOD	<LOD
*bla*CTX-M-32	8,82E+03	4,52E+03	2,53E+02	8,51E+03	1,56E+03	<LOD
*bla*Oxa-48	6,90E+03	<LOD	<LOD	1,30E+04	<LOD	<LOD
*bla*CMY-2	2,94E+02	<LOD	<LOD	1,44E+02	<LOD	<LOD
*bla*VIM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tabelle 63: Abundanzen an fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgene in Zelläquivalente/100 mL im Ablauf der kombinierten Behandlung mit unterschiedlichen Ozonkontaktzeiten bei der dritten Probenahme. Als Zulauf wurde der Ablauf des Nachklärbeckens verwendet. LOD: Detektionslimit.

Zelläquivalente/100 mL	Zulaufreferenz von 30 Min. Kontaktzeit	30 Min. 1 g Ozon/g DOC	30 Min. 1 g Ozon/g DOC+ 400 J/m² UV	Zulaufreferenz von 60 Min. Kontaktzeit	60 Min. 1 g Ozon/g DOC	60 Min. 1 g Ozon/g DOC+ 400 J/m² UV
Gesamtheit	3,89E+09	2,91E+08	6,77E+07	<LOD	<LOD	<LOD
Enterokokken	1,32E+04	7,82E+02	1,42E+02	<LOD	<LOD	<LOD
E. faecalis	4,64E+01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P. aeruginosa	3,71E+03	1,50E+02	4,82E+01	<LOD	<LOD	<LOD
K. pneumoniae	2,49E+04	2,58E+04	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
A. baumannii	1,37E+03	1,70E+03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
E. coli	4,67E+04	4,44E+03	5,67E+02	<LOD	<LOD	<LOD
*erm*B	1,74E+05	1,68E+04	2,84E+03	<LOD	<LOD	<LOD
*intI*1	5,03E+06	1,03E+06	1,35E+05	<LOD	<LOD	<LOD
*tet*M	6,52E+04	1,45E+03	1,06E+03	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*TEM	9,10E+06	4,86E+06	1,27E+05	<LOD	<LOD	<LOD
*sul*1	1,30E+07	1,85E+06	4,26E+05	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*CTX-M	6,24E+03	3,82E+02	0,00E+00	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*CTX-M-32	5,01E+04	1,49E+03	0,00E+00	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*Oxa-48	1,85E+03	1,73E+03	0,00E+00	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*CMY-2	1,56E+03	1,86E+02	0,00E+00	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*VIM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*van*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*mec*A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
mcr-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
*bla*NDM	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Zum Autor:

Herr Norman Hembach wurde 1988 in Lindlar geboren. Nach dem Erhalt der allgemeinen Hochschulreife am erzbischöflichen St.-Angela-Gymnasium in Wipperfürth begann er 2010 sein Studium der Biotechnologie an der Hochschule in Mannheim und erhielt 2016 seinen Master of Science in Biotechnologie mit dem Schwerpunkt Bioprocess Development. Seit 2016 ist er als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), am Institut für funktionelle Grenzflächen (IFG), in der Abteilung der Mikrobiologie/ Molekularbiologie unter Prof. Dr. Schwartz tätig. Im Zuge dieser Beschäftigung betreut er das BMBF-Projekt: „HyReKA - Biologische bzw. hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern“. Im Rahmen dieser Projektarbeit wurde diese Dissertation verfasst und 2021 an der Technischen Universität in Darmstadt erfolgreich verteidigt.

Zum Inhalt:

Antibiotikaresistente und fakultativ pathogene Bakterien stellen eine wachsende Gefahr für die öffentliche Gesundheit und Umwelt dar. Als letzte gemeinsame Barriere der unterschiedlichen Emissionsquellen, wie Abwässer aus Krankenhäusern, Pflegeheimen, Schlachtbetrieben, privaten Haushalten etc., ist die Kläranlage ein geeigneter Ort, um die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzgenen und fakultativ pathogenen Bakterien in die Umwelt zentral zu minimieren. Da trotz bestehender gesundheitlicher Risiken durch die bisherige Gesetzgebung keine allgemeinen und übergreifenden Regelungen für die Reduktion von fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen durch die Kläranlagen existieren, sind die einzelnen Prozesse sowie die Betriebsweise existierender Kläranlagen nicht auf deren Rückhalt ausgelegt. Die amerikanische National Blue Ribbon Commission schlägt aus diesem Grund eine minimal zu erreichende Reduktion von 6 Log Stufen durch den gesamten Klärprozess vor. Vor diesem Hintergrund wird in dieser Arbeit im Ablauf von sieben Kläranlagen die Abundanz an 6 unterschiedlichen, an die Gruppe angelehnten, fakultativ pathogenen Bakterien (Enterokokken, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii und Escherichia coli) sowie einer Auswahl von 14 Antibiotikaresistenzgenen mit unterschiedlicher gesundheitlicher Relevanz ermittelt. Es werden Resistenzen gegen veterinär genutzte Antibiotika, Resistenzen gegen Breitbandantibiotika, sowie aus hygienischer Sicht kritische Resistenzen gegen Reserveantibiotika unterschiedlicher Wirkungsklassen untersucht. Hierfür wurden neben der Methode der qPCR auch kulturbasierte Experimente sowie Metagenom Analysen und Isolate Charakterisierungen durchgeführt.

ISBN 978-3-940897-67-1