

Erftverband, Bergheim
und
Institut für Hygiene und Public Health des Universitätsklinikums Bonn

Abschlussbericht zum Forschungsprojekt

Antibiotika und Antibiotikaresistenzen im Abwasser (ARA)

-

Untersuchung des regionalen Beitrags klinischer
Abwässer zur Belastung der aquatischen Umwelt und
Praxiserprobung innovativer Verfahren der
weitergehenden Abwasserbehandlung

2020-2023

gefördert durch das

Ministerium für Umwelt,
Naturschutz und Verkehr
des Landes Nordrhein-Westfalen



Bearbeitung:

Alexander Ahring, M.Sc.	Erftverband
Dr. Nicole Zacharias	IHPH
David Seiger, M.Eng.	Erftverband
Carina Luchtefeld, M.Sc.	IHPH
Sarah Maria Essert, M.Sc.	IHPH
Anna Marxer, M.Sc.	IHPH
Dr. Christian Gattke	Stadtentwässerungsbetriebe Köln, ehemals Erftverband
Dr. Tilo Keller	Erftverband
Prof. Dr. Thomas Kistemann	IHPH

Unter Mitarbeit von:

Luk Beyerle	Erftverband
Christoph Brepols	Erftverband
Martin Reif	Erftverband
Robert Krump	Erftverband
Osman Altunay	Erftverband
Natalie Tesch	Erftverband
Jan Faßbender	Erftverband
Felix Droop	IHPH
Lia Freier	IHPH
Regina Brang-Lamprecht	IHPH
Kira Kirchhoff	IHPH
Jana Glowka	IHPH

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	i
Abbildungsverzeichnis.....	ii
Tabellenverzeichnis.....	v
Zusammenfassung.....	vi
Abstract.....	viii
1. Einleitung.....	1
1.1 Antibiotika und Resistenzen.....	1
1.2 Abwasser als Eintragspfad in die Umwelt.....	3
1.3 Projektziele.....	5
2. Material und Methoden.....	8
2.1 Überblick über die Monitoring-Programme.....	8
2.1.1 Klinikabwasser.....	9
2.1.2 Maßnahmenernerprobung.....	11
2.2 Probenahme und Analysemethoden.....	14
2.2.1 Allgemeines.....	14
2.2.2 Probenahme.....	14
2.2.3 Chemische Parameter.....	16
2.2.4 Mikro- und molekularbiologische Parameter.....	17
2.2.5 Datenauswertung und Ergebnisdarstellung.....	24
3. Ergebnisse.....	26
3.1 Limitationen des kulturellen Nachweises von Antibiotika-resistenten Bakterien.....	26
3.2 Kontrollversuche.....	29
3.3 Klinikabwasser.....	32
3.3.1 Antibiotika.....	32
3.3.2 Indikatororganismen.....	37
3.3.3 Antibiotika-resistente Bakterien.....	38
3.3.4 Antibiotikaresistenzgene.....	40
3.4 Kläranlagen mit Membranbelebungsanlagen.....	42
3.4.1 Antibiotika.....	42
3.4.2 Indikatororganismen.....	45
3.4.3 Antibiotika-resistente Bakterien.....	47
3.4.4 Antibiotikaresistenzgene.....	48
3.5 RBF+ in Rheinbach.....	50
3.5.1 Antibiotika.....	50
3.5.2 Indikatororganismen.....	53

3.5.3	Antibiotika-resistente Bakterien.....	56
3.5.4	Antibiotikaresistenzgene.....	59
4.	Synoptische Bewertung und Einordnung der Ergebnisse	61
4.1	Krankenhausabwasser	61
4.2	Multiresistente Bakterien in klinisch beeinflusstem und nicht klinisch beeinflusstem Abwasser.....	67
4.3	Reduktionsleistungen der Behandlungsverfahren.....	71
4.3.1	Reduktionsleistungen der Behandlungsverfahren.....	71
4.3.2	Bewertung der Resistenzselektion der untersuchten Kläranlagen anhand der untersuchten Antibiotikaresistenzgene	77
4.4	Kosten-Nutzen-Analyse	80
4.5	Eintrag von Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in die Umwelt über die Matrix Abwasser.....	84
5.	Kernaussagen.....	87
6.	Glossar.....	93
7.	Anhang: Verfahrenstechnik auf den untersuchten Kläranlagen	I
8.	Literatur.....	VI

Abkürzungsverzeichnis

3GCR	Resistenz gegen ein Cephalosporin der 3. Generation
AB	Antibiotika
ARA	Antibiotika und Antibiotikaresistenzen im Abwasser (gefördert durch das MUNV NRW, 2020-2023)
ARB	Antibiotika-resistente Bakterien
ARG	Antibiotikaresistenzgene
BB	Belebungsbecken
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BG	Berichtsgrenze
BT	Bautechnik
ColR	Colistinresistenz
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonucleid acid (dt. Desoxyribunukleinsäure, DNS)
ET	Elektrotechnik
EV	Ertfverband
EZG	Einzugsgebiet
EW	Einwohnerwert
GAK	Granulierte Aktivkohle
GKW	Gruppenklärwerk
GU	Gene Units (dt.: Genkopie)
HGT	Horizontaler Gentransfer
HyReKA	Biologische bzw. hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern (gefördert durch das BMBF; FKZ: 02WRS1377, 2016-2019)
IHPH	Institut für Hygiene und Public Health
IPC	Internal positive control (dt. Interne positiv-Kontrolle)
KA	Kläranlage
KBE	Koloniebildende Einheit
KH	Krankenhaus
KHG	Krankenhaus-Kostendämpfungsgesetz
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am Robert Koch-Institut
LOD	Limit of Detection (dt.: Detektionslimit)
MBR	Membranbioreaktor
MPN	Most probable number (dt. Wahrscheinlichste Anzahl)
MRE	multiresistente Erreger
MRGN	Multiresistente gram-negative Bakterien
MSR	Mess-, Steuer- und Regelungstechnik
MT	Maschinentechnik
MUNV NRW	Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Verkehr des Landes Nordrhein-Westfalen
PAK	Pulveraktivkohle
PKBW	Projektkostenbarwert
PBE	Plaque-bildende Einheit
RBF	Retentionsbodenfilter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Monitoring- Standorte des ARA Projektes im Verbandsgebiet des Erftverbands.	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der beiden Betriebsarten des RBF+ in Rheinbach. 13	
Abbildung 3: Automatische Probenahmegeräte der Firma WaterSam für die drei Abläufe des RBF+ Rheinbach.....	15
Abbildung 4: Untersuchungen des Einflusses der Verwendung automatisierter Probenehmer auf die Konzentrationen der mikrobiologischen Parameter in einer Probe.....	30
Abbildung 5: Untersuchungen des Einflusses von Standzeiten auf die Konzentrationen der mikrobiologischen Parameter in einer Probe (Triplikate a-c).	31
Abbildung 6: Positivbefunde der untersuchten Antibiotika in klinisch beeinflussten Abwässern.	32
Abbildung 7: Konzentrationen ausgewählter Antibiotika in Grevenbroich.....	35
Abbildung 8: Konzentrationen ausgewählter Antibiotika in Euskirchen.	35
Abbildung 9: Konzentrationen ausgewählter Antibiotika in der KA Grevenbroich (ohne Krankenhausablauf).	36
Abbildung 10: Konzentrationen ausgewählter Antibiotika des GWK Euskirchen-Kessenich (ohne Krankenhausablauf).	36
Abbildung 11: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben des Monitoring- Programms Marien-Hospital Euskirchen (Klinikabwasser).	37
Abbildung 12: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben des Monitoring- Programms Elisabethkrankenhaus Grevenbroich (Klinikabwasser).....	38
Abbildung 13: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms Marien-Hospital Euskirchen (Klinikabwasser).....	39
Abbildung 14: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms Elisabethkrankenhaus Grevenbroich (Klinikabwasser).	40
Abbildung 15: Konzentration der ARGs in den Proben des Monitoring-Programms Elisabethkrankenhaus Grevenbroich (Klinikabwasser).	41
Abbildung 16: Konzentration der ARGs in den Proben des Monitoring-Programms Marien- Hospital Euskirchen (Klinikabwasser).....	41
Abbildung 17: Positivbefunde der untersuchten Antibiotika in den mit einer Membranbelegung ausgestatteten Kläranlagen (KA Glessen und GWK Kaarst-Nordkanal).	42
Abbildung 18: Konzentrationen von Sulfamethoxazol und Trimethoprim im Abwasser der KA Glessen.....	44
Abbildung 19: Konzentrationen von Sulfamethoxazol und Trimethoprim im GWK Kaarst- Nordkanal.....	45
Abbildung 20: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben des GWK Kaarst- Nordkanal.....	46
Abbildung 21: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben der KA Glessen.	46
Abbildung 22: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms GWK Kaarst-Nordkanal (Membrankläranlage).	47
Abbildung 23: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms KA Glessen (Membrankläranlage).....	48
Abbildung 24: Konzentration der ARGs in den Proben des Monitoring-Programms GWK Kaarst-Nordkanal.	49
Abbildung 25: Konzentration der ARG in den Proben des Monitoring-Programms KA Glessen.	49

Abbildung 26: Positivbefunde der untersuchten Antibiotika an Zu- und Abläufen des RBF+ in Rheinbach (Routine-Betrieb).....	50
Abbildung 27: Konzentrationen von Sulfamethoxazol im RBF-Zulauf sowie den drei RBF-Abläufen (RBF-Segment 1 ohne GAK, Segment 2 und 3 mit GAK).....	51
Abbildung 28: Mediankonzentration von Sulfamethoxazol in verschiedenen Tiefen des RBF-Filterkörpers nach RBF-Segment und Position relativ zum RBF-Zulauf- und Verteilerbauwerk.	52
Abbildung 29: Positivbefunde der untersuchten Antibiotika an Zu- und Abläufen des RBF+ in Rheinbach (Mischwasserabschläge).....	53
Abbildung 30: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) im Routine-Betrieb.	54
Abbildung 31: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) im Falle eines Mischwasserabschlags.	54
Abbildung 32: Mediankonzentration von <i>E. coli</i> in verschiedenen Tiefen des RBF-Filterkörpers nach RBF-Segment und Position relativ zum RBF-Zulauf- und Verteilerbauwerk.....	55
Abbildung 33: Mediankonzentration von intestinalen Enterokokken in verschiedenen Tiefen des RBF-Filterkörpers nach RBF-Segment und Position relativ zum RBF-Zulauf- und Verteilerbauwerk.	56
Abbildung 34: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) im Routine-Betrieb.	56
Abbildung 35: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) bei Mischwasserabschlag.	57
Abbildung 36: Mediankonzentration von ESBL-produzierenden <i>E. coli</i> in verschiedenen Tiefen des RBF-Filterkörpers nach RBF-Segment und Position relativ zum RBF-Zulauf- und Verteilerbauwerk.	58
Abbildung 37: Mediankonzentration von VRE in verschiedenen Tiefen des RBF-Filterkörpers nach RBF-Segment und Position relativ zum RBF-Zulauf- und Verteilerbauwerk.....	58
Abbildung 38: Konzentrationen der ARG in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) im Regelbetrieb.	59
Abbildung 39: Konzentrationen der ARG in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) bei einem Mischwasserabschlag.	60
Abbildung 40: Nachweishäufigkeit und gemessene Konzentrationen des Resistenzgens <i>mcr-1</i> in den nach Abwassermatrix gruppierten Probenahmestellen.	63
Abbildung 41: Nachweishäufigkeit und gemessene Konzentrationen des Resistenzgens <i>bla_{NDM-1}</i> in den nach Abwassermatrix gruppierten Probenahmestellen.	64
Abbildung 42: Nachweishäufigkeit und gemessene Konzentrationen des Resistenzgens <i>ermB</i> in den nach Abwassermatrix gruppierten Probenahmestellen.	65
Abbildung 43: Nachweishäufigkeit und gemessene Konzentrationen des Resistenzgens <i>bla_{TEM}</i> in den nach Abwassermatrix gruppierten Probenahmestellen.	65
Abbildung 44: Anteile von multiresistenten Isolaten an den resistenten Gesamtisolaten der Rohabwasserproben des ARA Projektes im Vergleich zu den Proben des urbanen Fallbeispiels im Projekt HyReKA.	68
Abbildung 45: Anteile von multiresistenten Isolaten an den resistenten Gesamtisolaten des Monitoring Programmes Klinikabwasser.	69
Abbildung 46: Quantifizierbare Konzentrationen koloniebildender Einheiten (KBE) von <i>E. coli</i> in den Zu- bzw. Abläufen der untersuchten Kläranlagen.	73
Abbildung 47: Quantifizierbare Konzentrationen koloniebildender Einheiten (KBE) von ESBL-produzierendem <i>E. coli</i> in den Zu- bzw. Abläufen der untersuchten Kläranlagen.	73

Abbildung 48: Quantifizierbare Konzentrationen koloniebildender Einheiten (KBE) von intestinaler Enterokokken in den Zu- bzw. Abläufen der untersuchten Kläranlagen.....	74
Abbildung 49: Quantifizierbare Konzentrationen koloniebildender Einheiten (KBE) von VRE in den Zu- bzw. Abläufen der untersuchten Kläranlagen.	74
Abbildung 50: Mittlere und maximale Konzentrationen von Sulfamethoxazol in den Zu- bzw. Abläufen der untersuchten Kläranlagen.	75
Abbildung 51: Mittlere und maximale Konzentrationen von Sulfamethoxazol in der KA Rheinbach und dem RBF+ (Routinebetrieb).....	76
Abbildung 52: Zeitlicher Verlauf der gemessenen Sulfamethoxazol-Konzentrationen an den Probenahmestellen auf der KA Glessen (KA GL).	77
Abbildung 53: Anteile des Resistenzgens <i>ermB</i> an der in der Probe vorhandenen 16S rRNA.	78
Abbildung 54: Anteile des Resistenzgens <i>bla_{TEM}</i> an der in der Probe vorhandenen 16S rRNA.	79
Abbildung 55: Anteile des Resistenzgens <i>mcr-1</i> an der in der Probe vorhandenen 16S rRNA-Gene.....	79
Abbildung 56: Anteile des Resistenzgens <i>bla_{NDM-1}</i> an der in der Probe vorhandenen 16S rRNA-Gene.....	80
Abbildung 57: Verlauf des Projektkostenbarwertes (PKBW) für eine Modellkläranlage (65.000 EW) unter Annahme verschiedener Abwasserbehandlungsarten über den gesamten 30-jährigen Betrachtungszeitraum (Seiger, 2023).	82
Abbildung 58: Verfahrenstechnik der Abwasserbehandlung auf dem GWK Euskirchen-Kessenich.	I
Abbildung 59: Verfahrenstechnik der Abwasserbehandlung auf der KA Grevenbroich.	II
Abbildung 60: Verfahrenstechnik der Abwasserbehandlung auf dem GWK Kaarst-Nordkanal.	III
Abbildung 61: Verfahrenstechnik der Abwasserbehandlung auf der KA Glessen.	IV
Abbildung 62: Verfahrenstechnik der Abwasserbehandlung auf der KA Rheinbach.	V

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Monitoring-Programme sowie die zugehörigen Probenahmestellen im ARA-Projekt.	9
Tabelle 2: Probenahmeflaschen für das ARA-Monitoringprogramm.	16
Tabelle 3: Im Projekt untersuchte Antibiotika.	17
Tabelle 4: Antibiotikaklassen und Leitsubstanzen nach KRINKO 2012.	20
Tabelle 5: Primersequenzen der Carbapenemasogene.	21
Tabelle 6: Gene für die Quantifizierung mittels qPCR.	22
Tabelle 7: qPCR-Protokoll zur Resistenzgenanalyse der Abwassermatrix für alle Targets. ...	23
Tabelle 8: LOD95% der qPCR-Ansätze zur absoluten Quantifizierung der untersuchten Resistenzgene.	23
Tabelle 9: Prozentualer Anteil der kategorischen Ergebnisse der mikrobiellen Parameter ESBL-produzierende <i>E. coli</i> , ESBL-produzierende KEC und VRE auf Resistenz-Agar.	26
Tabelle 10: Prozentualer Anteil der kategorischen Ergebnisse der Parameter <i>Pseudomonas</i> spp. 3GCR, <i>P. aeruginosa</i> 3GCR, <i>Acinetobacter</i> spp. 3GCR und <i>A. calcoaceticus-baumannii</i> -Komplex 3GCR auf Resistenz-Agar.	27
Tabelle 11: Kostenanteile der Behandlungsstufen und Reinvestitionszeiten. BT = Bautechnik. MT = Maschinenteknik. ET = Elektrotechnik, MSR = Mess- Steuer und Regelungstechnik.	81
Tabelle 12: Investitions- und Betriebskosten der Modellkläranlage mit einer Ausbaugröße von 65.000 EW nach Seiger (2023).	81

Zusammenfassung

Das vom Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Verkehr des Landes Nordrhein-Westfalen geförderte Forschungsprojekt „Antibiotika und Antibiotikaresistenzen im Abwasser“ (ARA, 2020-2023) baut auf Erkenntnissen des BMBF-geförderten Forschungsvorhabens HyReKA (2016-2019) auf. In HyReKA zeigte sich, dass sich die Konzentration multiresistenter Erreger (MRE) im Abwasser eines Klinikums der Maximalversorgung und im nachgeschalteten kommunalen Kanalnetz deutlich von kommunalem Abwasser unterschied. Das ARA-Projekt hatte einerseits zum Ziel, den Beitrag kleiner bis mittelgroßer Krankenhäuser (Kliniken der Grund- und Regelversorgung) zur Verbreitung Antibiotika-resistenter Bakterien (inklusive MRE) sowie Antibiotika über den Abwasserpfad in die aquatische Umwelt zu ermitteln. Andererseits sollten verschiedene Maßnahmen der weitergehenden Abwasserbehandlung auf ihre Wirksamkeit und Effizienz bezüglich des Rückhaltes von Antibiotika-resistenten Bakterien und Antibiotikarückständen untersucht und mit der Reinigungsleistung konventioneller (d.h. mechanisch-biologischer) Kläranlagen verglichen werden.

Zu diesem Zweck haben der Erftverband (EV) und das Institut für Hygiene & Public Health (IHPH) des Universitätsklinikums Bonn im Verbandsgebiet des Erftverbandes zwei Monitoring-Programme durchgeführt, welche die Beprobung (1) von Klinikabwässern zweier Krankenhäuser der Grund- und Regelversorgung und (2) von mehreren Kläranlagen mit weitergehender Abwasserbehandlung umfasste. Die untersuchten Kläranlagen mit weitergehender Abwasserbehandlung umfassten zwei Anlagen mit Membranbioreaktor (MBR) sowie eine Anlage mit nachgeschaltetem Retentionsbodenfilter (RBF) mit beigemischter granulierter Aktivkohle (GAK) zum gezielten Rückhalt organischer Spurenstoffe. Im Zuge des Monitorings wurden verschiedene Antibiotika, Antibiotika-resistente Bakterien und Resistenzgene sowie weitere hygienisch-mikrobiologische Parameter untersucht.

Die Ergebnisse des Projektes bestätigen, dass Antibiotika und Antibiotika-resistente Bakterien sowie Resistenzgene ubiquitär im kommunalen Abwasser vorhanden sind. Bestimmte Last-Resort-Antibiotika (wie Piperacillin), besonders kritische multiresistente Bakterien nach MRGN-Klassifizierung der KRINKO (4MRGN-Erreger) und einzelne Resistenzgene (wie *bla_{NDM-1}*) wurden fast ausschließlich von Krankenhäusern emittiert. Die untersuchten Krankenhäuser der Grund- und Regelversorgung sind in dieser Hinsicht im Wesentlichen vergleichbar mit dem Maximalversorger aus dem HyReKA-Projekt, wobei Unterschiede in den relativen Anteilen von 3MRGN- und 4MRGN Erregern nachweisbar sind. Im Vergleich zum HyReKA-Projekt zeigte sich, dass insbesondere 3MRGN-Erreger in systematisch höheren Anteilen sowohl in klinisch beeinflusstem als auch klinisch unbeeinflusstem (d.h. rein kommunalem) Abwasser vorhanden sind. Ob sich daraus auf einen Trend im Aufkommen von MRE im Abwasser schließen lässt (das heißt eine Ausbreitung und ein sukzessives Vordringen von MRE aus dem klinischen-stationären auch in den häuslich-ambulanten Bereich erfolgt), muss in systematischen Langzeituntersuchungen geklärt werden.

Eine konventionelle Abwasserbehandlung reduziert Antibiotika-resistente Bakterien im Abwasserstrom erheblich (bis zu 99,9 %), jedoch ist für eine vollständige Elimination eine weitergehende Behandlung erforderlich. Die untersuchten MBR und der RBF erzielten als Maßnahme der weitergehenden Abwasserbehandlung gleichwertige Ergebnisse bezüglich der Reduktion Antibiotika-resistenter Bakterien. Die Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf einen Selektionsvorteil von Antibiotika-resistenten Bakterien im Reinigungsprozess. Bezüglich der untersuchten Resistenzgene lassen sich weitgehend analoge Schlussfolgerungen formulieren, wobei die erzielten Reduktionsraten insgesamt variabler ausfallen. Antibiotika werden in der konventionellen Abwasserbehandlung stoffspezifisch sehr unterschiedlich stark

zurückgehalten. Eine weitergehende Abwasserbehandlung beispielsweise mit Aktivkohle sorgt für eine verlässliche Reduktion auch persistenter Antibiotika im Abwasser.

Die Entscheidung zwischen zentraler Abwasserbehandlung auf kommunalen Kläranlagen und dezentraler Abwasserbehandlung an Krankenhäusern, zum Zwecke des Rückhalts von Antibiotikaresistenzen, sollte für einzelne Kanalnetze individuell getroffen werden. Ein mögliches Entscheidungskriterium ist die erreichbare Reduktion der Gesamtfracht der Resistenzparameter. Insbesondere sind dabei Mischwasserabschläge zu berücksichtigen, weil diese große Anteile der Gesamtfracht Antibiotika-resistenter Bakterien (einschließlich MRE) und Resistenzgenen aus den Abwassersystemen in die Umwelt einbringen können. Neben der Abwasserbehandlung sind weitere Maßnahmen erforderlich, um das Resistenzauftreten in der Umwelt zu begrenzen. Letztlich ist, im Sinne des *One Health*-Konzeptes, eine integral-holistische Herangehensweise anzustreben, welche die Verbindung zwischen menschlicher Gesundheit, Tiergesundheit sowie Umwelt berücksichtigt.

Abstract

The research project "Antibiotics and Antibiotic Resistance in Wastewater" (ARA, 2020-2023), funded by the Ministry for Environment, Nature Conservation and Transportation of the State of North Rhine-Westphalia, builds on research findings from the BMBF-funded research project HyReKA (2016-2019). In HyReKA, it was concluded that the concentration of multidrug-resistant organisms (MDROs) in the wastewater of a maximum-care hospital and in the downstream sewer system differed significantly from that of municipal wastewater.

The ARA project aimed to determine the contribution of small to medium-sized hospitals (primary and secondary care hospitals) to the spread of antibiotic-resistant bacteria (including MDROs) and antibiotics into the aquatic environment via the wastewater path. Additionally, various advanced wastewater treatment measures were evaluated for their effectiveness and efficiency in retaining antibiotic-resistant bacteria and antibiotic residues, and compared with the purification performance of conventional wastewater treatment plants.

For this purpose, the Erftverband (EV) and the Institute for Hygiene & Public Health (IHPH) of the University Hospital Bonn conducted monitoring programs at various wastewater facilities in the Erft catchment area. These programs included (1) sampling of hospital wastewater from two primary and secondary care hospitals and from (2) several wastewater treatment plants with different advanced treatment technologies. The examined treatment plants with advanced wastewater treatment included two plants with a membrane bioreactor (MBR) and one wastewater treatment plant with a downstream retention soil filter (RSF) mixed with granular activated carbon (GAC) for targeted retention of organic trace substances. Various antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, resistance genes, and other hygienic-microbiological parameters were investigated.

The project's results confirm that antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes are ubiquitously present in wastewater. Certain last-resort antibiotics (such as piperacillin), particularly critical multidrug-resistant bacteria according to the MRGN classification of the KRINKO (4MRGN pathogens), and individual resistance genes (such as *bla_{NDM-1}*) are almost exclusively emitted by hospitals. The results obtained for the examined primary and secondary care hospitals are essentially comparable to the maximum-care hospital (investigated in the HyReKA project), with differences in the relative proportions of 3MRGN and 4MRGN pathogens. Compared to the HyReKA project, it was found that 3MRGN pathogens are present in systematically higher proportions in both clinically influenced and clinically uninfluenced (i.e., purely municipal) wastewater. Whether this indicates a trend in the occurrence of MDROs in wastewater (i.e., a spread and gradual advancement of MDROs from the clinical to the domestic-ambulatory sector) needs to be further clarified in systematic long-term studies.

Conventional wastewater treatment significantly reduces antibiotic-resistant bacteria in the wastewater (by up to 99.9%), but for complete elimination, advanced treatment is necessary. The investigated MBRs and the RSF achieve equivalent results in reducing antibiotic-resistant bacteria. The investigations found no evidence of a selection advantage for antibiotic-resistant bacteria in the purification processes. Similar conclusions can be drawn regarding the investigated resistance genes, although the achieved reduction rates are overall more variable. Antibiotics are retained very differently in conventional wastewater treatment depending on the substance. Advanced wastewater treatment, for example, with activated carbon ensures a reliable reduction of even the most persistent antibiotics in the wastewater.

The decision between centralized wastewater treatment at the municipal level and decentralized wastewater treatment at the hospital level for retaining antibiotic resistance

should be made individually for each sewer system and corresponding catchment area. A possible decision criterion is the achievable reduction of the overall load of resistance parameters in the entire sewer system. Combined sewage overflow, in particular, must be considered as it can introduce large amounts of antibiotic-resistant bacteria (including MDROs) and resistance genes from wastewater systems into the environment. Besides wastewater treatment, additional measures are necessary to limit the spread of resistance in the environment. Ultimately, an integral-holistic approach should be pursued in the sense of the One Health concept, which considers the connection between human health, animal health, and the environment.

1. Einleitung

1.1 Antibiotika und Resistenzen

Die Entdeckung von Penicillin in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts und die Nutzbarmachung vieler weiterer Antibiotikaklassen in den darauffolgenden Jahrzehnten revolutionierten die moderne Medizin. Der Einsatz von Antibiotika erzeugt allerdings einen Selektionsdruck auf bakterielle Lebensgemeinschaften, der die Ausbreitung Antibiotika-resistenter Stämme begünstigt. Der intensive Einsatz von Antibiotika in der Human- und Tiermedizin hat auf diese Weise in den letzten Jahrzehnten weltweit und auch in Deutschland zu einer zunehmenden Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei bakteriellen Krankheitserregern geführt (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit et al., 2016). So listet im Jahr 2023 die *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* über 300.000 Allele, die bekannte einzigartige Varianten von Antibiotikaresistenzgenen darstellen (Alcock et al., 2023). Die Ausbreitung Antibiotika-resistenter Krankheitserreger erschwert die medizinische Behandlung bakteriell verursachter Infektionen und stellt eine Bedrohung für die öffentliche Gesundheit und die medizinische Versorgung der Allgemeinbevölkerung dar. Dies gilt in besonderem Maße für multiresistente Erreger (MRE), gegen die eine Vielzahl gebräuchlicher Antibiotika nicht mehr wirksam sind, mit teils schwerwiegenden Konsequenzen für betroffene Patienten. Die wachsende Verbreitung (multi-)resistenter Krankheitserreger hat daneben auch monetäre Konsequenzen: Laut *The Review on Antimicrobial Resistance* (2016) könnten Antibiotikaresistenzen die Weltwirtschaft bis zum Jahr 2050 bis zu 100 Billionen US-Dollar kosten, sofern keine Gegenmaßnahmen ergriffen werden (O'Neill, 2016).

Eine allgemeine Definition, ab wann ein Bakterium als multiresistent anzusehen ist, erweist sich als schwierig. Weltweit existieren diesbezüglich verschiedene Begrifflichkeiten, z.B. multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) und pandrug-resistant (PDR) (Magiorakos et al., 2012). In Deutschland hat die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am Robert Koch-Institut (KRINKO) im Jahr 2012 Empfehlungen herausgegeben, wie multiresistente Gram-negative Bakterien hinsichtlich ihrer Resistenzmuster bewertet werden sollten. Die KRINKO entwickelte eine Definition, die diejenigen Antibiotika berücksichtigt, die primär bei schweren Infektionen eingesetzt werden (KRINKO, 2012). Es wurden vier Antibiotikaklassen mit unterschiedlichen Leitsubstanzen festgelegt: (1) Acylureidopenicilline, wobei Piperacillin als Leitsubstanz dient, (2) 3./4. Generation Cephalosporine mit Cefotaxim und/oder Ceftazidim als Leitsubstanzen, (3) Carbapeneme mit den Leitsubstanzen Imipenem und/oder Meropenem, (4) Fluorchinolone, wobei Ciprofloxacin als Leitsubstanz gilt. Die Bezeichnungen 3MRGN bzw. 4MRGN wurden eingeführt, um multiresistente Gram-negative Bakterien zu kennzeichnen, die gegen drei bzw. vier der definierten Antibiotikaklassen resistent sind.

Während die Zahl der Antibiotikaresistenzen weiter steigt, ist die Entdeckung bzw. Entwicklung neuer Antibiotika zurückgegangen (Ventola, 2015). Sogenannte Reserve- oder Last-Resort-Antibiotika werden zur Sicherung von Behandlungsoptionen primär gegen multiresistente Krankheitserreger eingesetzt. Hierzu zählen beispielsweise Colistin und Carbapeneme. Letztere weisen ein breites Wirkungsspektrum gegen Gram-positive, Gram-negative und anaerobe Bakterien auf, im Gegensatz zum engen Wirkungsspektrum von Colistin gegen Gram-negative Erreger (Papp-Wallace et al., 2011). Im neuesten Bericht der WHO über prioritäre Antibiotika wurden Colistin und Carbapeneme als kritisch wichtige Substanzen für die Humanmedizin aufgeführt (WHO, 2018). Die Verwendung von Carbapenemen wurde nie für veterinärmedizinische Zwecke zugelassen, jedoch wurde Colistin umfangreich in der

Veterinärmedizin eingesetzt (Davis and Janssen, 2020). Obwohl der Einsatz von Colistin in den 1970er Jahren für Menschen priorisiert wurde, findet der Wirkstoff weiterhin Anwendung in der Tierhaltung (El-Sayed Ahmed et al., 2020).

Ungefähr zwei Drittel aller Infektionen mit multiresistenten Krankheitserregern ereignen sich im Klinikumfeld (Cassini et al., 2019), typischerweise als nosokomiale Infektion („Krankenhausinfektion“) von Patienten im Zuge einer anderen Behandlung. Darüber hinaus ist die Transmission von MRE bzw. MRGN über Personal von Gesundheitseinrichtungen sowie Patienten mehrfach nachgewiesen worden (Chia et al., 2020; Fischer et al., 2019). Auch eine Übertragung von Krankheitserregern auf Besucher von Krankenhäusern ist möglich und begünstigt die Verschleppung und Ausbreitung in die breitere Bevölkerung (Banach et al., 2015). In der Folge breiten sich Antibiotikaresistenzen zunehmend auch außerhalb von Krankenhäusern und medizinischen Einrichtungen aus. Der Nachweis von multiresistenten Bakterien in Wildtieren (Vögel, Säugetiere), denen keine Antibiotika verabreicht wurden, belegt deren Verbreitung in Umweltnischen fernab des klinischen Umfeldes (da Costa et al., 2013). Die Autoren weisen in diesem Zusammenhang auf die Verbindung zwischen menschlicher und tierischer Gesundheit hin. Eine Besiedlung von Tieren mit Erregern, die den klinisch bedeutsamen 4MRGN-Status tragen, ist potentiell möglich. Der Einfluss von nicht domestizierten Tieren, die in anthropogen beeinflusster Umwelt leben, auf die Verbreitung von (multi-)resistenten Erregern ist im letzten Jahrzehnt stark an Bedeutung gestiegen (Dolejska, 2020). Tiere gelten als potentielle Vektoren und Überträger von Antibiotikaresistenzen für Mensch und Tier. Insbesondere über Vögel ist eine Verbreitung der Resistenzen über Landesgrenzen und Kontinente hinaus möglich (Dolejska, 2020). In der Umwelt angelangte Krankheitserreger können Antibiotikaresistenzgene durch horizontalen Gentransfer (HGT), d.h. durch Austausch von genetischem Material, auch artübergreifend an andere Bakterienzellen weitergeben (Burmeister, 2015; Zarei-Baygi and Smith, 2021).

Die Überwachung von Krankenhausabwässern wurde als potenziell Ressourcen-effiziente Ergänzung zur herkömmlichen klinischen Überwachung von Antibiotikaresistenzen vorgeschlagen, da eine einzige Abwasserprobe Bakterien von einer großen Zahl von Personen enthält. Flach et al. (2021) führten Untersuchungen zu Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien in Abwasser durch, in dem diese Bakterien selten vorkamen. Nicht bei allen untersuchten Carbapenemase-Genen stellten sie eine Übereinstimmung zwischen Genkonzentration und Erregerhäufigkeit in Abwässern fest. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Analyse von Krankenhausabwasser ihre Grenzen hat, wenn es darum geht, seltene Formen der Resistenz frühzeitig zu erkennen. Kraupner et al. (2021) fanden in Laborversuchen Hinweise darauf, dass Krankenhausabwasser Resistenzeigenschaften selektiert. Das von Krankenhausabwasser ausgehende Risiko wird zusätzlich durch die Verwendung von Reserveantibiotika in Krankenhäusern erhöht. Neben klinisch-beeinflusstem Abwasser wurden MRE in Studien auch in diversen klinisch unbeeinflussten Abwassermatrizes nachgewiesen. Studien innerhalb Deutschlands, die der Untersuchung von 4MRGN-Erregern nachgingen, zeigten unterschiedliche prozentuale Anteile der 4MRGN-Bakterien an detektierten resistenten Gesamtisolaten (Müller et al., 2018; Schmiege et al., 2021; Sib et al., 2020). So fanden Schmiege et al. (2021), zwar keine Bakterien dieser hochgradig multiresistenten Erregergruppe in städtischem Abwasser, jedoch wurden geringe Anteile der 4MRGN-Bakterien von 0,7 % (Müller et al., 2018) bzw. 1,1 % (Sib et al., 2020) in Abwasser ländlich geprägter Regionen nachgewiesen. Diverse Studien, u.a. Daten aus dem HyReKA-Projekt (2016-2019) haben gezeigt, dass multiresistente Erreger daneben auch im Abwasser von Schlachtbetrieben und im Ablauf der hauseigenen Kläranlagen vorhanden sind (u.a. Savin et al., 2020).

1.2 Abwasser als Eintragspfad in die Umwelt

Über Abwässer gelangen Antibiotika und ihre Rückstände (AB) sowie Antibiotika-resistente Bakterien in die aquatische Umwelt (Kümmerer, 2009; Müller et al., 2018; WHO, 2014). Studien haben gezeigt, dass die meisten komplexen Antibiotika wie Carbapeneme und Colistin vom menschlichen Körper größtenteils unverändert ausgeschieden werden (60–70% von Colistin, 70–80 % von Carbapenemen) (Breilh et al., 2013; Davis and Janssen, 2020; Papp-Wallace et al., 2011), so dass die Substanzen im Abwasser nachweisbar sind und dort weiter potenziell wirksam oder selektierend sein können. MRE-Befunde in Flüssen, Bächen und Seen haben in jüngerer Vergangenheit öffentliches Interesse erregt und wurden in den Medien thematisiert¹. Die Gefahr der Übertragung dieser Bakterien aus Oberflächenwasser auf den Menschen und die möglichen Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit wurden auch in wissenschaftlichen Veröffentlichungen dargestellt. Heudorf et al. (2018) beschrieben die Übertragung eines Carbapenemase-produzierenden *K. pneumoniae* in Frankfurt (Deutschland) und Laurens et al. (2018) die Übertragung von Carbapenemase-produzierenden *Enterobacterales* in Südfrankreich. In beiden Fällen handelte es sich um Personen, die beinahe in Fließgewässern ertrunken wären. Über den Verbleib der resistenten Mikroorganismen in den Oberflächengewässern und die damit verbundenen Risiken besteht jedoch nur ein unvollständiges Bild (Berendonk et al., 2015).

Verschiedene Studien haben sich bereits mit Antibiotikaresistenzen in klinischem Abwasser befasst und festgestellt, dass dieses besonders hohe Konzentrationen an Antibiotika, Antibiotika-resistenten Bakterien (auch MRE) und Resistenzgenen aufweist (Hassoun-Kheir et al., 2020; Kehl et al., 2021; Koh et al., 2015; Lindberg et al., 2004; Ory et al., 2019; Schuster et al., 2022; Voigt et al., 2020; Wang et al., 2018). Antibiotika-resistente Bakterien, die von infizierten oder kolonisierten Menschen oder Tieren ausgeschieden werden, werden von konventionellen Kläranlagen nicht vollständig eliminiert (Hembach et al., 2017; Müller et al., 2018). Für konventionelle Kläranlagen wurde beschrieben, dass Indikatorbakterien wie gesamt- und fäkalcoliforme Bakterien, intestinale Enterokokken und Salmonellen um ein bis drei Log-Stufen reduziert werden (unabhängig von der Witterung) (Koivunen and Heinonen-Tanski, 2005; Rechenburg et al., 2006). Dies entspricht einer Reduktion von 90,0 - 99,9 %. Trotzdem liegt die im Ablauf der Nachklärung verbleibende mikrobielle Restbelastung nach Güde et al. (2001) um ein bis zwei Log-Stufen über dem Konzentrationsbereich eines Gewässers, das nicht durch Abwassereinleitungen beeinflusst ist. Somit tragen Kläranlagenabläufe zu einer konstanten mikrobiellen Grundbelastung der aufnehmenden Gewässer bei.

Verschiedene Studien stimmen außerdem darin überein, dass konventionelle Abwasserbehandlungsanlagen die Konzentration von Bakterien im Wasser reduzieren, jedoch keinen wesentlichen Rückgang im relativen Anteil resistenter Bakterien bewirken (Amador et al., 2015; Blaak et al., 2015; Korzeniewska et al., 2013). Die Behandlungsprozesse in Kläranlagen scheinen die Anzahl der Antibiotika-resistenten Bakterien in ähnlichem Maße zu reduzieren wie diejenige nicht-resistenter Bakterien. Die Prävalenz von Antibiotika-resistenten Bakterien im Ablauf von Kläranlagen deutet darauf hin, dass die mechanisch-biologische Abwasserbehandlung Antibiotika-resistente Bakterien und Resistenzgene nicht vollständig eliminieren und überlebende Bakterien ihre Resistenzmerkmale beibehalten (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016; Cacace et al., 2019; Czekalski et al., 2016; Hembach et al., 2017;

¹ z.B. NDR, 06.02.2018, Panorama - die Reporter: „Auf der Spur der Superkeime“ und WDR, 12.12.2023, „Klinikabwässer: Wie gefährliche Keime in Flüsse und Seen gelangen“

Hiller et al., 2019; LaPara et al., 2011; Mao et al., 2015; Pallares-Vega et al., 2019; Pruden et al., 2013; Quach-Cu et al., 2018).

Eine schwedische Studie fand keine Selektion von Resistenzgenen durch Antibiotika im Abwasser einer Kläranlage (Bengtsson-Palme und Larsson, 2016). Quach-Cu et al. (2018) konnten im Verlauf des Abwasserbehandlungsprozesses keine positive Selektion für spezifische Antibiotikaresistenzgene im Vergleich zur Gesamtbakterienbiomasse beobachten. In einer Studie aus den Niederlanden wurde festgestellt, dass konventionelle Kläranlagenprozesse die Gesamtbelastung von Antibiotika-resistente Bakterien und Antibiotikaresistenzgene signifikant verringerten und dabei das Resistenzaufkommen in der bakteriellen Gesamtpopulation nicht erhöhten (Pallares-Vega et al., 2019). Die mechanisch-biologische Abwasserbehandlung kann Pharmazeutika, einschließlich Antibiotika, nur teilweise eliminieren (Rodriguez-Mozaz et al., 2015). In einer Studie in Wisconsin wurde mechanisch-biologisch behandeltes Abwasser aus sieben Kläranlagen auf das Vorhandensein von 21 verschiedenen Antibiotika getestet. Sechs der getesteten Antibiotika (Sulfamethazin, Sulfamethoxazol, Tetracyclin, Ciprofloxacin, Erythromycin und Trimethoprim) wurden in behandelten Abwasserproben (1-5 pro Standort) aus diesen Anlagen nachgewiesen (Karthikeyan and Meyer, 2006). Die Autoren beobachteten, dass die Größe der Kläranlage (bezogen auf die behandelte Abwassermenge) keinen Einfluss auf das Vorhandensein von Antibiotika in den unbehandelten sowie behandelten Abwasserproben hatte.

Zu beachten ist, dass große Anteile der mikrobiellen Gewässerbelastungen (vor allem mit Fäkalindikatoren) aus der Siedlungsentwässerung auf Mischwasserentlastungen zurückgeht (Rechenburg et al., 2006). Bei Starkregen gelangen über diesen Weg Krankheitserreger und Schadstoffe (unter anderem auch Antibiotika und Antibiotika-resistente Bakterien) mit dem durch Niederschlagswasser verdünnten Abwasser direkt aus dem Kanalnetz in die aufnehmenden Gewässer und führen zu einer hohen mikrobiellen Stoßbelastung (Atherholt et al., 1998; Gibson et al., 1998; Honda et al., 2020; Kistemann et al., 2002; Mascher et al., 2017; Rechenburg and Kistemann, 2009). Durch die Behandlung mittels Retentionsbodenfiltern (RBF) können der Eintrag von Mikroorganismen und Schadstoffen sowie die hydraulischen Belastungen im aufnehmenden Gewässer erheblich gesenkt werden (Brunsch et al., 2020; Christoffels et al., 2014; Overath et al., 2000; Zacharias et al., 2020).

Paulus et al. (2019) untersuchten die Reduktionsleistung verschiedener dezentraler Vor-Ort-Behandlungen (Kombination von MBR, Ozonung, GAK-Filtration und UV-Bestrahlung) bezüglich Antibiotika und Antibiotikaresistenzgene im Vergleich zur zentralen (mechanisch-biologischen) Behandlung von kommunalem Abwasser. Die Autoren stellen mit Blick auf die starke Belastung von Klinikabwässern die hohe Wirksamkeit einer dezentralen Behandlung von Krankenhausabwasser bei der Reduktion Antibiotika und Antibiotikaresistenzgene fest. Eine dezentrale Reduktion dieser Wasserinhaltsstoffe kann zudem HGT von Resistenzgenen in der Kanalisation vorbeugen, da Selektionsdruck durch Antibiotikarückstände vermindert wird (Paulus et al., 2019). Dies ist insbesondere für Last-Resort-Antibiotika, die häufig in Krankenhäusern der Maximalversorgung verwendet werden, wichtig. Dazu müssen gesetzliche Vorgaben und Anforderungen formuliert werden, um Anreize zu schaffen und die praktische Umsetzung der dezentralen Abwasserbehandlung zu erhöhen (Paulus et al., 2019). Die verschiedenen Ansatzpunkte zur Abwasserbehandlung sowie Behandlungstechnologien sind dabei in ihrer Effizienz zu beurteilen (beispielsweise in Form einer Kosten-Nutzen-Analyse).

1.3 Projektziele

Im Forschungsprojekt „Biologische bzw. hygienisch-medizinische Relevanz und Kontrolle Antibiotika-resistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern“ (HyReKA, gefördert durch das BMBF, 2016-2019) wurde unter anderem die Belastung von Klinikabwasser mit Antibiotika-resistenten Bakterien und Antibiotika untersucht. Dabei wurde herausgearbeitet, dass sich das Abwasser eines Klinikums der Maximalversorgung und das Abwasser des nachgeschalteten kommunalen Kanalnetzes hinsichtlich der MRE-Konzentrationen stark von kommunalem Abwasser ohne Klinikeinfluss unterscheiden.

Aufbauend auf den im HyReKA-Projekt gewonnenen Erkenntnissen wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Antibiotika und Antibiotikaresistenzen im Abwasser“ (ARA, gefördert durch das MUNV NRW, 2020-2023), die Belastung von Abwässern aus Krankenhäusern der Grund- bzw. der Regelversorgung mit Antibiotika, Antibiotika-resistenten Bakterien und Resistenzgenen untersucht in verschiedenen Monitoring-Programmen. Diese kleineren bis mittelgroßen Einrichtungen umfassen den weitaus größten Teil der stationären medizinischen Versorgung (ca. zwei Drittel aller Einrichtungen) und produzieren somit den größten Teil des in Deutschland anfallenden Klinikabwassers (Bund, 2023). Im Projekt ARA wurde das Monitoring nicht nur auf die Zu- und Abläufe der nachgeschalteten Kläranlagen fokussiert, sondern auch die Beschaffenheit des Abwassers zweier Krankenhäuser im Erftverbandsgebiet untersucht: Dies sind das Marien-Hospital in Euskirchen (465 Betten) sowie das Rheinland Klinikum Grevenbroich Elisabethkrankenhaus (308 Betten). Die das Abwasser dieser beiden Krankenhäuser aufnehmenden Kläranlagen sind einerseits das Gruppenklärwerk (GKW) Euskirchen-Kessenich (Kreis Euskirchen, Ausbaugröße: 132.000 EW) und andererseits die Kläranlage (KA) Grevenbroich (Rhein-Kreis Neuss, Ausbaugröße: 97.100 EW).

Der Erftverband setzt seit Langem verschiedene technische Innovationen zur weitergehenden Abwasserreinigung in die Praxis um. So betreibt der Verband drei Kläranlagen mit Membranbioreaktor (MBR). Zwei der Anlagen, das GKW Kaarst-Nordkanal sowie die KA Glessen, werden im Rahmen des Forschungsprojekts ARA auf das Rückhaltevermögen hinsichtlich allgemeiner Indikatorbakterien, Antibiotika-resistenter Bakterien, Antibiotikaresistenzgene sowie Antibiotika untersucht. Neben den beiden Membrankläranlagen wird der Retentionsbodenfilter der KA Rheinbach untersucht. Im Unterschied zu herkömmlichen Retentionsbodenfiltern ist dem Filtermaterial des RBF Rheinbach granuliertes Aktivkohle zum Rückhalt organischer Spurenstoffe beigefügt (RBF+). Neben der Behandlung von Mischwasserabschlägen wird der RBF+ auf diese Weise auch für die Behandlung des geklärten Abwassers der KA Rheinbach eingesetzt.

Ziel des Projekts ARA ist im Wesentlichen die Bearbeitung von zwei zentralen Fragestellungen:

- (1) Die Untersuchung des Beitrages kleiner bis mittelgroßer Krankenhäuser hinsichtlich des Eintrags von Antibiotika-resistenten Bakterien (auch MRE) und Antibiotika in die aquatische Umwelt.
- (2) Die Untersuchung der Wirksamkeit und Effizienz der weitergehenden Abwasserbehandlung (Membranbelebungsanlagen und RBF+) im Hinblick auf die Elimination Antibiotika-resistenter Bakterien und Antibiotika im Vergleich zur konventionellen (mechanisch-biologischen) Abwasserbehandlung.

Um die Fragestellungen des Projektes zu beantworten wurden für das Monitoring unterschiedliche chemische, mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungsparameter ausgewählt. Der Schwerpunkt der chemischen Abwasseruntersuchung lag auf den im Abwasser transportierten Antibiotika. Vor Projektbeginn waren diesbezüglich 14 verschiedene antibiotische Medikamentenwirkstoffe in der Standard-Spurenstoffanalytik des Erftverband-Labors enthalten, welche bereits im HyReKA-Teilprojekt zur Untersuchung ländlich-kommunalen Abwassers untersucht worden waren. Für die Betrachtung klinischen Abwassers im ARA-Projekt wurde dieser Untersuchungsumfang um weitere 6 Wirkstoffe ergänzt, hierunter vor allem solche Wirkstoffe, deren Einsatz speziell im Klinikumfeld zu erwarten ist. Dies umfasst insbesondere Piperacillin, Meropenem, Linezolid und Metronidazol. Maßgeblich für die Auswahl der zusätzlichen Wirkstoffe waren die Ergebnisse der HyReKA-Modellierungsstudie von Pinnekamp et al. (2019), welche unter anderem eine quantitative Abschätzung über die Herkunft verschiedener Antibiotika im Abwasser entweder aus dem häuslich-ambulantem oder dem klinischen Bereich macht. Der Einsatz der oben genannten Wirkstoffe ist aufgrund ihrer parenteralen Verabreichungsform (d.h. direkt in die Blutbahn), ihres Wirkungsspektrums und/oder ihres Status als Reserveantibiotikum ganz oder in weiten Teilen auf den stationären Einsatz beschränkt. Eine vollständige Liste der insgesamt 20 untersuchten Antibiotika findet sich in Abschnitt 2.2.3. Zusätzlich wurde das Biozid Triclosan betrachtet, welches als Desinfektionsmittelwirkstoff kein Antibiotikum im eigentlichen Sinne ist. Die Substanz findet breiten Einsatz auch außerhalb medizinischer Anwendungsbereiche (z.B. in Hygieneprodukten wie Zahncremes), kann aber die Entstehung von bakteriellen Kreuz- und Koresistenzen gegen Antibiotika begünstigen (d.h. die Entstehung von Antibiotikaresistenzen aufgrund ähnlicher Wirk- und Resistenzmechanismen oder benachbarter Loci der zugrundeliegenden Resistenzgene z.B. auf demselben Plasmid).

Die Festlegung der mikrobiologischen und molekularbiologischen Verfahren und Methoden erfolgte in Abstimmung mit dem LANUV NRW. Ausgewählt wurden *Escherichia coli* und intestinale Enterokokken als bakterielle Fäkalindikatoren, somatische Coliphagen als Virenindikator und *C. perfringens* als Indikator für die Anwesenheit von Protozoen-Dauerformen. Unter Berücksichtigung der globalen Prioritätenliste für Antibiotika-resistente Bakterien als Richtlinie für die Forschung, Entdeckung und Entwicklung neuer Antibiotika (WHO, 2017) wurden acht verschiedene Bakterienarten ausgewählt. Diese umfassen Gram-negative ESBL-produzierende Bakterien der Gattungen *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. (zusammengefasst als KEC) und ESBL-produzierende *E. coli* sowie *Pseudomonas* spp. und *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. und *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*-Komplex (siehe Abschnitt 2.2.4), die jeweils eine Resistenz gegen ein Cephalosporin der 3. Generation (3GCR) zeigen.

Kriterien für die Festlegung der zu bestimmenden Resistenzgene umfassten (i) Resistenzen gegenüber Reserveantibiotika, (ii) solche Resistenzen, die häufig genug in den zu untersuchenden Matrices zu erwarten sind, um eine Aussage über die Reduktion zu ermöglichen sowie (iii) Resistenzen, die auf Plasmiden verankert sind und zwischen Bakterien übertragen werden können. Die zu bestimmenden Resistenzgene wurden nach einer Literaturrecherche zu Vorkommen und Relevanz sowie nach den Ergebnissen aus HyReKA begründet und festgelegt. Das Gen *mcr-1* führt zur Resistenz gegenüber dem als Reserveantibiotikum gegen Gram-negative Bakterien eingesetzten Colistin und wurde bereits weltweit in verschiedenen Gattungen der Enterobacterales nachgewiesen (Birgy et al., 2018; Mendes et al., 2018; Zhu et al., 2019). Eine deutsche Studie, die das Abwasser von sieben Kläranlagen auf Resistenzgene analysierte, zeigte die relativ geringe Abundanz des *mcr-1*, während das Resistenzgen *ermB* (gegen Makrolidantibiotika) in den untersuchten Abläufen

ubiquitär nachgewiesen werden konnte (Hembach et al., 2017). Das Resistenzgen *bla_{TEM}* codiert ESBL-Enzyme und gilt als in der Umwelt weitverbreitet, mit Krankenhausabwasser als wichtiger Quelle (Narciso-da-Rocha et al., 2014). Die New Delhi-Metallo-Betalactamase-1 (*bla_{NDM-1}*) wurde nach erstem Auftreten 2010 in Indien weltweit in diversen Abwassermatrizes nachgewiesen und gilt als persistierend in Kläranlagen (Ranjan and Thatikonda, 2021). Im ARA-Projekt wurden diese und weitere Resistenzgene in den Abwasserproben untersucht, die Auswahl wurde anhand der Befundhäufigkeiten aus dem Projekt HyReKA vorgenommen. Alle Proben in dem ARA-Projekt wurden auf die klinisch-relevanten Resistenzgene *bla_{TEM}*, *ermB*, *bla_{NDM-1}* und *mcr-1* quantitativ untersucht, die in Abwasser unterschiedliche Abundanz aufwiesen. Zudem wurde die Konzentration des 16S rRNA-Gens bestimmt, um die Konzentrationen der Resistenzgene zu auf die Größe der bakteriellen Gesamtpopulation zu normalisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Überblick über die Monitoring-Programme

Die Karte in Abbildung 1 zeigt die zum ARA-Projekt gehörenden Monitoring-Punkte und ihre Lage innerhalb bzw. außerhalb des EV-Verbandsgebietes.

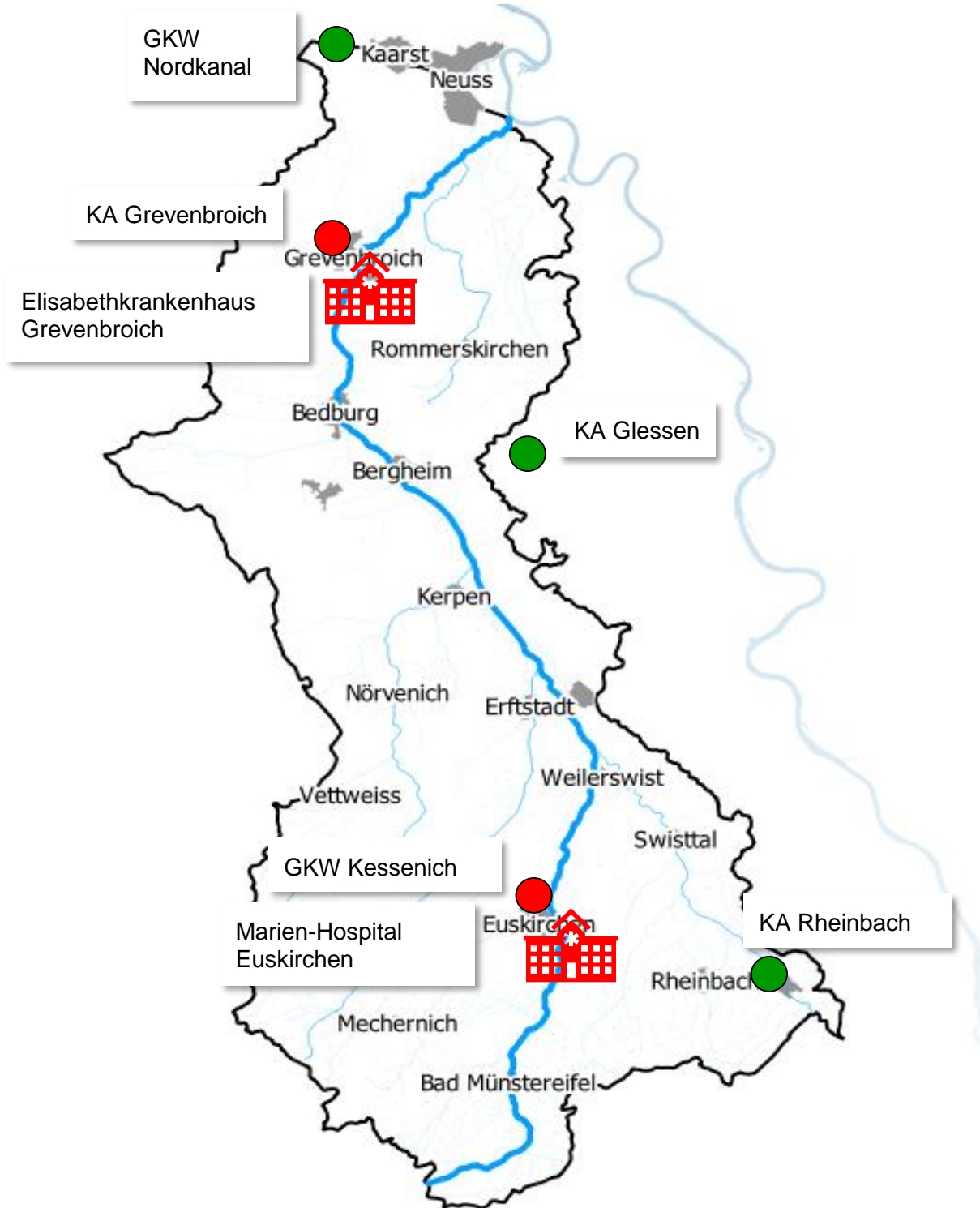


Abbildung 1: Monitoring- Standorte des ARA Projektes im Verbandsgebiet des ERFV.

In Rot sind Standorte zum Monitoring-Programm „Klinikabwasser“ dargestellt. In Grün sind Standorte zum Monitoring-Programm „Maßnahmenerprobung“ dargestellt.

Zur Bearbeitung der beiden Forschungsfragen (Beitrag kleiner bis mittelgroßer Krankenhäuser hinsichtlich des Eintrags von Antibiotika-resistenter Bakterien sowie Wirksamkeit der weitergehenden Abwasserbehandlung) wurden zwei Monitoring-Programme entwickelt: Das erste Monitoring-Programm („Klinikabwasser“) bezieht sich auf das Klinikabwasser aus dem Elisabethkrankenhaus Grevenbroich und dem Marien-Hospital Euskirchen, sowie das kommunale Abwasser der jeweils nachgeschalteten EV-Kläranlagen (KA Grevenbroich bzw. GWK Euskirchen-Kessenich). Diese Standorte sind in Abbildung 1 rot markiert. Das zweite Monitoring-Programm („Maßnahmenerprobung“) analysiert verschiedene EV-Kläranlagen mit weitergehender Abwasserbehandlung. Im Falle der KA Glessen sowie des GWK Kaarst-Nordkanal ist dies das Membranbioreaktor-Verfahren (MBR-Verfahren). Der KA Rheinbach ist hingegen ein Retentionsbodenfilter mit granulierter Aktivkohle (RBF+) nachgeschaltet. Diese Standorte sind in Abbildung 1 als grüne Punkte markiert. In den folgenden Abschnitten werden die genannten Standorte für die beiden Monitoring-Programme detailliert beschrieben. Tabelle 1 gibt einen Überblick über alle Probenahmestellen und die Anzahl der untersuchten Proben (n=208).

Tabelle 1: Übersicht über die Monitoring-Programme sowie die zugehörigen Probenahmestellen im ARA-Projekt.

Monitoring-Programm	Probenahmestelle	Zeitraum	Proben
Klinikabwasser	Krankenhaus Grevenbroich	11/2020 - 03/2022	8
	KA Grevenbroich	11/2020 - 11/2021	16
	Krankenhaus Euskirchen	03/2022 - 02/2023	8
	GWK Euskirchen-Kessenich	03/2022 - 02/2023	16
Maßnahmenerprobung	GWK Kaarst-Nordkanal	11/2020 - 11/2021	16
	KA Glessen	02/2022 - 11/2022	23
	RBF Rheinbach Segment 1 (inkl. Schichten)	09/2020 - 01/2023	32
	RBF Rheinbach Segment 2 (inkl. Schichten)	09/2020 - 01/2023	32
	RBF Rheinbach Segment 3 (inkl. Schichten)	08/2020 - 01/2023	32
	RBF Mischwasserabschläge	09/2020 - 10/2022	25
Gesamt		08/2020 - 02/2023	208

2.1.1 Klinikabwasser

Im Krankenhaus-Kostendämpfungsgesetz (KHG) (1981), werden Krankenhäuser von den Ländern in den Krankenhausplänen in vier Versorgungsstufen (Grund-, Regel-, Schwerpunkt- und Maximalversorgung) eingeteilt. Die Zuweisung der Versorgungsstufen orientiert sich an allgemeinen Vorgaben wie einer Mindestanzahl von Fachabteilungen sowie einer Mindestanzahl und Qualifikation des ärztlichen Personals (Malzahn et al., 2018). Dabei werden insbesondere Einrichtungen der Grundversorgung (251-350 Betten), Regelversorgung (351-650 Betten) sowie Maximalversorgung (ab 651 Betten) unterschieden (weiterführende Details können dem Glossar in Kapitel 6 entnommen werden). Im Forschungsprojekt HyReKA wurden das Klinikabwasser eines Maximalversorgers auf antibiotische Wirkstoffe, Antibiotika-

resistente Bakterien sowie Antibiotikasesistenzgene untersucht. Den weitaus größten Teil der stationären medizinischen Versorgung (ca. zwei Drittel aller Einrichtungen) in Deutschland stellen jedoch die kleineren und mittelgroßen Krankenhäuser der Grund- und Regelversorgung bereit (Bund, 2023). Diese Krankenhäuser produzieren somit auch den größten Teil des in Deutschland anfallenden Klinikabwassers. Aufbauend auf den Ergebnissen von HyReKA wurden im ARA-Projekt daher die Abwässer zweier Krankenhäuser der Grund- und Regelversorgung untersucht.

Das Marien-Hospital Euskirchen ist ein Krankenhaus der Regelversorgung mit 465 Betten und gleichzeitig Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Bonn. Jährlich werden ca. 16.000 Patienten stationär und 26.000 Patienten ambulant behandelt (Marien-Hospital, 2023). Es wurden acht Beprobungen des Klinikabwassers unmittelbar an der Einleitstelle in das städtische Kanalnetz durchgeführt. Über das kommunale Abwassernetz wird das Abwasser des Krankenhauses in das GWK Euskirchen-Kessenich eingeleitet. Das GWK Euskirchen-Kessenich besitzt eine Ausbaugröße von 132.000 EW. Tatsächlich angeschlossen sind 104.086 EW, was einem Auslastungsgrad der Anlage von rund 80 % entspricht. Im Jahr 2022 wurden im GWK Euskirchen-Kessenich insgesamt 9.957.577 m³ Abwasser behandelt (Erftverband, 2023). Neben dem Abwasser des Marien-Hospitals nimmt das GWK Euskirchen-Kessenich außerdem Abwasser einer Fachklinik für Psychiatrie und Psychotherapie mit 175 Betten auf, für das jedoch keine signifikant erhöhte Belastung mit Antibiotika und Antibiotikaresistenten Bakterien zu erwarten ist. Weiterhin sind dem Erftverband mehrere Pflegeheime im Einzugsgebiet des GWK mit insgesamt 542 Betten bekannt (Stand 2018).

Das GWK Euskirchen-Kessenich ist eine konventionelle Kläranlage mit drei Klärstufen. Die eingesetzte Verfahrenstechnik zur Abwasserbehandlung umfasst einen Feinrechen, einen belüfteten Sand- und Fettfang, zwei Vorklärbecken, eine im Teilstrom betriebene biologische Phosphorelimination, eine chemische Phosphorelimination, eine dreistufige Kaskade zur Denitrifikation/Nitrifikation nach dem Belebtschlammverfahren, vier Nachklärbecken und eine Sandfiltration (Erftverband, 2023). Es wurden je acht Probenahmen am Zulauf (zwischen Rechen- und Sandfang) und Ablauf (nach der abschließenden Sandfiltration) der Anlage durchgeführt. Ein Überblick über die Verfahrenskette des GWK Euskirchen-Kessenich und die Lage der Probenahmestellen findet sich im Anhang. Während des Monitoring-Zeitraums wurde Prozessabwasser aus der Lebensmittelindustrie (Molkerei der Firma Hochwald) in die Vorklärung des GWK Euskirchen-Kessenich eingeleitet. Dementsprechend ist zwischen Zu- und Ablauf-Probenahmestelle von einer Verdünnung mikrobieller Fäkalindikatoren wie *E.coli* und Medikamentenrückständen auszugehen, welche aber im Anbetracht der eingebrachten Abwassermengen nur moderat ausfallen sollte.

Das zweite untersuchte Krankenhaus der Grund- und Regelversorgung ist das Rheinland Klinikum Elisabethkrankenhaus Grevenbroich mit 308 Betten im Rhein-Kreis Neuss (Bund, 2023). Es wurden acht Beprobungen des Klinikabwassers an einer von mehreren Einleitstellen in das städtische Kanalnetz durchgeführt. Das Abwasser des Krankenhauses wird ebenfalls über das kommunale Abwassernetz in eine kommunale Kläranlage eingeleitet. Die behandelnde Kläranlage ist die KA Grevenbroich mit einer Ausbaugröße von 97.100 EW. Tatsächlich angeschlossen sind 70.558 EW, was einer Auslastung der Anlage von rund 73 % entspricht. Im Jahr 2022 behandelte die Kläranlage eine Gesamtabwassermenge von 3.418.883 m³ (Erftverband, 2023). Neben dem Elisabethkrankenhaus sind dem Erftverband im Einzugsgebiet der KA Grevenbroich mehrere Pflegeheime mit insgesamt 609 Betten bekannt (Stand 2018). Die auf der Kläranlage eingesetzte Verfahrenstechnik umfasst einen Feinrechen, einen belüfteten Sand- und Fettfang, ein Vorklärbecken, eine im Teilstrom

betriebene biologische Phosphorelimination, eine chemische Phosphorelimination, eine dreistufigen Kaskade zur Denitrifikation/Nitrifikation nach dem Belebtschlammverfahren und drei Nachklärbecken (Erftverband, 2023). Es wurden je acht Probenahmen am Zulauf (vor dem Rechen) und Ablauf (nach der Nachklärung) der Anlage durchgeführt. Die Zulaufprobenahme erfolgte hier vor (anstatt nach) dem Rechen, um eine Beeinflussung durch rückgeleitetes Prozesswasser aus der Schlammmentwässerung der Kläranlage auszuschließen. Ein Überblick über die Verfahrenskette auf der KA Grevenbroich und die Lage der Probenahmestellen findet sich im Anhang.

Da das Elisabethkrankenhaus in Grevenbroich sein Abwasser an mehreren Punkten ins städtische Kanalnetz einleitet, wurden vor Beginn der eigentlichen Monitoring-Kampagne qualifizierte Abwasser-Stichproben an den verschiedenen Einleitpunkten entnommen und auf (Antibiotika-resistente) Bakterien untersucht. Diese Voruntersuchung diente der Festlegung einer Probenahmestelle. Auswahlkriterien waren die Gesamtbelastung der qualifizierten Stichprobe mit (Antibiotika-resistenten) Bakterien sowie die Zugänglichkeit der Einleitstelle für automatisierte Abwasserprobenahmen (siehe Abschnitt 2.2.2). Die ausgewählte Probenahmestelle liegt an einem Schmutzwasserstrang des städtischen Kanalnetzes, der neben dem Klinikabwasser auch häusliches Abwasser von zwei Privathaushalten ableitet. Das an dieser Position beprobte Klinikabwasser stammt hauptsächlich aus Patientenzimmern verschiedener Flügel des Krankenhausgebäudes. Aufgrund fehlender Bestandspläne des Krankenhauses konnte die genaue Herkunft des beprobten Abwassers aber nur grob mithilfe einer Uranin-Tracer-Untersuchung und einer Kamerabefahrung bestimmt werden. Ein unbekannter weiterer Anteil des Klinikabwassers wird in einen Stauraumkanal geleitet. Das Klinikabwasser aus beiden Strängen vereinigt sich erst unterhalb dieses Stauraumkanals, dort allerdings verdünnt in größeren Mengen kommunalen Abwassers, so dass eine vollständige Erfassung des reinen Klinikabwassers an einer einzelnen Probenahmestelle nicht möglich war. Anders verhält es sich für das Marien-Hospital Euskirchen: Hier konnte das gesamte Klinikabwasser an einer Stelle im Kanalnetz beprobt werden, wenn auch bei stärkerem Niederschlag potentiell durch einen Regenüberlauf im Kanalnetz beeinflusst. Eine Beeinflussung durch Regenwasser ist nicht für alle Probenahmetage auszuschließen; eine Beeinflussung durch häusliches Abwasser ist dagegen nicht möglich.

2.1.2 Maßnahmenprobung

Beim Membranbioreaktor-Verfahren (MBR-Verfahren, auch Membranbelebungsverfahren) wird anstelle des Nachklärbeckens eine Filtereinheit in Form einer Membran zur Abscheidung des Belebtschlammes vom Abwasser verwendet. Für das Rückhaltevermögen der Filtereinheit ist die Membranporenweite ausschlaggebend. Die Entfernung von Bakterienzellen erfordert eine Ultrafiltration, d.h. eine Porenweite von nicht mehr als 0,1 µm (DWA, 2014). Grundsätzlich lassen sich zwei Arten des MBR-Verfahrens unterscheiden: getauchte oder externe Filtereinheiten. Bei der getauchten Verfahrensvariante kommen Platten oder Hohlfasern (Durchmesser 0,5-2,0 mm) zum Einsatz (Gujer, 1999). Der Betrieb der Membranen benötigt unterschiedliche Transmembrandrücke. Diese hängen größtenteils mit der verwendeten Porengröße zusammen und erhöhen den Energieaufwand gegenüber der Belüftung einer konventionellen biologischen Reinigungsstufe um ca. 10 - 20 % (Resch and Schatz, 2020).

Der Erftverband betreibt insgesamt drei Kläranlagen mit Membranbelebungen, wovon zwei in der Monitoring-Kampagne des ARA-Projektes berücksichtigt wurden. Das 2004 in Betrieb genommene GWK Kaarst-Nordkanal besitzt eine Ausbaugröße von 80.000 EW. Tatsächlich angeschlossen sind knapp 67.920 EW, was einer Auslastung von ca. 85 % entspricht. Insgesamt wurde im Jahr 2022 eine Gesamtabwassermenge von 4.925.030 m³ behandelt. Im

Einzugsgebiet des GWK Kaarst-Nordkanal gibt es keine Krankenhäuser der Grund-, oder Regel- oder Maximalversorgung (d.h. das Abwasser ist klinisch unbeeinflusst), wobei dem Erftverband mehrere Pflegeheime mit einer Gesamtbettenzahl von 290 bekannt sind (Stand 2018). Die auf der Kläranlage eingesetzte Verfahrenstechnik umfasst einen Feinrechen, einen belüfteten Sand- und Fettfang, ein Vorklärbecken, eine Siebung, eine chemische Phosphorelimination, sowie eine achtstraßige Nitrifikation/Denitrifikation nach dem Belebtschlammverfahren mit abschließender Membranfiltration (Erftverband, 2023). Es wurden je acht Probenahmen am Zulauf (zwischen Rechen- und Sandfang) und Ablauf (nach der Membranfiltration) der Anlage durchgeführt. Die Membranen verfügen über eine Porenweite von 0,04 µm und sind direkt in die Belebtschichten getaucht. Die deutlich kleinere KA Glessen wird seit 2008 nach dem MBR-Verfahren betrieben. Sie besitzt eine Ausbaugröße von 9.000 EW. Tatsächlich angeschlossen sind 7.724 EW, was einer Auslastung von ca. 86 % entspricht. Insgesamt wurden im Jahr 2022 rund 697.037 m³ Abwasser in der KA Glessen behandelt. Im Einzugsgebiet der KA Glessen gibt es keine Krankenhäuser der Grund-, Regel oder Maximalversorgung, dem Erftverband sind zudem keine größeren Pflegeheime bekannt (Stand 2018). Das Abwasser durchläuft auf der Kläranlage einen Feinrechen, einen belüfteten Sand- und Fettfang, eine Feinsiebung, eine chemische Phosphorelimination, ein Umlaufbecken zur Nitrifikation/Denitrifikation sowie eine abschließende, in separaten Becken untergebrachte Membranfiltration mit einer Porenweite von 0,04 µm (Erftverband, 2023). Es wurden je acht Probenahmen am Zulauf (nach der Siebung) sowie Ablauf (nach der Membranfiltration) der Anlage durchgeführt. Die Zulaufprobenahme erfolgte hier nach der Siebung, da das gesammelte Zulaufwasser der Kläranlage erst an dieser Stelle für eine Probenahme zugänglich war. Ergänzend wurden acht Proben am Ablauf einer im Teilstrom betriebenen Versuchsanlage zur Spurenstoffelimination mittels GAK-Filtration genommen. Die GAK-Filtration ist der Membranfiltration nachgeschaltet. Ein Überblick über die Verfahrenskette sowohl des GWK Kaarst-Nordkanal als auch der KA Glessen mit der Lage der Probenahmestellen findet sich im Anhang.

Seit 2019 betreibt der Erftverband in Rheinbach einen in seiner Funktionsweise bisher einmaligen Retentionsbodenfilter (RBF+). Im Unterschied zu herkömmlichen Retentionsbodenfiltern ist dem Filtermaterial beim RBF+ granuliertes Aktivkohle (GAK) zum Rückhalt organischer Spurenstoffe beigefügt. Der RBF+ reinigt sowohl (zur weitergehenden Abwasserbehandlung) das aus der KA Rheinbach abfließende Abwasser als auch im Falle von Starkniederschlägen abgeschlagenes Mischwasser aus den Regenüberlaufbecken der Anlage. Nach bisheriger Betriebserfahrung kommt es je nach Witterungsverhältnissen an ca. 10-20 Tagen im Jahr zu einem Mischwasserabschlag auf die Filterfläche. Um im durchgehenden Kläranlagenbetrieb die für den Betrieb wichtigen aeroben Bedingungen im Filtersubstrat aufrechtzuerhalten, ist die Filterfläche in drei Segmente unterteilt, die alternierend mit dem Kläranlagenablauf beschickt werden. In Mischwasserentlastungsfällen wird die gesamte Filterfläche eingestaut (siehe Abbildung 2).

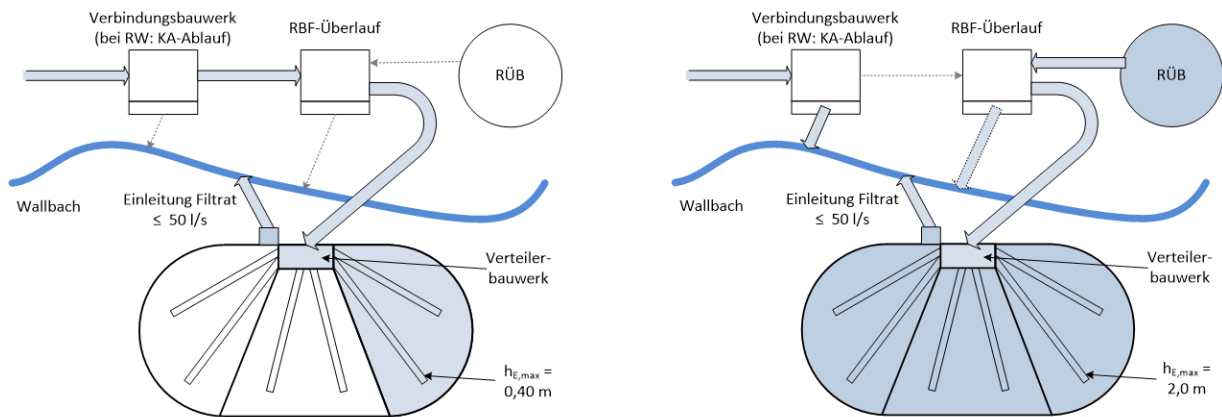


Abbildung 2: Schematische Darstellung der beiden Betriebsarten des RBF+ in Rheinbach.

Links: Routine-Betrieb zur weitergehenden Behandlung des Kläranlagenablaufs. Rechts: Behandlung von abgeschlagenem Mischwasser aus dem Regenüberlaufbecken der KA Rheinbach bei Regenwetter (Mischwasserabschläge an ca. 10-20 Tagen im Jahr).

Durch das eigens konzipierte, im RBF+ baulich integrierte Monitoring-System lässt sich über Steigrohre im Filterkörper neben Zu- und Ablauf auch das Sickerwasser in den einzelnen Filtersegmenten in verschiedenen Tiefen sowie Abständen vom Zulauf beproben. Den Filtersegmenten ist die GAK dabei in unterschiedlichen Anteilen beigefügt, so dass deren Effekt systematisch beurteilt werden kann: Segment 1 besteht über die gesamte Tiefe (1 m) aus Filtersand (mit 20 % CaCO_3). Den Segmenten 2 und 3 sind darüber hinaus in den obersten 10 cm des Filterkörpers 20 % GAK sowie in den untersten 30 cm nochmals 30 % bzw. 40 % GAK beigemischt. Für das ARA-Projekt wurden sowohl Zulauf als auch Ablauf aller drei RBF-Segmente beprobt. Zu ausgewählten Terminen wurden zusätzlich Proben aus dem RBF-Filterkörper genommen (zulaufnah und -fern, aus drei verschiedenen Tiefen). Die dem RBF vorgeschaltete KA Rheinbach besitzt eine Ausbaugröße von 27.000 EW. Tatsächlich angeschlossen sind 25.045 EW, was einer Auslastung von rund 93 % entspricht. Im Jahr 2022 wurde eine Gesamtabwassermenge von 1.820.180 m^3 gereinigt. Im Einzugsgebiet der KA Rheinbach gibt es keine Krankenhäuser der Grund-, Regel- oder Maximalversorgung (d.h. das Abwasser ist klinisch unbeeinflusst), wobei dem Erftverband mehrere Pflegeheime mit insgesamt 387 Betten (Stand 2018) sowie ein medizinisches Versorgungszentrum mit chirurgischem Schwerpunkt bekannt sind. Die auf der Kläranlage eingesetzte Verfahrenstechnik umfasst einen Feinrechen, einen belüfteten Sand- und Fettfang, ein Vorklärbecken, eine chemische Phosphorelimination, eine 3-stufige Kaskade zur Nitrifikation/Denitrifikation nach dem Belebtschlammverfahren, zwei Nachklärbecken sowie eine Sandfiltration (Erftverband, 2023). Zusätzlich zur Probenahme am RBF Rheinbach wurden für die Datenauswertung ergänzend Ergebnisse aus dem HyReKA-Projekt zur Belastung des KA-Zulaufs (zwischen Rechen und Sandfang) sowie KA-Ablaufs (nach der Sandfiltration) herangezogen. Ein Überblick über die Verfahrenskette auf der KA Rheinbach mit dem RBF+ und die Lage der Probenahmestellen findet sich im Anhang.

2.2 Probenahme und Analysemethoden

2.2.1 Allgemeines

In ARA wurden die Proben auf hygienisch-mikrobiologische und chemische Parameter untersucht. Die Messwerte zur Mikrobiologie und Wasserchemie wurden für eine gemeinsame Interpretation immer aus der gleichen Probe ermittelt. Zur Probenahme gehörten der Transport und die Lagerung der Probe mit ununterbrochener Kühlkette (Details siehe unten). Die mikrobiologische Probenuntersuchung begann dabei immer innerhalb von 24 Stunden nach Beendigung der (Misch-)Probenahme. Bei der Beprobung der KA-Zuläufe und KA-Abläufe blieb die hydraulische Aufenthaltszeit des Abwassers in der Anlage unberücksichtigt, das heißt die Messergebnisse an den Zu- und Abläufen können auf Einzelprobenbasis nicht direkt miteinander verglichen werden.

2.2.2 Probenahme

In der Regel wurden die Proben zur repräsentativen Erfassung von Tagesgängen und Stoßbelastungen als Mischproben entnommen. Dies umfasst im Wesentlichen zeitproportionale 24h-Mischproben und – im Falle von Mischwasserentlastungen am RBF Rheinbach – Ereignismischproben, die mit Hilfe von automatischen Probenahmegeräten entnommen wurden (siehe Abbildung 3). Die Beprobung des RBF-Filterkörpers im Regelbetrieb wurde mithilfe einer Tauchpumpe aus den in Kapitel 2.1.2 genannten Steigrohren vorgenommen. Obwohl es sich hierbei technisch um Stichproben handelt, ist von einer durch Filterbeschickung, Einstau und Versickerung bedingten Vereinheitlichung stofflicher Dynamiken auszugehen.

Für die Entnahme von 24h-Mischproben wurden die Probenahmegeräte so eingestellt, dass Einzelproben in einem Zeitintervall von 5 Minuten gezogen und direkt zur Mischprobe vereinigt wurden. Das Probenahmegerät am Zulauf der Kläranlage Glessen musste aufgrund eines Defekts der Dosiervorrichtung auf ein größeres Probenahmeintervall von 15 Minuten eingestellt werden. Die Probenahme an Zu- und Ablauf der beprobten Kläranlagen bzw. im Kanalnetz an den Klinikeinleitungen begann und endete jeweils um 12 Uhr mittags. Die Probenahme am Zulauf des RBF Rheinbach begann und endete mit Start bzw. Ende der Filterbeschickung (d.h. 24 Stunden Mischprobe). Die Probenahme an den Abläufen des RBF war an die Laufzeit der Pumpen im jeweiligen Ablaufbauwerk gekoppelt und wurde ca. 12 Stunden nach Ende der Filterbeschickung abgebrochen. Dies ermöglichte die Erfassung desselben Wassers wie am RBF-Zulauf, wobei die Probenahmedauer aufgrund der verlängerten Aufenthaltszeit des Wassers und des Nachlaufens aus dem Filterkörper deutlich über 24 Stunden hinausreichte. Abweichend von allen anderen Mischproben wurden die Proben der Mischwasserabschläge am RBF mit einem Probenahmeintervall von 2 Minuten über einem maximalen Zeitraum von 8 Stunden entnommen. Auslöser für den Start der

Ereignisprobenahme war das Erreichen der Abschlagsschwelle in den Regenüberlaufbecken der Kläranlage Rheinbach.



Abbildung 3: Automatische Probenahmegeräte der Firma WaterSam für die drei Abläufe des RBF+ Rheinbach.

Im geöffneten Schrank auf der rechten Seite sind die Dosiervorrichtung und die verwendeten Sammelgefäße zu sehen.

Zum Auffangen der meisten 24h-Mischproben wurde ein Glasbecken verwendet (vgl. Abbildung 3, rechts). Dieses wurde vor jeder Beprobung desinfiziert und gereinigt. Zur Desinfektion wurde die gesamte Innenwandfläche des Glasbeckens mit einem Ethanol/Wasser-Gemisch (70/30 Vol.-%) benetzt. Nach mehrminütiger Einwirkzeit des Desinfektionsmittels wurde das Glasbecken mit vollständig entionisiertem Wasser ausgespült. Die Klinikabwasserproben aus dem Kanalnetz wurden in 12 autoklavierten 0,5 l-Gläsern aufgefangen und in einem desinfizierten Edelstahlimer vereinigt. Die Ereignismischproben am Retentionsbodenfilter wurden in 12x1l-Gläsern aufgefangen (siehe Abbildung 3 im geöffneten Schrank links) und ebenfalls in einem desinfizierten Glas- oder Edelstahlimer vereinigt. Nach jedem beprobten Mischwasserabschlag wurden die Gläser durch einen gereinigten und im Autoklaven sterilisierten Flaschensatz ausgetauscht. Die Temperatur im Innenraum der Probenahmegeräte wurde bis zur Probenabholung konstant auf 4-6 °C gehalten. Ausnahme waren die mobilen, batteriebetriebenen und explosionsgeschützten Probenahmegeräte, welche wegen der besonderen Umstände an den Klinikeinleitungen in das Kanalnetz verwendet wurden; diese verfügten nicht über eine aktive Kühlung.

Vor dem Abfüllen wurde die Mischprobe durch vorsichtiges Rühren homogenisiert. Mit einem desinfizierten Edelstahlbehälter wurden Probenaliquote in die in Tabelle 2 aufgelisteten Probenahmeflaschen gefüllt. Zur Probenkonservierung waren in diesen Flaschen zum Teil Salz- bzw. Salpetersäure vorgelegt (siehe Tabelle 2). Für die Bestimmung von gelösten Schwermetallgehalten wurde ein Probenaliquot vor Ort vorfiltriert (kombinierter Spritzenvorsatzfilter mit einer Ausschlussgröße von 1,2 µm und 0,45 µm, abweichend für Rohabwasser Spritzenvorsatzfilter mit einer Ausschlussgröße von 1,0 µm). Um eine Kontamination und Verschleppung von Probengut zu vermeiden, wurden für Rohabwasser und behandeltes Abwasser unterschiedliche Ausrüstungssätze zum Abfüllen der Probe verwendet (bestehend jeweils aus einem Edelstahlbottich, Einzelspritze, Spritzenvorsatzfilter und Rührstab). Die Proben wurden unter stetiger Kühlung innerhalb von 24 Stunden nach Beendigung der Probenahme zur weiteren Untersuchung in die Laboratorien des

Erftverbandes (chemische Untersuchungen) bzw. des IHPH (mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen) transportiert.

Tabelle 2: Probenahmeflaschen für das ARA-Monitoringprogramm.

Parameter	Flaschentyp	Volumen [ml]	Bemerkung
Organische Spurenstoffe	Braunglas	1.000	
Mikrobiologie/ Molekularbiologie	PET	1.000	Steril
TOC/DOC	Klarglas	250	Mit 2ml HCl (25%) angesäuert
Ammonium/Orthophosphat	Klarglas	100	
Metalle gelöst	PET	250	Mit 1ml HNO ₃ (32,5%) angesäuert
Nitrit/ Nitrat	PET	250	
Metalle/Reserve	PET	2.000	

In Ausnahmefällen (bei kurzfristigem Ausfall eines Probenahmegerätes) sind Proben auch als qualifizierte Stichprobe statt 24h-Mischprobe entnommen worden. Eine qualifizierte Stichprobe ist nach DIN 38402-11:2009-2 eine „Sonderform einer Mischprobe, bestehend aus mindestens fünf Stichproben, die in einem Zeitraum von höchstens 2 h im Abstand von nicht weniger als 2 min entnommen und gemischt werden“. Für die hier untersuchten Proben wurden 5 Stichproben mit gleichen Volumina in einem Abstand von je 2 Minuten genommen (DIN 38402-11:2009-2). Zur Mischung und Homogenisierung der Stichproben wurde ein desinfiziertes Sammelgefäß aus Glas oder Edelstahl genutzt.

Abweichend von den Vorgaben der DIN EN ISO 19458 „Wasserbeschaffenheit – Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen“ (DIN EN ISO 19458:2006) wurden in ARA 24h-Mischproben mithilfe automatisierter Probenahmegeräte genommen, für die nicht alle mit dem Probengut in Kontakt kommenden Anlagenteile vor jeder Probenahme desinfiziert werden konnten. Dies betrifft insbesondere die Zuleitungen zu den Probenahmegeräten. Aus diesem Grund wurden vergleichende Begleitversuche durchgeführt, um eine Probenkontamination durch die eingesetzte Probenahmetechnik auszuschließen bzw. bei den Ergebnissen zu berücksichtigen. Dazu wurde an einem bestehenden Probenahmegerät (am Zulauf des RBF+) ein spezielles Probenahmeprogramm eingestellt, welches im Wesentlichen einer verkürzten Variante des oben beschriebenen, allgemeinen Projektprogramms entspricht. Mithilfe dieses Programms wurde über einen Zeitraum von einer Stunde im 5-Minuten-Intervall jeweils 25 ml Probe automatisiert aus dem Zulaufschacht des RBF+ entnommen und zu einer „simulierten“ Mischprobe vereinigt. Zeitgleich wurde je ein Probenaliquot mit desinfiziertem Schöpfer und sterilen Spritzen in gleichbleibenden Volumina manuell aus dem Schacht entnommen und in einem sterilen Probenahmegefäß zu einer korrespondierenden Kontrollprobe vereinigt. Eine Auswertung der Ergebnisse dieser Kontrollversuche findet sich in Kapitel 3.2.

2.2.3 Chemische Parameter

Die Untersuchung der Wasserproben auf Antibiotika geschah im Labor des Erftverbandes per Massenspektrometer mit vorgeschalteter Gaschromatographie (DIN EN ISO 15913:2003) bzw. Flüssigchromatographie (DIN EN ISO 15913:2003 und DIN EN ISO 21676:2022). Dabei wurden die Proben für die Gaschromatographie per Festphasenextraktion vorangereichert; die

Flüssigchromatographie erfolgte hingegen nach Direktinjektion der Probe. Insgesamt wurde auf diese Weise eine Gesamtzahl von 20 verschiedenen antibiotischen Wirkstoffen aus 9 verschiedenen Wirkstoffklassen untersucht (siehe Tabelle 3). Als Biozid kommt der Desinfektionsmittelwirkstoff Triclosan mit einer Berichtsgrenze von 0,02 µg/l hinzu.

Tabelle 3: Im Projekt untersuchte Antibiotika.

Wirkstoffklasse	Wirkstoff	Berichtsgrenze [µg/l]
B-Lactame	Meropenem*†	0,10
	Piperacillin*†	0,10
Diaminopyrimidine	Trimethoprim	0,05
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	0,20
	Moxifloxacin*	0,10
	Ofloxacin*	0,20
Lincosamide	Clindamycin	0,10**
Makrolide	Azithromycin	0,10**
	Clarithromycin	0,10**
	Erythromycin	0,20
	Roxithromycin	0,10**
Nitroimidazole	Metronidazol*†	0,10
Oxazolidinone	Linezolid*†	0,10
Sulfonamide	Sulfadiazin	0,05
	Sulfadimidin	0,05
	Sulfamethoxazol	0,05
Tetracycline	Doxycyclin	0,20
	Chlortetracyclin	0,20
	Oxytetracyclin	0,20
	Tetracyclin	0,20

*Ab Juni 2021 im Parameterkanon enthalten

**Ab Juni 2021 halbierte Berichtsgrenze (statt 0,20 µg/l)

† Wirkstoff insbesondere im Klinikabwasser zu erwarten

2.2.4 Mikro- und molekularbiologische Parameter

Quantitative Bestimmung mikrobiologischer Parameter mittels kultureller Verfahren:

Um eine hygienisch-mikrobiologische Bewertung der Proben durchzuführen, wurden verschiedene Indikatorparameter in Kulturverfahren quantifiziert. Die Festlegung der Verfahren und Methoden erfolgte in Abstimmung mit dem LANUV NRW. Festgelegt wurden *Escherichia coli* (DIN EN ISO 9308-3:1999), intestinale Enterokokken (DIN EN ISO 7899-1:1999) als bakterielle Fäkal-Indikatoren, somatische Coliphagen (ISO 10705-2, 2000) als Virenindikatoren und Sulfat-reduzierende Sporenbildner mit Bestimmung von *C. perfringens* (in Anlehnung an DIN EN ISO 14189:2013) als Indikatoren für die Anwesenheit von Protozoen-Dauerformen. Die Methode wurde modifiziert, indem die saure Phosphatase durch die Zugabe

eines *C. perfringens* Selektiv-Supplements (Fa. Merck, Art.-Nr.: 1008880010) nachgewiesen wird.

Des Weiteren wurden acht verschiedene ESBL-produzierende Gram-negative Bakterienarten als Zielorganismen ausgewählt; Gram-negative ESBL-produzierende Bakterien der Arten *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. (Im Folgenden als KEC gruppiert) und *E. coli*, sowie *Pseudomonas* spp. und *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. und *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*-Komplex, die jeweils eine Resistenz gegen ein Cephalosporin der 3. Generation (3GCR) zeigen. Die Gattungen *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. und *Citrobacter* spp. wachsen morphologisch sehr ähnlich auf dem verwendeten CHROMagar ESBL und sind deshalb nicht unbedingt direkt voneinander zu unterscheiden. Da nicht jede Einzelkolonie hinsichtlich der tatsächlichen Gattung untersucht werden konnte, werden diese Gattungen für die Konzentrationsangaben als Gruppenparameter ESBL-produzierende KEC betrachtet. Außerdem wurden in den einzelnen Proben die Konzentration von Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) bestimmt. Die kulturellen Nachweise wurden nach (Schreiber et al., 2021) durchgeführt und sind im Folgenden näher beschrieben.

Die Kolonien auf CHROMagar ESBL (Mast Diagnostika GmbH, Reinfeld) wurden anhand ihrer spezifischen Färbungen laut Herstellerangabe in verschiedene Gruppen eingeteilt: (1) rot für *E. coli*, (2) türkis/metallisch-blau bis violett für KEC und (3/4) weiß-creme bzw. durchsichtig-creme bis grünlich für *Acinetobacter* spp. bzw. *Pseudomonas* spp. Zusätzlich zur Färbung wurden die Kolonien basierend auf ihrer weiteren Morphologie (Größe, Form, Oberflächenbeschaffenheit) untergruppiert. Mindestens eine Kolonie jeder Untergruppe wurde auf Columbia-Blutagar (Oxoid, Wesel) über Ösenausstrich überimpft und bei 36 ± 1 °C für 21 ± 3 Stunden inkubiert, um das Wachstum einzelner Kolonien in Reinkultur zu erzielen. Die Gruppierungen (1-4) der Isolate bestimmten die weitere Charakterisierung der physiologischen Merkmale der Isolate. Die endgültige Artbestätigung erfolgte mittels Matrix-assistierter Laser-Desorption/Ionisation-Time-of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS; Biotyper Microflex, Bruker Daltonics, Bremen) für jedes abgeimpfte Isolat. Dem MALDI-TOF-MS war die Datenbank der Software MALDI Biotyper MBT Compass (Version 4.1.100) zugeordnet, welche das Ergebnis zur Identifikation der Isolate automatisiert auswertet.

Die verdächtigen Isolate der Gruppe (1) wurden auf Chromocult Coliformen (CC)-Agar (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) inkubiert und bei dunkelblau-violetter Färbung während des Wachstums als *E. coli* bestätigt. Isolate der Gruppen (2), (3) und (4) wurden mittels Oxidase-Teststäbchen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) auf das Vorhandensein des Enzyms Cytochrom-c-Oxidase untersucht. Kolonien der Gruppe (2), die sich als Oxidase-negativ erwiesen und anschließend pink-rotes Wachstum auf CC-Agar zeigten, wurden als Vertreter der KEC-Gruppe identifiziert.

Die Isolate der Gruppen (3, 4) wurden aufgrund ihrer ähnlichen Morphologie zunächst mittels Oxidase-Test in *Pseudomonas* spp. (Oxidase positiv, Gruppe 3) und *Acinetobacter* spp. (Oxidase negativ, Gruppe 4) verdächtig unterteilt. Die *Pseudomonas* spp. verdächtigen Isolate wurden nach DIN EN ISO 16266-2 auf Ceftrimid-Agar (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) überimpft und bei Fluoreszenz unter UV-Licht als *Pseudomonas* spp. bestätigt. Die artspezifische Identifikation von *P. aeruginosa* erfolgte nach DIN EN ISO 16266-2 über die Produktion von Ammoniak beim Abbau von Acetamid.

Acinetobacter spp. verdächtige Isolate (4), bei denen kein Nachweis der Katalaseaktivität erfolgte, wurden von der weiteren Differenzierung und Bestätigung ausgeschlossen. Die finale Gattungs- und Artbestätigung erfolgte mittels MALDI-TOF-MS für jedes abgeimpfte Isolat der Gruppe 4, die eine positive Reaktion bei der Katalaseaktivität gezeigt haben. Die Einteilung

nach MALDI-TOF-MS Verifizierung erfolgte nach *Acinetobacter* spp. und *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*-Komplex.

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii-Komplex bezieht sich auf eine Gruppe von Bakterien, die in der Gattung *Acinetobacter* klassifiziert sind. Diese Bakterien sind morphologisch und biochemisch ähnlich und umfassen mehrere Arten, die eng miteinander verwandt sind. *Acinetobacter calcoaceticus* war ursprünglich eine eigenständige Art innerhalb der Gattung *Acinetobacter*, welche später genetisch und taxonomisch als Teil eines komplexeren Bakterienkomplexes eingestuft wurde (Chang et al., 2005). *Acinetobacter baumannii* ist ebenfalls eine Bakterienart innerhalb der Gattung *Acinetobacter*, die für ihre klinische Relevanz bekannt ist, insbesondere in Bezug auf nosokomiale Infektionen und Antibiotikaresistenzen (Lee et al., 2014). Da diese Bakterien sehr eng miteinander verwandt sind und viele gemeinsame Merkmale aufweisen, werden sie aufgrund der schwierigen Unterscheidung als „Komplex“ bezeichnet (Vijayakumar et al., 2014). Es ist wichtig zu beachten, dass innerhalb dieses Komplexes verschiedene genetische und phänotypische Varianten existieren können, die sich in ihrem Verhalten und ihren Eigenschaften unterscheiden können, aber dennoch eng miteinander verwandt sind.

Für den Nachweis von VRE wurden die Proben verdünnt oder über Cellulosenitratfilter aufkonzentriert auf CHROMagar VRE (Mast Diagnostika GmbH, Reinfeld) aufgebracht und bei 42 ± 1 °C für 48h inkubiert. Pink bis violett gefärbte Kolonien auf CHROMagar VRE wurden auf Blutagar ausgestrichen um Reinkulturen zu erhalten. Bei typischem Wachstum in Form von sehr kleinen, metallisch-grau gefärbten Kolonien mit dunklem Rand (Herstellerangabe) wurde je eine Kolonie der Reinkultur auf Galle-Äsculin Agar überführt und bei Schwarzfärbung des Agars als *Enterococcus faecalis* bzw. *E. faecium* verdächtig zur Verifizierung mittels MALDI-TOF-MS gegeben.

Zellmaterial der Reinisolate, die mittels MALDI-TOF-MS final bestätigt wurden, wurden in mit Glycerin angereicherter CASO-Fertigbouillon (Merck) bei -80 °C zur späteren Resistenzanalyse konserviert.

Phänotypische Resistenzcharakterisierung der Bakterienisolate:

Für alle Umweltisolate, die zum *A. calcoaceticus-baumannii*-Komplex, zu den *Enterobacterales* und *P. aeruginosa* gehörten, wurden Antibiotika-Empfindlichkeitstests zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) durchgeführt. Unter Betrachtung dieser Ergebnisse wurden die Isolate zusätzlich dem Status 3MRGN bzw. 4MRGN zugeordnet, wenn eine Multiresistenz besteht.

Die kulturelle Resistenzbestimmung erfolgte mittels Bouillon-Mikrodilutionsverfahren des „MERLIN“-Mikronaut Systems (Bruker Daltonics, Bremen) und zugehörigen *Micronaut S-MDR* MRGN Screening-96-Well-Testplatten für die Analyse Gram-negativer Bakterien. Die Erreger wurden nach ihrem phänotypischen Resistenzprofil und der Verifizierung mittels MALDI-TOF-MS über die *MCN6*-Software automatisiert ermittelten Antibiotogramme gemäß DIN EN ISO 20776-1-2 in mg / L, sowie nach den Kriterien des *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, in der Version V9.0) charakterisiert (Sib et al., 2019). Die Einstufung der Multiresistenz erfolgte über die KRINKO-Empfehlung, welche zur Interpretation von MHK-Befunden in deutschen Laboren, sowie bei der Umsetzung von Hygienemaßnahmen in medizinischen Einrichtungen bei Infektionen durch Besiedlung mit diesen Erregern Verwendung findet. In dieser Empfehlung sind vier Antibiotikaklassen klinischer Relevanz mit ihren Leitsubstanzen festgelegt (Tabelle 4). Für Erreger mit Resistenzen gegen mehr als zwei dieser Antibiotikagruppen wurde die Klassifizierung 3MRGN bzw. 4MRGN (Multiresistente

Gram-negative Stäbchen mit Resistenz gegen drei bzw. vier der definierten Antibiotikaklassen) eingeführt (KRINKO, 2019, 2012). Außerdem wird ein Isolat, welches eine Carbapenemase besitzt, unabhängig von der phänotypischen Resistenz gegen die getesteten Antibiotika als 4MRGN eingestuft (KRINKO, 2019).

Tabelle 4: Antibiotikaklassen und Leitsubstanzen nach KRINKO 2012.

Antibiotikagruppe	Leitsubstanz
Acylureidopenicilline	Piperacillin(/Tazobactam) ²
3./4. Generation Cephalosporine	Cefotaxime und / oder Ceftazidime
Carbapeneme	Meropenem und / oder Imipenem
Fluorchinolone	Ciprofloxacin

Genotypischer Nachweis der Carbapenemase in Bakterienisolaten mittels qPCR:

Der qualitative Nachweis erfolgte über die Detektion von sechs Carbapenemaseklassen (GIM, KPC, NDM, OXA-48 und VIM) nach Sib et al. (2020). Die Primer wurden von Metabion, Martinsried, bezogen und die entsprechenden Sequenzen wurden nach Swayne et al. (2013) synthetisiert (Tabelle 5). Der Nachweis der Carbapenemasen erfolgte mittels PCR in 35 Zyklen. Die Rohdaten wurden lediglich nach Anwesenheit und Abwesenheit der entsprechenden Sequenzen in dem Extrakt des Isolats bestimmt. Die DNA-Extraktion wurde durchgeführt, indem drei Einzelkolonien in 100 µl nukleasefreiem Wasser suspendiert und 15 Minuten lang auf 95 °C erhitzt wurden, gefolgt von einer Zentrifugation bei 14.000 g für 15 Minuten. 50 µL des Überstandes wurde vorsichtig entfernt und bei -20°C bis zur PCR-Analyse gelagert. Spezifische PCR-Primer und Sonden, die zur Erkennung von Resistenzgenen verwendet wurden, sind in

Tabelle 5 aufgeführt (Swayne et al. 2013). Die Sonden waren mit verschiedenen Kombinationen von fluoreszierenden und Black-Hole-Quencher-R[®]-Farbstoffen markiert, was eine Multiplex-PCR (Microsynth, Balgach, Schweiz) von vier Genen in einem einzigen Assay ermöglichte.

Die Reaktionsmischung wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers hergestellt und enthielt 0,25 µM jedes Primers und 0,125 µM jeder Sonde. Dazu wurden 2 µl der extrahierten Probe hinzugefügt. Die Zyklusbedingungen wurden auf 95°C für 120 Sekunden eingestellt (Initiale Denaturierung), gefolgt von 35 Zyklen bei 95°C für 5 Sekunden (Denaturierung) und 60°C für 30 Sekunden (Primerhybridisierung/Elongation). Nur Stämme, die innerhalb der ersten 30 Zyklen ein positives Signal lieferten, wurden als positiv für das untersuchte Resistenzgen gezählt.

² Die Verwendung von Piperacillin/Tazobactam ist eine Abwandlung der von der KRINKO definierten Regeln, die nur Piperacillin beinhaltet. Es wird jedoch nicht als Einzelmedikament in der Klinik eingesetzt (KRINKO, 2019, 2012).

Tabelle 5: Primersequenzen der Carbapenemasegene. Sequenzen der Oligonukleotide und Taq-Man (5'-3')-Sonden der Primer des GIM-Targetgens bzw. TaqMan-Sonde (nach Swayne et al., 2013). R= Reverse, F= Forward, S= Sonde.

Gen	Primer	Sequenz 5'-3', 5' Reporter-Farbstoff, 3' Quencher
GIM	GIM-F	TTG GTC TGA AGA AGA CAC GAA G
	GIM-R	GTA GGA ACC GGC TTT CCT T
	GIM-S	Quasar705-ATC GCA CTG CTG GTA TCA AGT TGC TA-BHQ-2
KPC	KPC-F	GCA GCG GCA GCA GTT TGT TGA TT
	KPC-R	GTA GAC GGC CAA CAC AAT AGG TGC
	KPC-S	CY5-CAG TCG GAG ACA AAA CCG GAA CCT GC-BHQ3
bla _{NDM}	NDM-F	CCC GAC GAT TGG CCA
	NDM-R	ATC CAG TTG AGG ATC TGG GC
	NDM-S	ROX-ACC GAA TGT CTG GCA GCA CAC TTC-BHQ-2
OXA-48	OXA-48-F	TTC GGC CAC GGA GCA AAT CAG
	OXA-48-R	GAT GTG GGC ATA TCC ATA TTC ATC GCA
	OXA-48-S	ROX-CTG GCT GCG CTC CGA TAC GTG TAA CTT ATT G-BHQ2
bla _{VIM}	VIM-F	GAT GAG TTG CTT TTG ATT GAT ACA GC
	VIM-R	CCG ACK CGR TCG TCA T
	VIM-S	FAM-TCG CGG AGA TTG ARA AGC AAA TTG GA-BHQ-1

Quantitative Bestimmung von Resistenzgenen innerhalb der Abwassermatrizes:

Auch die Auswahl der zu bestimmenden Resistenzgene und die Extraktionsmethode wurde mit dem LANUV NRW abgestimmt. Kriterien für die Festlegung umfassten (i) Resistenzen gegenüber Reserveantibiotika, (ii) solche Resistenzen, die häufig genug in den untersuchenden Matrizen zu finden sind, damit eine Aussage über die Reduktion möglich ist, sowie (iii) Resistenzen, die auf mobilen Elementen verankert sind und zwischen Bakterien übertragen werden können. Die zu bestimmenden Resistenzgene wurden nach einer Literaturrecherche zu Vorkommen und Relevanz, sowie nach den Ergebnissen aus HyReKA begründet und festgelegt. Alle Proben wurden auf die klinisch-relevanten Resistenzgene *mcr-1*, *bla_{TEM}*, *bla_{NDM-1}* und *ermB* quantitativ untersucht, die in Abwasser unterschiedliche Abundanz aufwiesen. Zudem wurde die Konzentration des 16S rRNA-Gens bestimmt, um die Konzentrationen der Resistenzgene zu normalisieren. Die Genkonzentration jedes ARGs und des 16S rRNA-Gens wurden in Gene Units (GU) pro 100mL angegeben. Wenn eine

Normalisierung über die 16S rRNA durchgeführt wurde, wurde das Ergebnis als Anteil an 16S rRNA-Genen angegeben.

Damit die Werte der Resistenzgene mit den Daten aus dem HyReKA Projekt vergleichbar sind, wurde das Abwasser mit Aquadien™ Bacterial DNA Extraction and Purification Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen) unter Verwendung der W2 Wash Solution (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen) nach dem Herstellerprotokoll für die qPCR aufbereitet. Je nach Partikelbelastung wurden 10 bis 100 ml der Probe über Membranfilter aufkonzentriert. Nach Extraktion der DNA wurden die 100 µL-Eluate (im Folgenden Extrakte genannt) bei mindestens -20 °C bis zur anschließenden Resistenzgenanalyse per qPCR konserviert.

Tabelle 6: Gene für die Quantifizierung mittels qPCR.

Die Primer und Sonden wurden bei Life Technologies GmbH bezogen (entsprechenden Katalognummern und Assay-IDs sind angegeben).

Gene	Article number	Assay-ID
16S rRNA	A50137	Ba04930791_s1
<i>mcr-1</i>	A50136	Ba07320002_s1
<i>bla_{TEM}</i>	4331182	Ba04646128_s1
<i>ermB</i>	A50133	Ba04230913_s1
<i>bla_{NDM-1}</i>	A50136	Ba04931076_s1

Um eine gültige Quantifizierung der ARGs in den Proben sicherzustellen und falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, wurde eine interne positiv-Kontrolle (IPC) mitgeführt. PCR-Inhibitoren können in Abwasserproben enthalten sein, dazu zählen u.a. Säuren, Detergenzien und organischen Lösungsmittel. In diesem Projekt wurden VetMAX™Xeno™IPC-Produkte verwendet (Life Technologies GmbH, Darmstadt), die aus einem synthetischen DNA-Fragment und einer entsprechenden Primer/Probe-Mischung (Assay) bestehen. Die Detektion der IPC erfolgt in Verbindung mit einem Zielgen, dass nicht alle dNTPs im Mastermix erschöpfen würde. Zu diesem Zweck wurde das *mcr-1* Gen ausgewählt. Die IPC-Detektion wurde im VIC-Fluorophor-Kanal durchgeführt.

Jedes Resistenzgen wurde mittels qPCR individuell quantifiziert. Dazu wurde für jede Einzelreaktion eine Reaktionslösung bestehend aus 10 µL TaqMan™ Fast Advanced Master Mix³ oder the TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix⁴, sowie 1 µL des jeweiligen ARG Assays (Tabelle 6, Life Technologies GmbH, Darmstadt) und 7 µL RNase-freies Wasser vorbereitet und 18 µL dieses in jedes erforderliche Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 2 µL des jeweiligen Extrakts, als Duplikate, hinzugefügt. Falls nötig, wurden Verdünnungen für die Proben angewendet, die in Vorversuchen ermittelt wurden. Für jede qPCR wurden zwei Negativ-Kontrollen (2µL RNase-freies Wasser) eingesetzt, um mögliche Kontaminationen auszuschließen. Zur Quantifizierung der Ct-Werte der ARGs wurden Standards in Duplikaten in jeder qPCR mitgeführt. Hierfür wurde der "Applied Biosystems™ TaqMan™ Comprehensive Microbiota Control" (Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet, der einen Pool von linearisierten Multi-Target-Plasmiden mit mikrobiellen Zielsequenzen in einer Konzentration von 1 x 10⁵ GU/µL enthält. Der

³ Für die Bestimmung der ARGs

⁴ Für die Bestimmung des 16S rRNA-Gens

Comprehensive Microbiota Control (CMC) wurde um den Faktor 10 seriell verdünnt, bis eine Konzentration erreicht wurde, die bis zu 1×10^2 GU/ μ L reichte.

Die genetischen Targets wurden mittels qPCR in jeweils 40 Zyklen amplifiziert (Tabelle 7). Nach dem qPCR-Lauf wurden die Ct-Werte mithilfe der CFX Maestro™ Software (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen) untersucht und ausgewertet. Die Daten aus dem qPCR-Lauf wurden anschließend extrahiert und mit Microsoft Excel ausgewertet. Die Auswertung der Ziel-ARG jeder Probe erfolgte anhand der Ct-Werte aus dem FAM-Kanal. Eine Standardkurve wurde unter Verwendung der TaqMan™ CMC-Standards erstellt, um die Genkonzentration zu bestimmen.

Tabelle 7: qPCR-Protokoll zur Resistenzgenanalyse der Abwassermatrix für alle Targets.

Zyklusschritte	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	60	1
Denaturierung	95	1	40
Primerhybridisierung (Annealing) / Elongation	60	20	

In dem Reaktionsgemisch zur Bestimmung des *mcr-1* Gens wurde so jeweils 1 μ L der VetMAX™Xeno™IPC DNA (1.000 GU/ μ L) und 0,8 μ L des VetMAX™ Xeno™ IPC - VIC™ Assays hinzugefügt. Die Amplifikation der Multiplex-Reaktionen erfolgt unter denselben Reaktionsbedingungen wie Tabelle 7 beschrieben. Zusätzlich zu den üblichen zu messenden Fluoreszenzkanälen FAM und ROX wurde auch VIC aktiviert, um die IPC-Signale zu identifizieren. Nach dem qPCR-Lauf wurde zunächst überprüft, ob in den Proben Inhibitoren enthalten sind. Zu diesem Zweck wurden die Ct-Werte im VIC-Kanal analysiert. Die Ct-Werte der NTCs wurden jeweils als sog. IPC-Schwellenwerte herangezogen, mit einer Abweichungstoleranz von 1,5 Ct-Werten wurden die Proben bezüglich der Anwesenheit von Inhibitoren bewertet. Wenn die durchschnittlichen Ct-Werte der Proben innerhalb dieser Schwellenwerte lagen, wurden sie als nicht inhibiert eingestuft. Wenn jedoch der IPC-Schwellenwert überschritten oder nicht erreicht wurde, wurden die Proben als inhibiert betrachtet. Letztere Proben wurden dann verdünnt erneut in die qPCR eingesetzt.

Tabelle 8: LOD95% der qPCR-Ansätze zur absoluten Quantifizierung der untersuchten Resistenzgene.

Die Konfidenzintervalle (Vertrauensbereiche) geben statistisch berechnete Bereiche an, in denen sich die jeweiligen LOD95%-Werte mit der festgelegten Wahrscheinlichkeit befinden.

Gen	LOD ₉₅ [GU/2 μ L Extrakt]	Konfidenzintervall [GU/2 μ L Extrakt]
<i>mcr-1</i>	4,7	3,0; 7,3
<i>bla_{NDM-1}</i>	7,5	5,0; 11,3
<i>bla_{TEM}</i>	7,7	5,1; 11,6
<i>ermB</i>	4,2	2,7; 6,5
16S rRNA	1 Kopie/ μ L*	-

* Bestimmt durch Reagenzien der Hersteller.

Für die Etablierung der Methode wurden die Leitlinien zur Einzellabor-Validierung qualitativer real-time PCR-Methoden des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit⁵ befolgt. In diesem Rahmen wurden auch die Gen-spezifischen Nachweisgrenzen (Limit of detection = LOD) bestimmt (Tabelle 8). Die Nachweisgrenze wird im Allgemeinen als die Konzentration der Ziel-DNA verstanden, bei der mindestens mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,95 in der qPCR ein Amplifikationsprodukt detektiert wird (LOD₉₅). Angegeben sind die LOD₉₅ hier für eine Reaktion in der qPCR, die 2µL Extrakt enthält. Damit wird die LOD unabhängig vom aufbereiteten (Ab-)wasservolumen angegeben.

2.2.5 Datenauswertung und Ergebnisdarstellung

Die Darstellung der im Labor bestimmten Konzentrationen an AB, Indikatororganismen, ARB und ARG erfolgt in Form der einzelnen Datenpunkte, ergänzt um eine 5-Punkte-Zusammenfassung mittels Box-Whisker-Plots (kurz: Boxplots). Boxplots eignen sich sehr gut zur vergleichenden Darstellung wesentlicher Gruppenmerkmale in einem mindestens ordinalskalierten Datensatz. Dies gilt insbesondere bei kleinen Datenumfängen, dem Vorhandensein extremer Ausreißer sowie Asymmetrien und Ungleichmäßigkeiten in der zugrundeliegenden Häufigkeitsverteilung (Krzywinski and Altman, 2014). Die dargestellten Merkmale sind Median, erstes und drittes Quartil sowie Minimum und Maximum der gemessenen Konzentrationen. Der Median wird dabei als Strich in einer Box dargestellt, die vom ersten und dritten Quartil begrenzt wird, d.h. die Box zeigt den Interquartilsabstand an (dieser enthält die „mittleren“ 50 % aller Daten). Minimum und Maximum des Datensatzes werden durch die Whisker (oder Antennen) dargestellt, welche sich an die beiden Enden der Box anschließen. Bei weniger als fünf Datenpunkten (entsprechend der fünf dargestellten Merkmale) wird im ARA-Bericht auf die Zeichnung eines Boxplots verzichtet. Es ist in diesem Zusammenhang wichtig zu betonen, dass die 5-Punkte-Zusammenfassung in Form eines Boxplots nur ein Werkzeug der deskriptiven Statistik ist. Das bedeutet, dass Boxplots zwar die erhobenen Datensätze (d.h. statistische Stichproben) beschreiben, allerdings keine Interpretation hinsichtlich ihrer Verallgemeinerbarkeit und Repräsentativität für die zugrundeliegende Grundgesamtheit zulassen. Auch wenn im ARA-Projekt insgesamt sehr gute Vorkehrungen zur Erhebung repräsentativer Messdaten vorgenommen worden sind, kann aus statistischer Sicht nie vollständig ausgeschlossen werden, dass z.B. ein aus Messdaten bestimmter Konzentrationsmedian zufällig vom „wahren“ Konzentrationsmedian abweicht. Kapitel 4.3.1 enthält hierzu eine Diskussion der Messdaten bezüglich ihrer Repräsentativität.

Aus Gründen der Messgenauigkeit können bei der Spurenstoffanalytik und bei der qPCR unterhalb eines gewissen Wertes (je nach Kontext Berichts-, Bestimmungs- oder Nachweisgrenze) Konzentrationen nicht mehr sicher bestimmt werden. Aus statistischer Sicht handelt es sich um sogenannte linkszensierte Daten, welche in diesem Bericht mithilfe zensierter Boxplots dargestellt werden. Das bedeutet, dass jeder Boxplot unterhalb des jeweils größten anzuwendenden Grenzwertes abgeschnitten wird. Auf diese Weise wird einerseits verhindert, dass der Boxplot Auskunft über Verteilungsmerkmale gibt, die aufgrund der Begrenzung der Messgenauigkeit unbekannt sind (dies betrifft gegebenenfalls auch den Interquartilsabstand, wenn das erste Quartil unterhalb des anzuwendenden Grenzwertes liegt). Andererseits gibt der Boxplot auf diese Weise auch eine grobe Einordnung über den Anteil der unbekanntem Werte im Datensatz. Ist beispielsweise der Boxplot zwischen erstem

⁵https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Untersuchungen/Leitlinien%20zur%20Einzellabor%20Validierung.html

Quartil und Median abgeschnitten, ist dies gleichbedeutend mit einem Anteil unbekannter Messwerte zwischen 25 und 50 %. Die übrigen 50 bis 75 % der Datenpunkte sind dann die sogenannten Positivbefunde. Für die Antibiotika werden die Anteile der Positivbefunde zusätzlich in Form von Heatmaps dargestellt, d.h. farblich codiert in einem zweidimensionalen Raster, welches durch die untersuchten Wirkstoffe sowie die jeweils betrachteten Probenahmestellen aufgespannt wird. Für die Darstellung der Konzentrationen werden danach nur die Wirkstoffe mit den größten Befundanteilen berücksichtigt.

3. Ergebnisse

3.1 Limitationen des kulturellen Nachweises von Antibiotika-resistenten Bakterien

Kulturelle Nachweisverfahren sind ein seit langem angewendeter Ansatz zur Identifizierung von Mikroorganismen in verschiedenen Proben, einschließlich Abwasser und Proben mit einer diversen mikrobiellen Zusammensetzung. Diese Methoden basieren darauf, dass Mikroorganismen in speziellen Nährmedien, unter definierten Wachstumsbedingungen kultiviert werden, oft auch gekoppelt mit spezifischen Enzymreaktion und morphologischen Eigenschaften, um die Identifizierung zu erleichtern. Jedoch sind gerade kulturelle Nachweise nicht frei von Limitationen, besonders wenn es um die Untersuchung von spezifischen Volumina und das Vorhandensein von Nicht-Zielorganismen geht. In Proben mit reichhaltiger mikrobieller Zusammensetzung können Überlagerungseffekte auftreten, wodurch das Wachstum bestimmter Arten unterdrückt wird.

Tabelle 9: Prozentualer Anteil der kategorischen Ergebnisse der mikrobiellen Parameter ESBL-produzierende *E. coli*, ESBL-produzierende KEC und VRE auf Resistenz-Agar.

Für unbehandeltes Abwasser (n=48), Abwasser nach konventioneller Klärung (n=47) und Abwasser nach weiterer Behandlung (n=47), resultierend aus den Nachweisgrenzen der größten zu untersuchenden Mengen.

Konzentrationskategorie [KBE/100ml]	Probenart/ Matrix	Anteil an Proben [%]		
		ESBL- prod. <i>E. coli</i>	ESBL- prod. KEC	VRE
<100	Rohabwasser	0,0	0,0	0,0
	Nach konventioneller Behandlung	0,0	0,0	6,4
	Nach weiterer Behandlung	0,0	0,0	2,1
<1.000	Rohabwasser	0,0	0,0	2,1
	Nach konventioneller Behandlung	0,0	2,1	0,0
	Nach weiterer Behandlung	0,0	0,0	0,0
<10.000	Rohabwasser	10,4	0,0	0,0
	Nach konventioneller Behandlung	0,0	0,0	0,0
	Nach weiterer Behandlung	0,0	0,0	0,0
<X*	Rohabwasser	4,2	8,3	6,3
	Nach konventioneller Behandlung	14,9	25,5	14,9
	Nach weiterer Behandlung	14,9	2,1	2,11
Gesamt	Alle Proben	14,8	12,7	11,3

*Werte die nach DIN EN ISO 8199:2021 als Einzelbefunde zu bewerten sind und nicht hochgerechnet wurden. Das bedeutet positiver Nachweis ohne Konzentrationswert.

Die im ARA-Projekt angewandte Methode zum Nachweis der Antibiotika-resistenten Bakterien wurde im Projekt HyReKA etabliert und durch Schreiber et al. (2021) publiziert, dort wurde eine ausführliche Auswertung der Qualitätsdaten unter Berücksichtigung des HyReKA-Datensatzes durchgeführt. Schreiber et al. (2021) berechneten Anteile an Kategorie-Werten für das Referenzvolumen 100 mL für die HyReKA Proben, die gleiche Betrachtung wurde hier analog für den ARA-Datensatz durchgeführt; dies ist in den Tabelle 9 und Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Prozentualer Anteil der kategorischen Ergebnisse der Parameter *Pseudomonas* spp. 3GCR, *P. aeruginosa* 3GCR, *Acinetobacter* spp. 3GCR und *A. calcoaceticus-baumannii*-Komplex 3GCR auf Resistenz-Agar.

Für unbehandeltem Abwasser (n=48), Abwasser nach konventioneller Klärung (n=47) und Abwasser nach weiterer Behandlung (n=47), resultierend aus den Nachweisgrenzen der größten zu untersuchenden Mengen.

Konzentrations-kategorie [KBE/100ml]	Probenart/ Matrix	Anteil an Proben [%]	
		<i>Pseudomonas</i> spp. 3GCR (<i>P. aeruginosa</i> 3GCR)	<i>Acinetobacter</i> spp. 3GCR (<i>A. calcoaceticus-baumannii</i> -Komplex 3GCR)
<100	Rohabwasser	2,1 (0,0)	0,0 (0,0)
	Nach konventioneller Behandlung	2,1 (14,9)	0,0 (0,0)
	Nach weiterer Behandlung	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<1.000	Rohabwasser	6,3 (31,3)	18,8 (41,7)
	Nach konventioneller Behandlung	0,0 (0,0)	2,0 (2,0)
	Nach weiterer Behandlung	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<10.000	Rohabwasser	6,3 (16,7)	27,1 (27,1)
	Nach konventioneller Behandlung	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
	Nach weiterer Behandlung	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
<X*	Rohabwasser	22,9 (22,9)	16,7 (8,3)
	Nach konventioneller Behandlung	36,0 (17,0)	21,0 (19,0)
	Nach weiterer Behandlung	21,0 (9,0)	9,0 (6,0)
Gesamt	Alle Proben	32,4 (37,3)	31,7 (35,2)

*Werte die nach DIN EN ISO 8199 als Einzelbefunde zu bewerten sind und nicht hochgerechnet wurden. Das bedeutet positiver Nachweis ohne Konzentrationswert

Hintergrund dazu ist, dass für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ein Wert immer auf das gleiche Volumen bezogen werden muss. Bei der Betrachtung der mikrobiologischen Beschaffenheit ist dieses Referenzvolumen meist 100 mL, deshalb wird dieses Referenzvolumen auch im ARA-Projekt angestrebt. In der Praxis wird das untersuchbare Wasserproben-Volumen allerdings durch den individuellen Verschmutzungsgrad mit Begleitflora und Schwebstoffen begrenzt. Auch die Konzentrationen der Zielbakterien variierten zwischen den verschiedenen Probenahmestellen, nicht nur in Bezug auf die

Probenmatrix (unbehandeltes Abwasser, behandeltes Abwasser), sondern auch innerhalb einer Matrix an unterschiedlichen Probenahmestellen. Daher mussten die geeigneten Verdünnungen für die Analysen je Probenahmestelle individuell getestet und bestimmt werden.

Proben aus dem Zulauf von Kläranlagen enthielten viel mehr organische Partikel und Zielorganismen als Proben aus dem Ablauf der Kläranlagen. Die Kläranlagenzulauf-Proben mussten deshalb verdünnt werden, um analysierbare Ergebnisse zu erhalten. Proben aus dem Kläranlagenablauf oder nach weitergehender Abwasserbehandlung enthielten weniger organisches Material und konnten unverdünnt in 1 mL oder auch nach Aufkonzentration durch Filtration in Volumina von 10 mL oder 100 mL (je nach Schwebstoffgehalt und Trübung) untersucht werden. Ein negatives Ergebnis in allen von mindestens drei parallel getesteten Verdünnungen einer Probe führte zu kategorischen Resultaten von <100 KBE/100 mL bei Ausplattierung von 1 mL unverdünnter Probe, sowie <1.000 KBE/100 mL, wenn die Probe um nicht mehr als 1:10 verdünnt worden war. Die Häufigkeit solcher semi-quantitativen Ergebnisse beeinflusst die Qualität der Analyse und wurde hier für die Probenotypen (Rohabwasser, nach konventioneller Behandlung und nach weiterer Behandlung) getrennt betrachtet (Tabelle 9 und Tabelle 10).

Neben den Kategorie-Werten, die sich durch einen fehlenden Nachweis in den untersuchten Volumina bzw. Verdünnungen ergeben, sind in dem Datensatz zusätzlich Befunde vorhanden, die zwar positiv sind, aber keinen Konzentrationswert enthalten. Hintergrund dazu ist die DIN EN ISO 8199 „Wasserbeschaffenheit - Allgemeine Anforderungen und Anleitung für mikrobiologische Untersuchungen mittels Kulturverfahren“, diese DIN ist allgemein bei der Auswertung mikrobiologischer Untersuchungen von Wasser anzuwenden, sie legt den Fokus bei der Angabe des Ergebnisses auf bestmögliche statistische Sicherheit der angegebenen Konzentration. Deshalb wird dort vorgeschrieben, wie mikrobiologische Proben angesetzt und Ergebnisse ausgewertet werden müssen. Dazu werden die Proben in mindestens drei Verdünnungsstufen bzw. Aufkonzentrationen im Verhältnis 1:10 auf Platten aufgebracht, damit mindestens zwei Stufen auswertbar sind. Zur Bewertung und Angabe des Ergebnisses sollen Werte ≥ 10 KBE zur Berechnung herangezogen werden können. Wenn dies nicht möglich ist, dürfen, mit einer größeren Unsicherheit, auch Werte zwischen 3 und 9 KBE pro Platte verwendet werden. Die ISO schreibt vor, dass Werte <3 KBE nicht für die Berechnung einer Konzentration verwendet werden dürfen, weil diese mikrobiologisch als Zufallsbefunde zu bewerten sind und das Ergebnis mit einer zu hohen Unsicherheit behaftet wäre. Die Daten des ARA-Projektes enthalten nach diesen Vorgaben außerdem je nach Probenmatrix und Parameter unterschiedlich oft eine Angabe <X. Dies bedeutet einen positiven Nachweis des mikrobiologischen Parameters ohne eine Konzentrationsangabe.

Tabelle 9 zeigt die Anteile der semi-quantitativen Ergebnisklassen am gesamten Datensatz für die Gruppe von Zielspezies ESBL-produzierende *E. coli*, ESBL- produzierende KEC und VRE bzw. Probenkategorie und Tabelle 10 die gleiche Auswertung für die Zielspezies *Pseudomonas* spp. 3GCR, *P. aeruginosa* 3GCR, *Acinetobacter* spp. 3GCR und *A. calcoaceticus-baumannii*-Komplex 3GCR. Für den Parameter ESBL-produzierende *E. coli* musste in 10,4 % der Rohabwasserproben ein Wert von <10.000 KBE/100mL angegeben werden, da die Begleitflora in den Untersuchungsvolumina den Nachweis des Zielorganismus nicht zuließ. Für den Parameter ESBL-produzierende KEC waren es 2,1 % der Kategorie <1.000 KBE/100mL in der Probenmatrix „nach konventioneller Behandlung“. Bei dem Parameter VRE konnte bei den Rohabwasser Proben in 2,1 % der Proben lediglich ein Wert von <1.000 KBE/100mL angegeben werden, nach konventioneller Behandlung waren es

6,4 % der Proben mit einem Befund von <100 KBE/100mL und nach weiterer Behandlung 2,1 %. In Tabelle 9 ist außerdem angegeben, in welchem Anteil je Probenmatrix ein positiver Nachweis angegeben wurde, ohne eine Konzentration zu berechnen, weil diese mit einer zu hohen Unsicherheit belastet wäre. Dabei zeigt nicht unbedingt das Rohabwasser die größte Unsicherheit. Für die Parameter ESBL-produzierende *E. coli*, ESBL-produzierende KEC und VRE konnte in 4,2 %, 8,3 % bzw. 6,3 % der Rohabwasserproben kein Konzentrationswert angegeben werden. Für die Matrix „nach konventioneller Behandlung“ lagen die Anteile mit 14,9 %, 25,5 % bzw. 14,9 % höher. Insgesamt macht das für die Parameter 11,3 % (VRE) bis 14,8 % (ESBL-prod. *E. coli*) der Proben aus.

Die präzise Differenzierung zwischen den *Pseudomonas* spp. 3GCR und *Acinetobacter* spp. 3GCR und eine Abgrenzung zur Begleitflora auf CHROMAgar ESBL ist durch ihre Morphologie (weiß bis creme/champagnerfarben) erschwert. Für die Parameter *Pseudomonas* spp. 3GCR (*P. aeruginosa* 3GCR) und *Acinetobacter* spp. 3GCR (*A. calcoaceticus-baumannii*-Komplex 3GCR) waren die Anteile an Kategorie-Werten (Tabelle 10) höher als bei den Parametern ESBL-produzierende *E. coli*, ESBL-produzierende KEC und VRE. Insgesamt konnten in mehr als 30 % der Proben keine definitive und statistisch abgesicherte Konzentration für die Parameter *Pseudomonas* spp. 3GCR und *Acinetobacter* spp. 3GCR angegeben werden. Kategorie-Werte von <1.000 KBE/100mL mussten für 6,3 % bzw. 18,8 % der Rohabwasserproben angegeben werden. Bei 2,1 % der Proben von konventionell behandeltem Abwassers konnten nur Werte <100 KBE/100mL bestimmt werden.

Der weitaus größte Anteil an fehlenden Konzentrationswerten kommt dadurch zustande, dass lediglich Einzelkolonien als *Pseudomonas* spp. 3GCR und *Acinetobacter* spp. 3GCR identifiziert wurden, diese aber nicht statistisch sicher waren. Im Rohabwasser lagen die Anteile bei 22,9 % für *Pseudomonas* spp. 3GCR und *P. aeruginosa* 3GCR, sowie 16,7 % bzw. 8,3 % für *Acinetobacter* spp. 3GCR und *A. calcoaceticus-baumannii*-Komplex 3GCR. Nach konventioneller Behandlung lagen die Werte sogar bei 36,0 % bzw. 17 % für *P. aeruginosa* 3GCR und 21,0 % bzw. 19,0 % für *A. calcoaceticus-baumannii*-Komplex 3GCR. Es ist aber zu beachten, dass die Anzahl der Untersuchungen von Rohabwasser (über Krankenhausabwasser und Zuläufe aller Kläranlagen) deutlich höher ist, als die Anzahl der Untersuchungen von Abwasser nach konventioneller Behandlung (zwei Kläranlagenabläufe).

Da wie gezeigt in mehr als 30 % der Proben kein Konzentrationswert für die Parameter *Pseudomonas* spp. 3GCR bzw. *P. aeruginosa* 3GCR und *Acinetobacter* spp. 3GCR bzw. *A. calcoaceticus-baumannii*-Komplex 3GCR) angegeben werden konnte, wird auf die Auswertung dieser Parameter in diesem Bericht verzichtet.

3.2 Kontrollversuche

Für mikrobiologische Parameter werden oft einzelne oder qualifizierte Stichproben entnommen, da internationale Normen wie die ISO 19458:2006 "Wasserqualität – Probenahme für mikrobiologische Analysen" empfohlene und akzeptable Zeiträume zwischen Probenahme und Analyse enthalten. Die Norm erkennt jedoch auch an, dass es widersprüchliche Beweise bezüglich der genauen Dauer gibt, bei der eine Probe als repräsentativ angesehen werden kann.

Die Entnahme von 24h-Mischproben aus Abwasserbehandlungsanlagen bietet deutliche Vorteile gegenüber Einzelproben. Sie gewährleistet eine vollständige Erfassung der Abwassereigenschaften im Laufe der Zeit, indem sie Schwankungen in der Zusammensetzung

des Einflusses berücksichtigt, einschließlich Trends und Tagesgängen im Einleitgeschehen aus Allgemeinbevölkerung sowie Industrie- und Gewerbe. Sie minimiert außerdem die Auswirkungen von Konzentrationsspitzen einzelner Abwasserinhaltsstoffe, die bei Einzelproben übersehen werden könnten, verkleinert auf diese Weise den Einfluss des Zufalls auf die Messergebnisse und erhöht insgesamt die Repräsentativität der Daten. Da 24h-Mischproben aber eine lange Standzeit der zuerst entnommenen Teilproben nach sich ziehen, unterlaufen Sie zwangsläufig die akzeptablen Stabilitäts- und Lieferzeiten (ISO 19458:2006), insbesondere für den Parameter *E. coli*, bei dem die akzeptierte Zeit bis zur Verarbeitung im Labor mit 18 Stunden angegeben ist. Neben der Frage der Stabilität der mikrobiologischen Parameter wird oft auch die Frage gestellt, ob automatisierte Probennehmer einen direkten Einfluss auf die mikrobiologische Qualität einer Probe haben, da im praktischen Betrieb nicht immer alle Komponenten desinfiziert werden können.

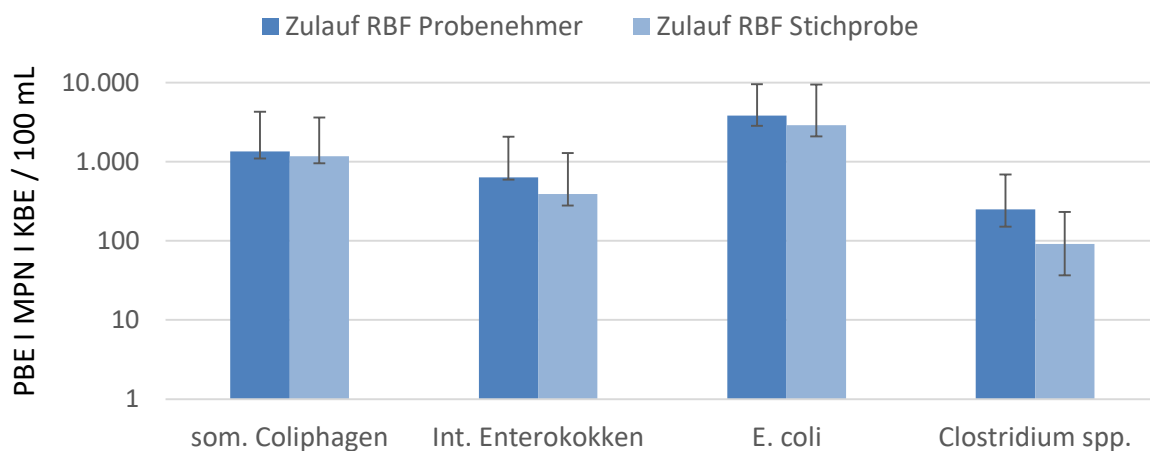


Abbildung 4: Untersuchungen des Einflusses der Verwendung automatisierter Probennehmer auf die Konzentrationen der mikrobiologischen Parameter in einer Probe.

Die durchgeführten Kontrollversuche dienten der Bewertung eines möglichen Eintrags von Kontaminationen durch Teile der Probenahmetechnik und der Bewertung der längeren Lagerzeit der Probe bis zur Verarbeitung im Labor. Die Proben wurden wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben als technische Replikate an drei unterschiedlichen Probenahmetagen entnommen und noch am selben Tag (T0) im Labor auf die Parameter intestinale Enterokokken, *E. coli*, *Clostridium* spp. und somatische Coliphagen untersucht. Um auszuschließen, dass sich die mikrobiologische Beschaffenheit der Proben durch die Lagerungs- und Transportzeit von >24 Stunden im Falle einer 24h-Mischprobe mit anschließendem Transport ins Labor verändert, wurden die Proben nach 24 Stunden (T24) und 48 Stunden (T48) Lagerung bei 4-6°C im Dunkeln (analog zu den automatischen Probennehmern) erneut untersucht.

Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der Einzelparameter an der gleichen Probenahmestelle als manuelle Stichprobe und als Probe aus dem automatischen Probenahmegerät. Dazu wurde jeweils nur die Probe T0 berücksichtigt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Proben geringfügig unterscheiden. Die Differenz der einzelnen Ergebnisse liegen für den Parameter intestinale Enterokokken und somatische Coliphagen im Mittel bei 0,05 Log-Stufen, für den Parameter *E. coli* bei 0,19 Log-Stufen und bei *Clostridium* spp. bei 0,39 Log-Stufen Differenz. Untersuchungen an anderen betrieblichen Probenahmegeräten (Ablauf Vorklärun, Ablauf Kläranlage und RÜB) mit dem Durchfluss von Trinkwasser haben gezeigt, dass alle mikrobiologischen Parameter (inkl. Antibiotika-resistenter Bakterien) nicht nachweisbar waren.

Bei Schwankungen eines Parameters an der gleichen Probenahmestelle (Stichprobe) von 1,04 Log-Stufen bei somatischen Coliphagen, 0,91 Log-Stufen bei intestinalen Enterokokken und *E. coli*, sowie 0,41 Log-Stufen bei *Clostridium* spp. kann ein durch die automatisierte Probenahme entstandener Bias als unkritisch für die in ARA dargestellten Ergebnisse eingestuft werden.

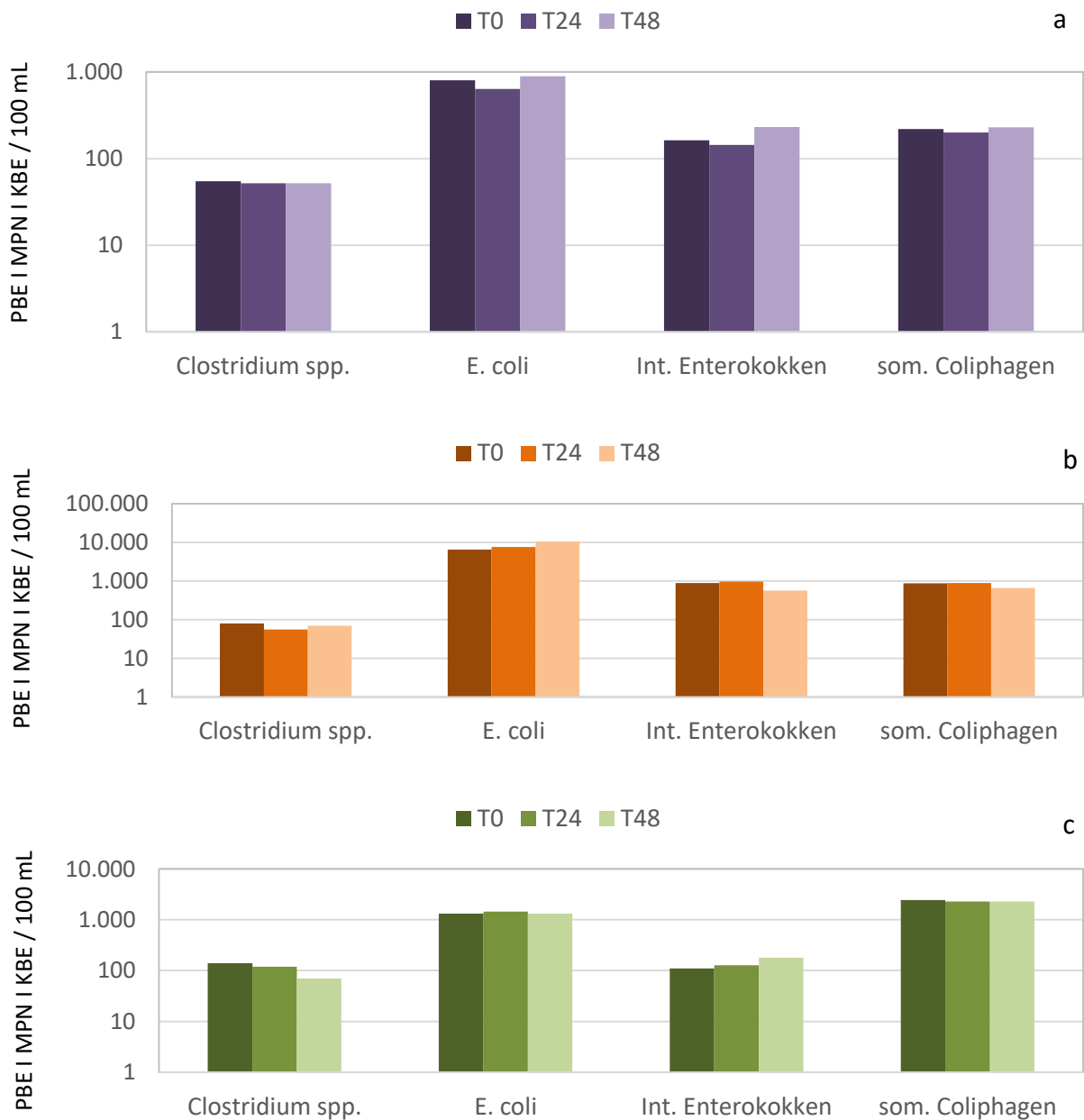


Abbildung 5: Untersuchungen des Einflusses von Standzeiten auf die Konzentrationen der mikrobiologischen Parameter in einer Probe (Triplikate a-c).

Abbildung 5a-c zeigt, dass die Proben hinsichtlich der dargestellten Parameter sogar bis 24 Stunden nach Probenahme stabil bleiben, wenn diese wie beschrieben kühl gelagert werden. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen an T0 bis T48 liegen über die biologischen Triplikate bei 0,02-0,3 Log-Stufen für *Clostridium* spp., für *E. coli* und intestinalen Enterokokken bei 0,04-0,21 Log-Stufen bzw. 0,21-0,24 Log-Stufen und bei somatischen Coliphagen besteht eine Differenz bei den Standzeiten von 0,03-0,13 Log-Stufen.

Ein Einfluss der Lagerung im Probenehmer gekühlt bei 4-6°C und Transport ins Labor mit Einhaltung der Kühlkette kann damit als unkritisch angesehen werden.

3.3 Klinikabwasser

3.3.1 Antibiotika

Abbildung 6 stellt die relative Häufigkeit der Positivbefunde für die 20 untersuchten Antibiotika sowie Triclosan in den klinisch beeinflussten Abwasserproben des ARA-Projektes farblich codiert als Heatmap dar. Ein Positivbefund entspricht einer nachgewiesenen Konzentration oberhalb der in Kapitel 2.2.3 angegebenen Berichtsgrenzen.

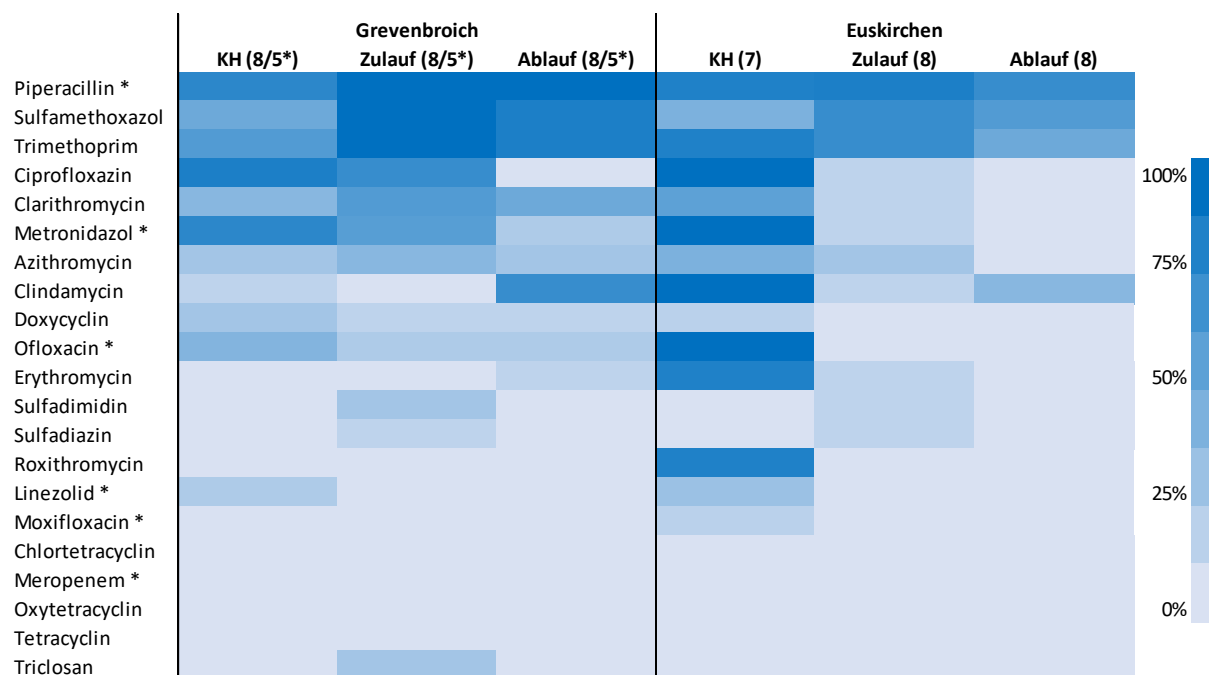


Abbildung 6: Positivbefunde der untersuchten Antibiotika in klinisch beeinflussten Abwässern.

KH = Ablauf Krankenhaus. In Klammern ist die Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben angegeben, die von der jeweiligen Probenahmestelle stammen. In Grevenbroich sind die dem Standardparameterkanon des Ertverbandes hinzugefügten Antibiotika (*) nicht in allen Abwasserproben untersucht worden, so dass sich die Probenzahl für diese Wirkstoffe wie angegeben verringert.

Die Wirkstoffe in Abbildung 6 sind an beiden Standorten (Grevenbroich und Euskirchen) grob nach ihren Befundhäufigkeiten im unbehandelten Klinikabwasser sortiert. Allgemein wurden die Wirkstoffe Piperacillin, Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Ciprofloxacin im unbehandelten Abwasser am häufigsten nachgewiesen. Das Antibiotikum Piperacillin ist ein vornehmlich parenteral (d.h. „am Darm vorbei“, per Injektion oder Infusion direkt in den Blutkreislauf) verabreichtes Reserveantibiotikum, typischerweise zur Behandlung nosokomialer Infektionen. Die hohen Befundhäufigkeiten im klinisch beeinflussten Abwasser sind in dieser Hinsicht plausibel, da sich der Einsatz aus diesen Gründen vornehmlich im klinischen Umfeld abspielt. Meropenem, als Wirkstoff mit einem ähnlichen Anwendungsgebiet vorwiegend im klinischen Umfeld, wurde dagegen weder in Grevenbroich noch in Euskirchen nachgewiesen. Linezolid – ebenfalls ein Reserveantibiotikum im Klinikbereich – wurde an beiden Standorten nur vereinzelt im unverdünnten Klinikabwasser nachgewiesen. Die hohen Befundhäufigkeiten von Sulfamethoxazol, Trimethoprim, Ciprofloxacin, Clindamycin sowie verschiedenen Makrolid-Antibiotika wie Clarithromycin und Azithromycin bestätigen die

Erkenntnisse aus HyReKA: All diese Stoffe werden regelmäßig in kommunalem Rohabwasser (auch ohne Klinikeinfluss) nachgewiesen (Voigt et al., 2020). Sulfamethoxazol und Trimethoprim werden vornehmlich als Kombipräparat vermarktet und angewendet. Der breit auch außerhalb des medizinischen Bereiches eingesetzte Desinfektionsmittelwirkstoff Triclosan wurde trotz empfindlicher Analytik (niedrigste Berichtsgrenze unter allen Wirkstoffen in Abbildung 6 nur am Zulauf der KA Grevenbroich mit relativ geringer Häufigkeit nachgewiesen.

Die Befundanteile in Abbildung 6 deuten auf ein sehr heterogenes Eliminationsverhalten der verschiedenen Wirkstoffe in den beiden konventionellen Kläranlagen (KA Grevenbroich, GWK Euskirchen-Kessenich) hin. Aus HyReKA ist der gute Rückhalt von Ciprofloxazin im Klärprozess bereits bekannt: Obwohl Ciprofloxacin praktisch immer an den Zuläufen der Kläranlagen nachgewiesen wird, wird der Stoff kein einziges Mal an den Abläufen nachgewiesen. Vermutlich wird der Stoff aufgrund seines guten Sorptionsverhaltens (Kümmerer, 2009) mit dem Klärschlamm aus dem Abwasserstrom entzogen. Auch für Metronidazol weist der Vergleich der Befundhäufigkeiten an Zu- und Abläufen auf einen guten Rückhalt im konventionellen Klärprozess hin. Für andere Wirkstoffe, insbesondere Piperacillin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim, ist an beiden Anlagen nur eine kleine Verringerung der Befundhäufigkeiten zwischen Zu- und Ablauf festzustellen. Diese Stoffe können als im Klärprozess weitgehend persistent betrachtet werden. Auffällig ist ein sprunghafter Anstieg der Positivbefunde von Clindamycin im Ablauf beider Kläranlagen, der unter Umständen auf Matrixeffekte in der Probenanalytik und einer damit verbundenen Untererfassung im unbehandelten Abwasser zurückgeführt werden kann (persönliche Kommunikation mit dem zuständigen Bearbeiter im Labor des Erftverbandes).

Der direkte Vergleich der Befundhäufigkeiten zwischen den beiden Standorten Grevenbroich und Euskirchen fördert mehrere Auffälligkeiten zu Tage. Erstens werden im reinen Klinikabwasser in Euskirchen mehr Antibiotika nachgewiesen als im Klinikabwasser Grevenbroich, mit tendenziell höheren Befundhäufigkeiten. Dies könnte ein Effekt einer etwaigen Untererfassung im Klinikabwasser Grevenbroich sein: Da (anders als in Euskirchen) in Grevenbroich nicht das gesamte Klinikabwasser an einer einzigen Stelle im Kanalnetz beprobt werden konnte, und zudem die genaue Herkunft des beprobten Klinikabwassers nicht eindeutig ermittelt werden konnte (d.h. die angeschlossenen Patientenzimmer und Stationen), muss davon ausgegangen, dass ein wesentlicher Teil des bis zum KA-Zulauf wirkenden Klinikeinflusses über die nicht beprobte Einleitstelle des Krankenhauses in das Kanalnetz eingebracht wird. Zweitens scheint der KA-Zulauf in Grevenbroich etwas stärker mit Antibiotika belastet zu sein als der Zulauf des GWK Euskirchen-Kessenich (u.a. ersichtlich an einer deutlich reduzierten Zulauf-Befundzahl von Ciprofloxazin in Euskirchen). Grundsätzlich ist die Zusammensetzung des Abwassers an den KA-Zuläufen von den spezifischen Charakteristika des Kanaleinzugsgebietes abhängig. Das GWK Euskirchen-Kessenich besitzt (gemessen an der Zahl der angeschlossenen Einwohner sowie dem jährlichen Abwasseraufkommen) ein ungefähr doppelt so großes Einzugsgebiet wie die KA Grevenbroich, ohne dass eine entsprechend gesteigerte Menge an Klinikabwasser in das Kanalnetz zu erwarten wäre (gemessen an den jeweiligen Klinikbettzahlen). Dementsprechend ist in Euskirchen auch eine deutlich größere Verdünnung des Klinikabwassers im allgemeinen kommunalen Abwasser am Zulauf der Kläranlage zu erwarten, was die geringere Antibiotikabelastung erklären könnte. Drittens ist die Zahl der Positivbefunde und nachgewiesenen Wirkstoffe am Ablauf des GWK Euskirchen-Kessenich deutlich kleiner als am Ablauf der KA Grevenbroich. Dieser Effekt könnte zum einen auf die geringere Grundbelastung am KA-Zulauf zurückzuführen sein. Zum anderen ist allerdings auch eine mögliche Verdünnung der

Antibiotika-Konzentrationen zwischen Zu- und Ablauf durch das in die Vorklärung eingebrachte Molkereiabwasser zu beachten, die aber allenfalls zu einer kleinen Verringerung der Befundhäufigkeiten am Ablauf beitragen kann.

Abbildung 7 und Abbildung 8 stellen die gemessenen Konzentrationen von sechs nach Befundhäufigkeit ausgewählten Antibiotika am Standort Grevenbroich bzw. Euskirchen in Form von Boxplots dar. Zu beachten ist, dass die Boxplots in Teilen aufgrund relativ geringer Befundzahlen für bestimmte Stoffe an manchen Probenahmestellen nur eingeschränkt interpretierbar sind. Beispielsweise wurde Sulfamethoxazol im Krankenhausabwasser Grevenbroich in nur der Hälfte aller Proben und im Krankenhausabwasser Euskirchen sogar in nur weniger als der Hälfte aller Proben nachgewiesen, so dass in beiden Fällen z.B. keine Mediankonzentrationen bestimmbar sind (für die Darstellung wurden die Boxplots der gemessenen Antibiotika-Konzentrationen zensiert, das heißt unterhalb der jeweiligen Berichtsgrenze abgeschnitten). Dennoch lassen sich aus den dargestellten Konzentrationsverteilungen einige Erkenntnisse ableiten, insbesondere was die allgemeine Variabilität der Konzentrationen sowie die Maximalbelastungen betrifft. So unterliegt die Zusammensetzung des Abwassers eines einzelnen (wenn auch relativ großen) Einleiters wie einem Krankenhaus größeren zufälligen Schwankungen als die Zusammensetzung des gesammelten Abwassers vieler tausender Einleiter am Ende eines Kanalnetzes. Dementsprechend ergibt sich auch eine stark erhöhte Streuung der Messwerte an den Klinikeinleitstellen gegenüber den KA-Zuläufen, welche sich einerseits in einer oft geringeren Befundzahl an den Klinikeinleitungen ausdrückt (vgl. Abbildung 6), zum anderen aber auch mit ungleich höheren Maximalbelastungen einhergeht. Besonders augenfällig sind in diesem Zusammenhang die gemessenen Piperacillin-Konzentrationen an der Einleitstelle des Elisabethkrankenhauses Grevenbroich, die im Minimum unterhalb der Berichtsgrenze und im Maximum bei über 3 mg/l liegen. Die Maximalkonzentrationen der anderen 5 Stoffe liegen zum Großteil ebenfalls im einstelligen bis zweistelligen Mikrogramm-pro-Liter-Bereich. Dieser Maximalbereich entspricht einem antibiotischen Milieu im Abwassersystem, das eine zeitweise Selektion Antibiotika-resistenter Krankheitserreger möglich – wenn nicht sogar wahrscheinlich – erscheinen lässt (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016; Voigt et al., 2020).

Zur besseren Sichtbarkeit der Konzentrationsunterschiede zwischen KA-Zulauf und KA-Ablauf werden die Boxplots in Abbildung 9 und Abbildung 10 ohne die Messergebnisse an Klinikeinleitungen dargestellt, weiterhin mit den genannten Einschränkungen für geringe Befundzahlen bestimmter Stoffe an manchen Probenahmestellen (dies betrifft insbesondere Ciprofloxazin, Clarithromycin und Metronidazol in Euskirchen, für die bereits am KA-Zulauf keine oder nur vereinzelte Positivbefunde vorliegen). Im Gesamtbild zeigt sich vor allem eine Verringerung der Maximalkonzentrationen in den KA-Abläufen durch die konventionelle Abwasserklärung in beiden Anlagen. Die Reduktion der Konzentrationen fällt jedoch stoffspezifisch sehr unterschiedlich aus: So werden die Konzentrationen von Piperacillin (bei stärkerer Grundbelastung an den KA-Zuläufen) im Maximum und Median deutlich stärker gesenkt als die Konzentrationen von Sulfamethoxazol und Trimethoprim. Die relative Persistenz dieser beiden Stoffe im konventionellen Klärprozess haben bereits die HyReKA-Messergebnissen gezeigt. Beachtlich ist hier vor allem die noch relativ große Mediankonzentration von Sulfamethoxazol im Ablauf der KA Grevenbroich von rund 0,6 µg/l.

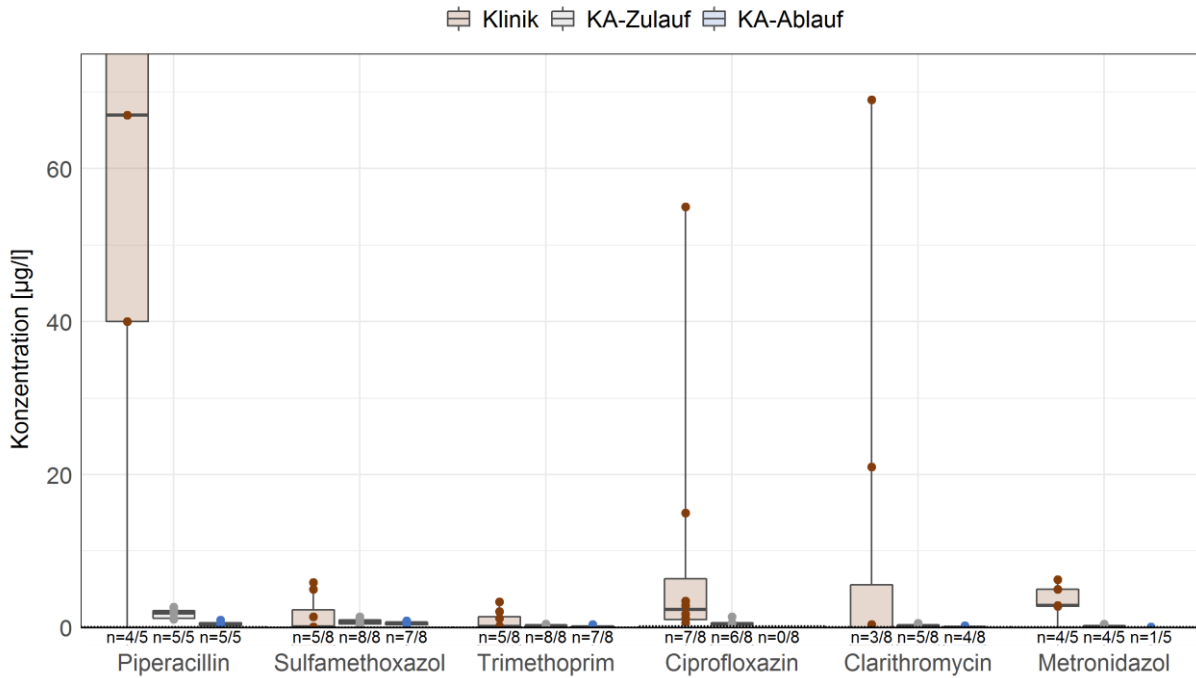


Abbildung 7: Konzentrationen ausgewählter Antibiotika in Grevenbroich.

Aus Darstellungsgründen befinden sich zwei extreme Messwerte für Piperacillin von 1,0 mg/l und 3,1 mg/l nicht im abgebildeten Wertebereich. n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der jeweiligen Berichtsgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

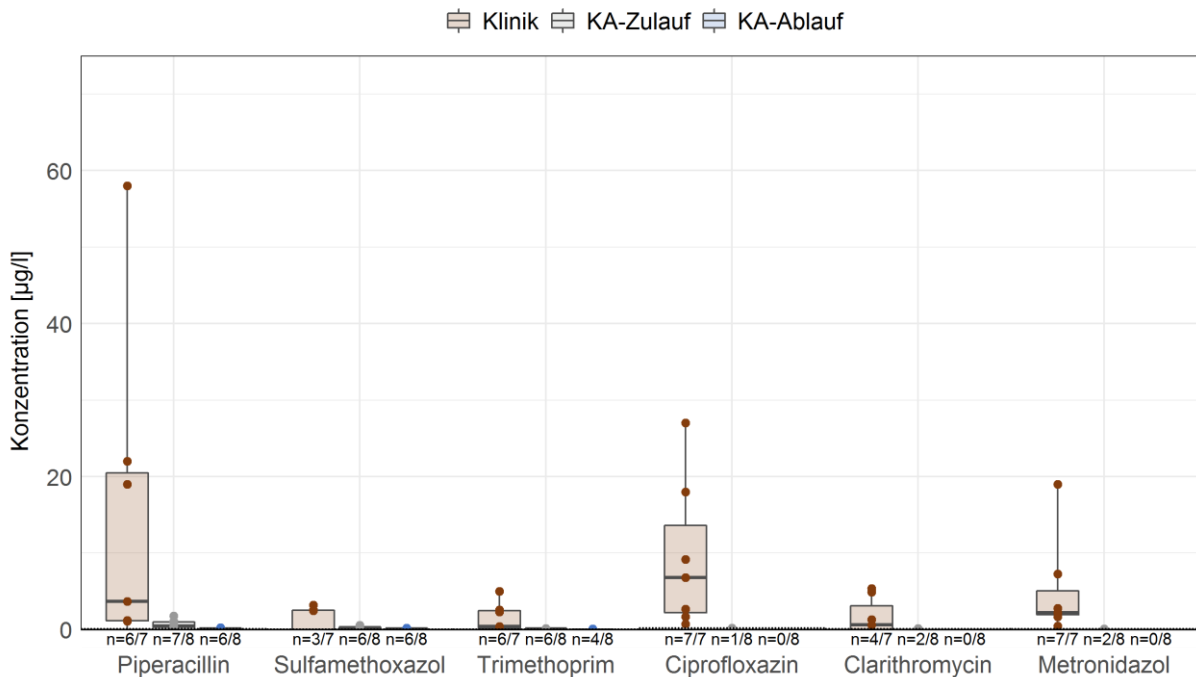


Abbildung 8: Konzentrationen ausgewählter Antibiotika in Euskirchen.

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der jeweiligen Berichtsgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

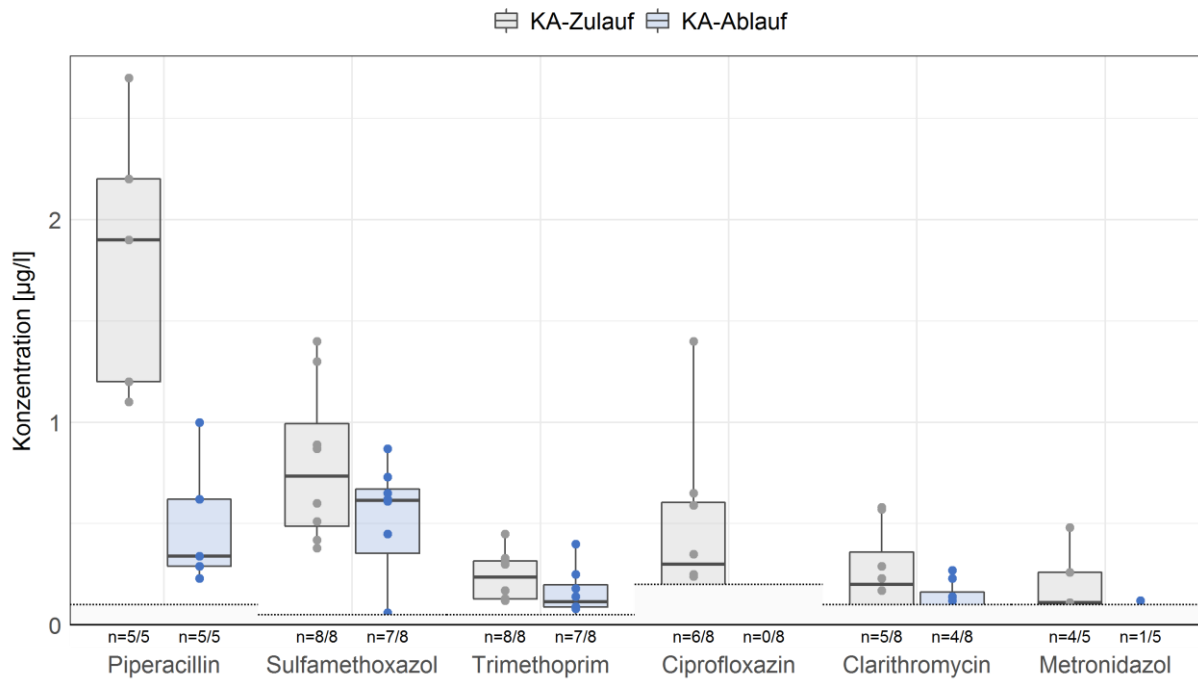


Abbildung 9: Konzentrationen ausgewählter Antibiotika in der KA Grevenbroich (ohne Krankenhausablauf).

Die Darstellung ist an der jeweiligen Berichtsgrenze abgeschnitten. n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der jeweiligen Berichtsgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

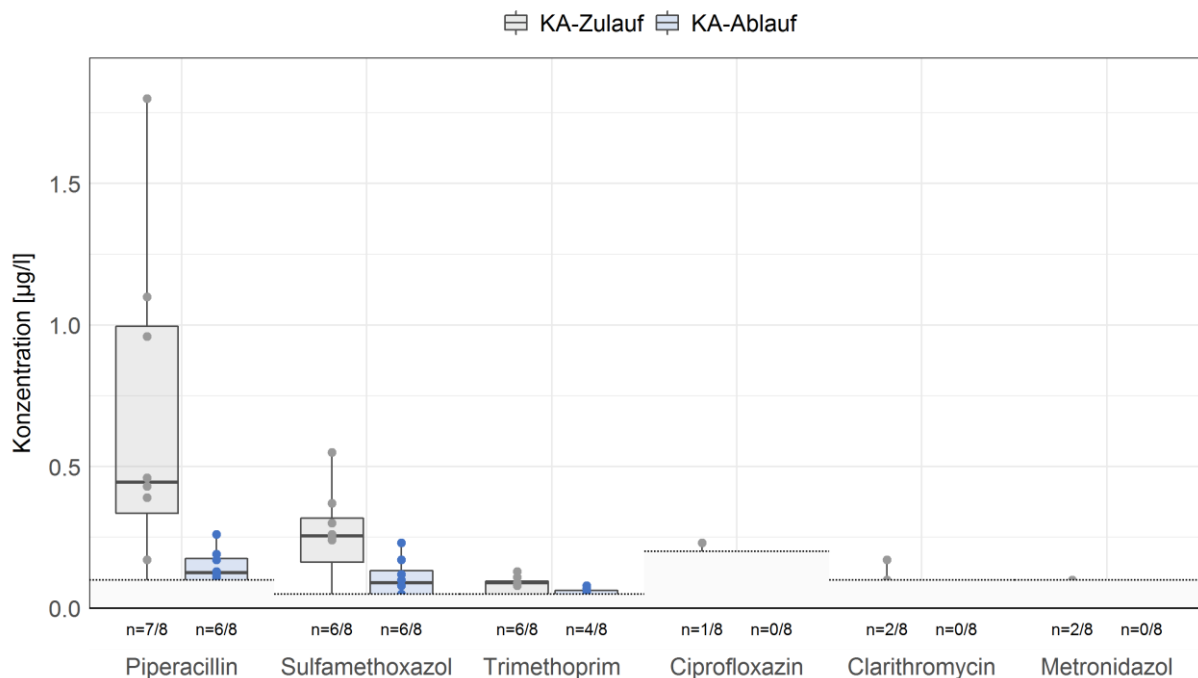


Abbildung 10: Konzentrationen ausgewählter Antibiotika des GKW Euskirchen-Kessenich (ohne Krankenhausablauf).

Die Darstellung ist an der jeweiligen Berichtsgrenze abgeschnitten. n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der jeweiligen Berichtsgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

3.3.2 Indikatororganismen

Für die hygienisch-mikrobiologische Charakterisierung des Abwassers wurden bewährte Indikatororganismen kulturell bestimmt. Zur Darstellung verwendet wurden nur Daten mit einem numerischen Wert. Kategorien, die durch das Verfahren der mikrobiologischen Auswertung entstehen (d.h. mit Konzentrationswerten einhergehen, die nicht nachweisbar oder statistisch unsicher sind), wurden bei der grafischen Aufbereitung nicht berücksichtigt.

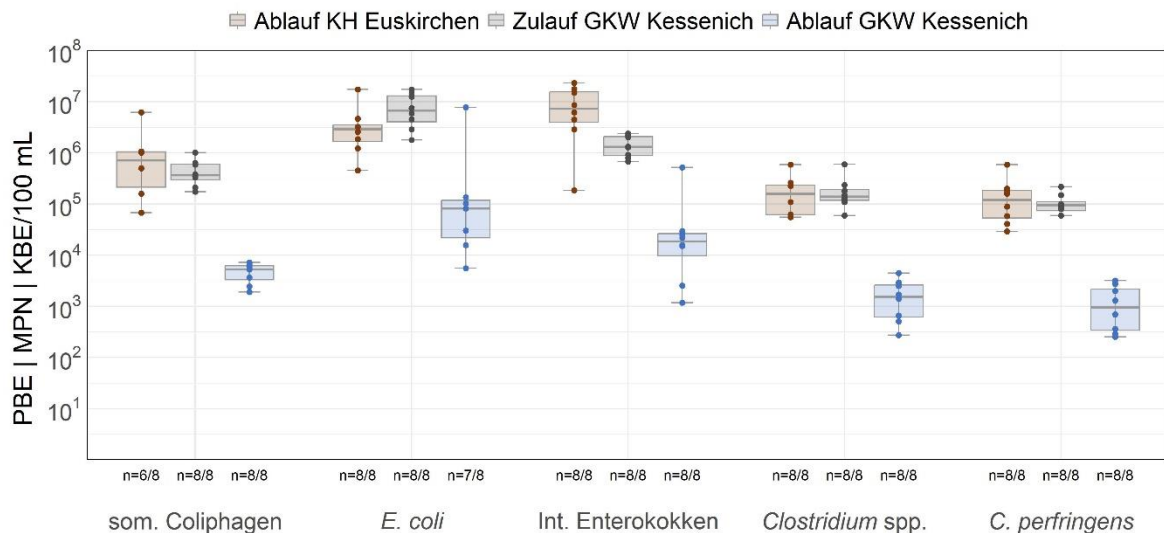


Abbildung 11: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben des Monitoring-Programms Marien-Hospital Euskirchen (Klinikabwasser).

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Die Konzentrationen in den Proben des Rohabwassers im Kanalnetz unmittelbar nach der Abwassereinleitung aus dem Marien-Hospital Euskirchen und in den Zulaufproben des nachgeschalteten GWK Euskirchen-Kessenich sind für die Parameter somatische Coliphagen, *E. coli* und *Clostridium* spp. (inkl. *C. perfringens*) ähnlich (siehe Abbildung 11). Somatische Coliphagen konnten in medianen Konzentrationen von $7,11 \times 10^5$ PBE/100 mL bzw. $3,64 \times 10^5$ PBE/100 mL detektiert werden, *E. coli*-Konzentrationen lagen im Median bei $2,88 \times 10^6$ MPN/100 mL bzw. $6,69 \times 10^6$ MPN/100 mL und *Clostridium* spp. (*C. perfringens*) konnten in medianen Konzentrationen von $1,58 \times 10^5$ KBE/100 mL ($1,2 \times 10^5$ KBE/100 mL) bzw. $1,40 \times 10^5$ KBE/100 mL ($9,49 \times 10^4$ KBE/100 mL) nachgewiesen werden. Lediglich intestinale Enterokokken waren im Kanalnetz des Krankenhauses in erkennbar höheren Konzentrationen ($7,30 \times 10^6$ MPN/100 mL im Median) vorhanden als im Rohabwasser der Gruppenklärwerkes ($1,3 \times 10^6$ MPN/100 mL im Median).

Gleiches lässt sich für die Indikatororganismen des Monitoring-Programms Klinikabwasser an den Proben aus Grevenbroich feststellen. Die medianen Konzentrationen im Rohabwasser des Elisabethkrankenhauses lagen mit $7,07 \times 10^5$ PBE/100 mL (som. Coliphagen), $5,82 \times 10^6$ MPN/100 mL (*E. coli*), $1,68 \times 10^7$ MPN/100 mL (Int. Enterokokken) und $8,84 \times 10^4$ KBE/100 mL (*Clostridium* spp.) in einer gleichen Größenordnung wie bei den Abwasserproben aus dem Marien-Hospital Euskirchen (siehe Abbildung 12). Auch die Konzentrationen im Zulauf der KA Grevenbroich waren mit $1,80 \times 10^6$ PBE/100 mL (somatische Coliphagen), $1,08 \times 10^7$ MPN/100 mL (*E. coli*), $1,86 \times 10^6$ MPN/100 mL

(intestinale Enterokokken) und $1,94 \times 10^5$ KBE/100 mL (*Clostridium* spp.) vergleichbar mit den gemessenen Konzentrationen im Zulauf des GWK Euskirchen-Kessenich.

Die Indikatororganismen wurden in beiden konventionellen Kläranlagen (GWK Euskirchen-Kessenich und KA Grevenbroich) um ca. 2 Log-Stufen reduziert (genauere Betrachtung in Abschnitt 4.3). Dabei werden durch die untersuchten konventionellen Kläranlagen im Median Konzentrationen von $5,30 \times 10^3$ PBE/100 mL bzw. $6,13 \times 10^3$ PBE/100 mL (für somatische Coliphagen), $8,18 \times 10^4$ MPN/100 mL bzw. $2,08 \times 10^4$ MPN/100 mL (für *E. coli*), $1,85 \times 10^4$ MPN/100 mL bzw. $5,35 \times 10^4$ MPN/100 mL (für Intestinale Enterokokken) und $1,54 \times 10^3$ KBE/100 mL bzw. $1,10 \times 10^3$ KBE/100 mL (für *Clostridium* spp.) in das aufnehmende Gewässer eingeleitet.

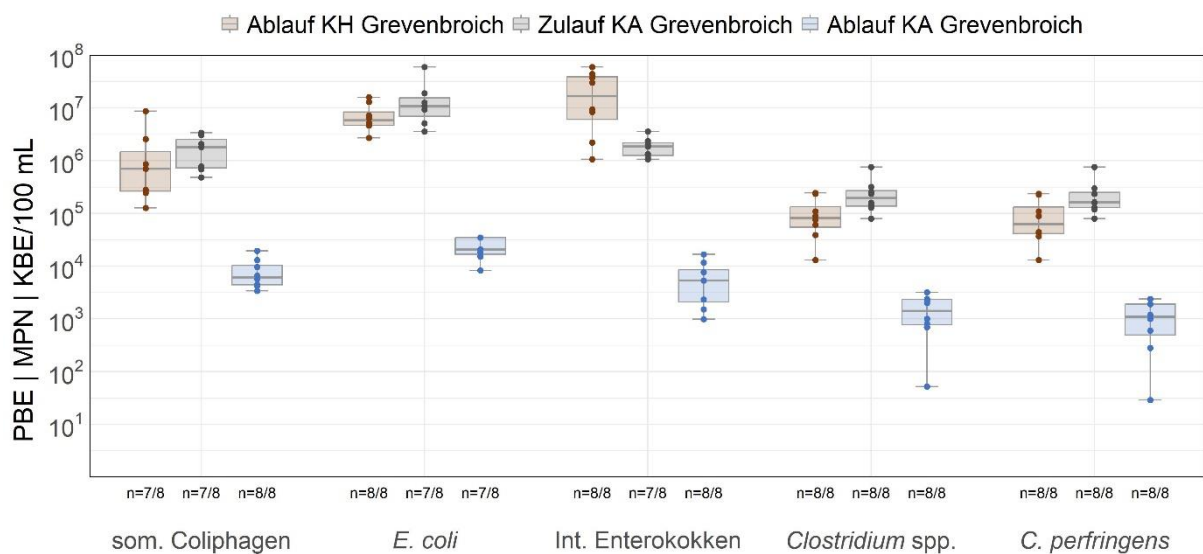


Abbildung 12: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben des Monitoring-Programms Elisabethkrankenhaus Grevenbroich (Klinikabwasser).

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

3.3.3 Antibiotika-resistente Bakterien

In Abbildung 13 wird die Konzentration der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms am Standort Euskirchen dargestellt. Ausgehend vom Median und den Datenpunkten sind in den Abläufen des Marien-Hospitals Euskirchen 10^5 bis 10^6 ESBL-produzierende *E. coli*, ESBL-produzierende KEC und VRE pro 100 mL detektiert worden. Pro Probe wurden in dem Monitoring Programm im Durchschnitt 17 Isolate von den CHROMagar ESBL Platten zur Verifizierung nach Kapitel 2.2.4 abgeimpft. Es wurden alle Isolate phänotypisch auf Resistenzcharakteristika untersucht, die nach finaler Auswertung mittels MALDI-TOF-MS den definierten Zielorganismen entsprachen. Für die Probenahmestelle am Marien-Hospital Euskirchen wurden insgesamt 94 Isolate dahingehend getestet, für die Probenahmestellen am GWK Euskirchen-Kessenich waren es im Zulauf 93 und im Ablauf 86 Isolate. Die Auswertung ist in Kapitel 4 ausführlich dargestellt.

Im Zulauf der Kläranlage konnten mediane Konzentrationen von $8,05 \times 10^4$ KBE/100 mL ESBL-produzierenden *E. coli*, $1,08 \times 10^4$ KBE/100 mL ESBL-produzierenden KEC und $1,70 \times 10^4$ KBE/100 mL VRE ermittelt werden. Vom Rohabwasser zum Ablauf werden die

dargestellten Antibiotika-resistenten Bakterien, ausgehend vom Median um 2 bis 3 Log-Stufen reduziert. In das aufnehmende Gewässer eingeleitet wurden mediane Konzentrationen von $7,59 \times 10^2$ KBE/100 mL ESBL-produzierenden *E. coli*, $1,30 \times 10^2$ KBE/100 mL ESBL-produzierenden KEC und $5,00 \times 10^1$ KBE/100 mL VRE. Im Ablauf des Krankenhauses konnte in vier Probenahmen ESBL-produzierende *E. coli* quantitativ bestimmt werden. Für den Ablauf der KA Euskirchen trifft diese Aussage auf sieben (ESBL-produzierenden KEC) bzw. fünf (VRE) Probenahmen zu. In sieben von acht Probenahmen konnten VRE im Kläranlagen-Zulauf in den Proben quantifiziert werden.

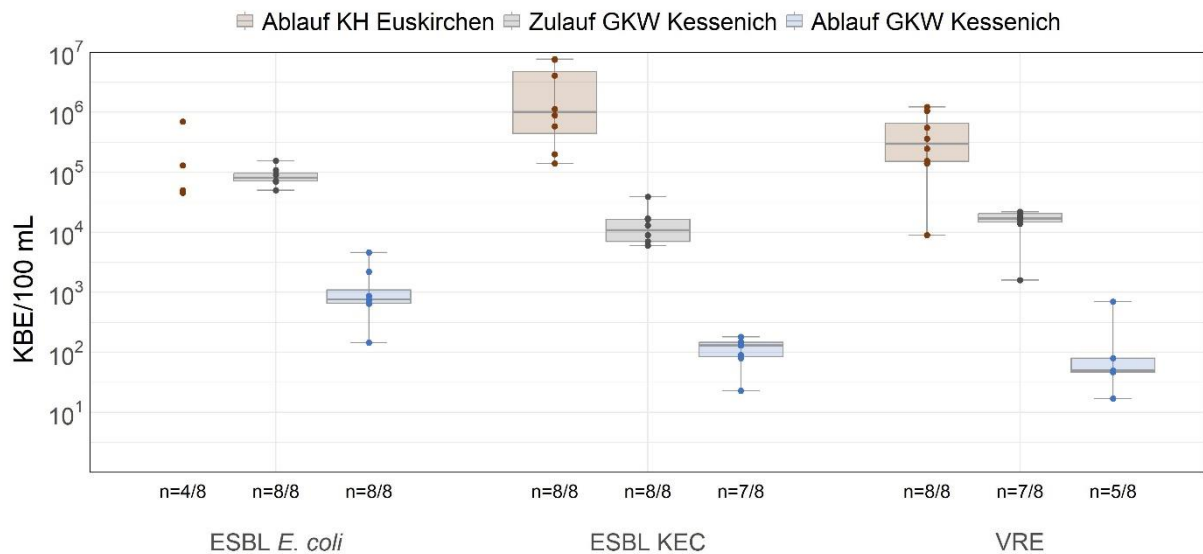


Abbildung 13: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms Marien-Hospital Euskirchen (Klinikabwasser).

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Abbildung 14 zeigt die Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien vom Ablauf des Elisabethkrankenhauses Grevenbroich und vom Zulauf und Ablauf der angeschlossenen Kläranlage. Es wurde im Krankenhaus Rohabwasser maximal ein Wert von $5,50 \times 10^5$ KBE/100 mL ESBL-produzierenden *E. coli* ermittelt. Im Zulauf der Kläranlage lag der Median bei $1,30 \times 10^5$ KBE/100 mL und im Ablauf bei $2,00 \times 10^2$ KBE/100 mL. Für die Gruppe der ESBL-produzierenden KEC liegen die medianen Konzentrationen des Ablaufs des Krankenhauses, des Rohabwassers der Kläranlage und des aufbereiteten Abwassers bei $4,45 \times 10^5$ KBE/100 mL, $3,81 \times 10^4$ KBE/100 mL und bei $1,40 \times 10^1$ KBE/100 mL. VRE sind im aus dem Krankenhaus abgeleiteten Rohabwasser mit einer medianen Konzentration von $1,46 \times 10^5$ KBE/100 mL detektiert worden. Vom Kläranlagen-Zulauf bis zum Ablauf wird die VRE-Konzentration ausgehend vom Median von $2,45 \times 10^4$ KBE/100 mL auf $5,22 \times 10^1$ KBE/100 mL um etwa 3 Log-Stufen reduziert. Im Zulauf und Ablauf der KA Grevenbroich waren alle untersuchten Resistenzparameter in 100 % der untersuchten Abwasserproben (n=8) quantifizierbar. Im Ablauf des beprobten Krankenhauses konnten ESBL-produzierende *E. coli* und ESBL-produzierende KEC in vier bzw. sechs von acht Proben abschließend quantifiziert werden. Pro Probe wurden in dem Monitoring Programm in Grevenbroich im Durchschnitt 15 Isolate von den CHROMagar ESBL Platten zur Verifizierung

nach Kapitel 2.2.4 abgeimpft. Insgesamt wurden hier 274 Isolate phänotypisch auf Multiresistenz getestet. Die Auswertung ist in Kapitel 4 ausführlich dargestellt.

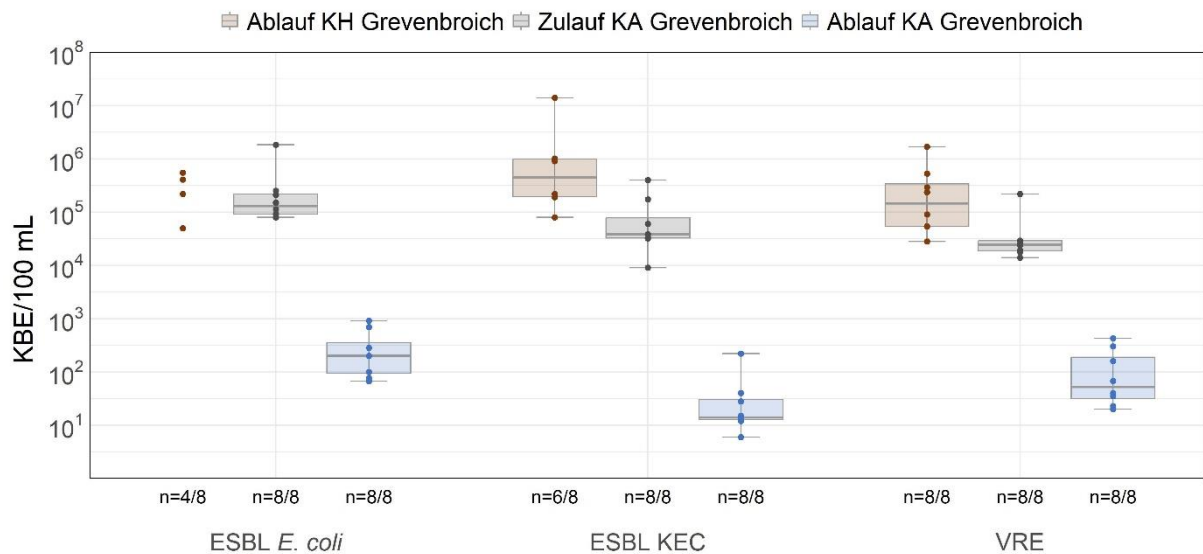


Abbildung 14: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms Elisabethkrankenhaus Grevenbroich (Klinikabwasser).

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

3.3.4 Antibiotikaresistenzgene

Das Vorkommen der Resistenzgene *mcr-1*, *bla_{TEM}*, *bla_{NDM-1}* und *ermB* wurde mittels qPCR bestimmt. Die generierten Daten für die Klinikabwässer der im Rahmen des Monitoring-Programms untersuchten Krankenhaus-Standorte sowie der angeschlossenen Kläranlagen sind in Abbildung 15 (Grevenbroich) und Abbildung 16 (Euskirchen) zusammengefasst. Das ARG *mcr-1* lag im Rohabwasser des Elisabethenkrankenhauses Grevenbroich in der geringsten Konzentration vor. In sechs der acht Proben konnte das Gen mit einer medianen Konzentration $1,6 \times 10^5$ GU/ 100 mL nachgewiesen werden, die Maximalwerte im Zulauf der Kläranlage erreichten diesen Wert ebenfalls. In der konventionellen Kläranlage wird das Gen im Median um 1 Log-Stufe reduziert. Im Klinikabwasser des Elisabethenkrankenhauses Grevenbroich konnten die ARGs *ermB*, *bla_{NDM-1}* und *bla_{TEM}* in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden (n=8) (Abbildung 15). Das Resistenzgen *ermB* zeigte dabei mit einer medianen Konzentration von $1,2 \times 10^9$ GU/ 100 mL das höchste Vorkommen, während *bla_{TEM}* mit einer medianen Konzentration von $1,2 \times 10^8$ GU/ 100 mL eine Log-Stufe unterhalb dieses Wertes lag. Im Zulauf der angeschlossenen Kläranlage traten ähnlich hohe Konzentrationen von *ermB* auf, *bla_{TEM}* konnte mit einem Median von $1,3 \times 10^7$ GU/ 100 mL eine Log-Stufe niedriger im Zulauf der Kläranlage nachgewiesen werden. Während das ARG *bla_{NDM-1}* in jeder Probe des Krankenhausabwassers nachgewiesen werden konnte (Median $6,6 \times 10^5$ GU/ 100 mL), konnte dieses im Zulauf der behandelnden KA Grevenbroich nur noch in vier der acht betrachteten Abwasserproben mit einer maximalen Konzentration von $1,2 \times 10^4$ GU/ 100 mL nachgewiesen werden. Im Ablauf der KA Grevenbroich konnte das Gen *bla_{NDM-1}* nie nachgewiesen werden (<LOD). Die beiden ARGs *ermB* und *bla_{TEM}* wurden in der konventionellen KA um 2,7 bzw. 2,8 Log-Stufen reduziert.

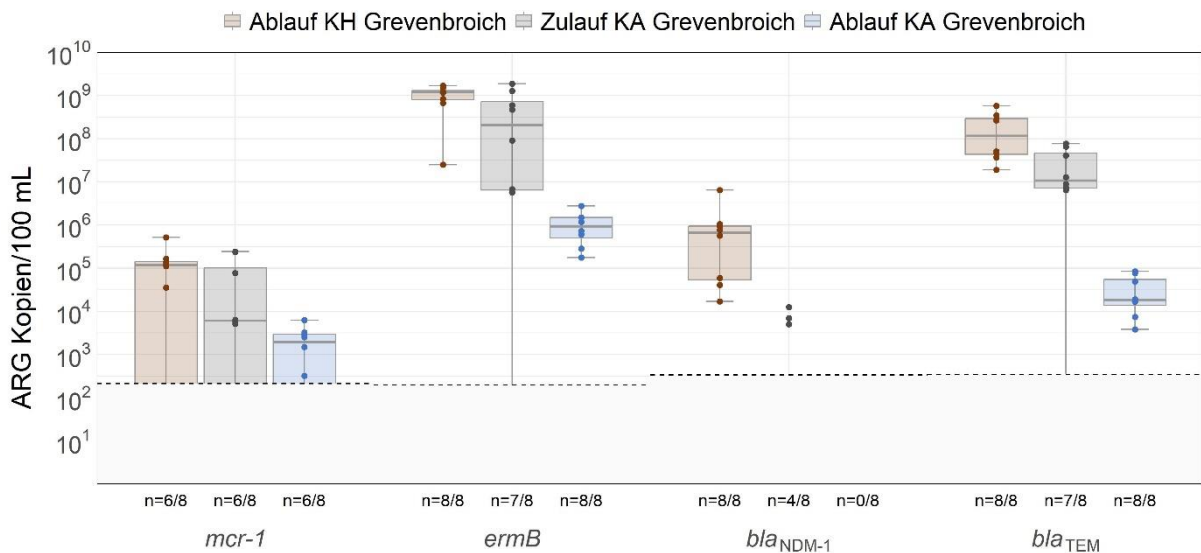


Abbildung 15: Konzentration der ARGs in den Proben des Monitoring-Programms Elisabethenkrankenhaus Grevenbroich (Klinikabwasser).

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der jeweiligen LOD = Nachweisgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Für den Standort des Monitoring-Programms am Marien-Hospital Euskirchen lagen die Konzentrationen der betrachteten ARGs im Rohabwasser des Krankenhauses in einer ähnlichen Verteilung wie am Standort Grevenbroich vor (Abbildung 16). Im Ablauf des Marien-Hospitals Euskirchen lag das Resistenzgen *mcr-1* ebenfalls in der geringsten medianen Konzentration vor. Im Vergleich zum Krankenhausablauf konnten im Zulauf der Kläranlage höhere Konzentrationen nachgewiesen werden. Im Ablauf der Kläranlagen konnte das Gen nur noch vereinzelt nachgewiesen werden (50 % der Proben).

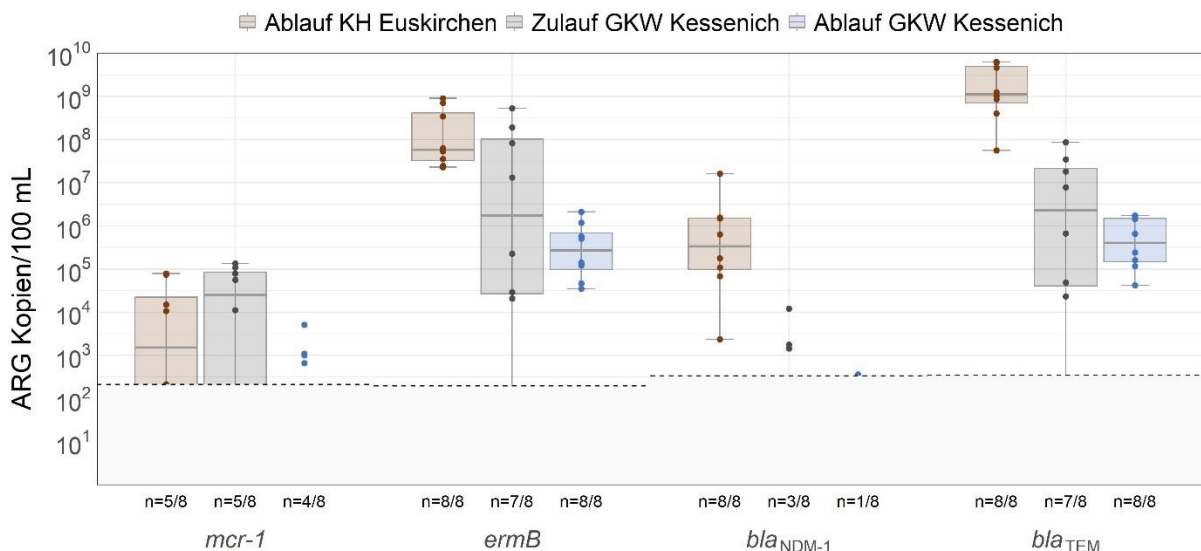


Abbildung 16: Konzentration der ARGs in den Proben des Monitoring-Programms Marien-Hospital Euskirchen (Klinikabwasser).

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der jeweiligen LOD = Nachweisgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Die ARGs *ermB*, *bla_{NMD-1}* und *bla_{TEM}* konnten ebenfalls in allen acht untersuchten Rohabwasserproben des Klinikabwassers des Marien-Hospital Euskirchen nachgewiesen werden. Die beiden Resistenzgene *bla_{TEM}* und *ermB* lagen auch hier in den höchsten medianen Konzentrationen von $1,1 \times 10^9$ GU/ 100 mL und $5,8 \times 10^7$ GU/100mL vor. Im Zulauf der aufnehmenden Kläranlage lagen die Konzentrationen im Median bei $7,8 \times 10^6$ GU/100mL und $1,33 \times 10^7$ GU/100mL. Nach konventioneller Klärung des Abwassers wurde die *bla_{TEM}* Konzentration um 1,3 Log-Stufen und die *ermB*-Konzentration um 1,7 Log-Stufen reduziert. Das Resistenzgen *bla_{NMD-1}* konnte auch für diesen Standort nur in einer von acht Proben des aufgereinigten Abwassers nachgewiesen werden.

3.4 Kläranlagen mit Membranbelebungsanlagen

3.4.1 Antibiotika

Wie für die Antibiotika im klinisch beeinflussten Abwasser werden für die Kläranlagen mit Membranbioreaktor (KA Glessen sowie GWK Kaarst-Nordkanal) zunächst die Befundhäufigkeiten als Heatmap dargestellt (Abbildung 17).

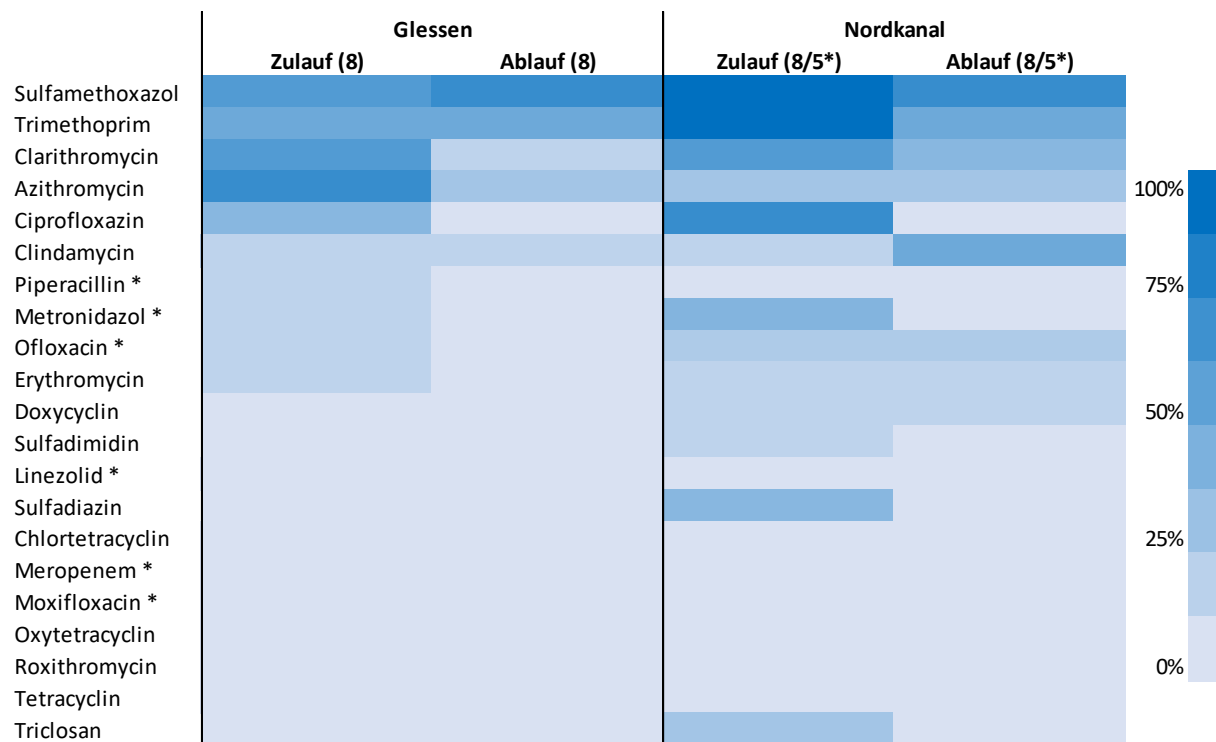


Abbildung 17: Positivbefunde der untersuchten Antibiotika in den mit einer Membranbelebungs ausgestatteten Kläranlagen (KA Glessen und GWK Kaarst-Nordkanal).

In Klammern ist die Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben angegeben, die von der jeweiligen Probenahmestelle stammen. Am GWK Kaarst-Nordkanal sind die dem Standardparameterkanon des Erftverbandes hinzugefügten Antibiotika (*) nicht in allen Abwasserproben untersucht worden, so dass sich die Probenzahl für diese Wirkstoffe wie angegeben verringert.

Diese Befundhäufigkeiten spiegeln in weiten Teilen die Ergebnisse für die KA Grevenbroich und das GWK Euskirchen-Kessenich wider. Es bestätigt sich das allgemein häufige Vorkommen von Sulfamethoxazol, Trimethoprim, Ciprofloxazin sowie verschiedener Makrolid-Antibiotika (insbesondere Clarithromycin und Azithromycin) im unbehandelten Abwasser.

Auch Metronidazol und Clindamycin erscheinen relativ weit verbreitet. Insgesamt ist das Abwasser am Zulauf des GWK Nordkanal stärker mit antibiotischen Wirkstoffen belastet als das Abwasser am Zulauf der KA Glessen. Hier spielen wieder die spezifischen Charakteristika der jeweiligen Einzugsgebiete eine Rolle. Ein klinischer Einfluss existiert in beiden Einzugsgebieten nicht, im deutlich größeren Einzugsgebiet des GWK Nordkanal sind dem Erftverband allerdings mehrere Pflegeeinrichtungen bekannt, die möglicherweise zu einer stärkeren Gesamtbelastung des Abwassers mit Antibiotika beitragen können. Ein wesentlicher Unterschied zum klinischen Abwasser in Grevenbroich und Euskirchen ist die deutlich reduzierte Zahl an Piperacillin-Nachweisen im Rohabwasser: Im Zulauf der KA Glessen ist Piperacillin nur vereinzelt, im Zulauf des GWK Nordkanal überhaupt nicht nachgewiesen worden. Dieses Ergebnis steht im kompletten Gegensatz zur starken Piperacillin-Belastung des klinisch beeinflussten Abwassers in Grevenbroich und Euskirchen. Unter allen untersuchten Antibiotika scheint Piperacillin daher der stärkste Anzeiger eines klinischen Einflusses auf das am KA-Zulauf beprobte Abwasser zu sein.

Die in Abbildung 17 dargestellten Befundhäufigkeiten am KA-Ablauf beziehen sich auf das Membranpermeat unmittelbar nach der Filtration. Der Vergleich der Befundhäufigkeiten zwischen KA-Zulauf und -Ablauf deutet bezüglich der untersuchten Antibiotika auf keine zusätzliche Reduktionsleistung der Membranfiltration hin. Dies war so zu erwarten, da die Membranfiltration vornehmlich eine Barriere für Bakterien und Partikel und nicht für (im Abwasser gelöst vorliegende) Spurenstoffe darstellt. Es zeigen sich insgesamt sehr ähnliche Befundmuster zur konventionellen Klärtechnik, mit einem relativ schlechten Rückhalt von Sulfamethoxazol und Trimethoprim und einem sehr guten Rückhalt von Ciprofloxazin. Am Ablauf des GWK Nordkanal sticht wieder eine starke Zunahme der Befunde von Clindamycin hervor. Wie bereits für die KA Grevenbroich und das GWK Euskirchen-Kessenich ist nicht gänzlich auszuschließen, dass dieses Ergebnis auf Matrixeffekte in der Probenanalytik und eine damit verbundene Untererfassung am KA-Zulauf zurückgeht (persönliche Kommunikation mit dem Erftverband-Labor). Ein Zuwachs an Positivbefunden für Clindamycin an den KA-Abläufen ist im HyReKA-Messprogramm nicht festgestellt worden.

Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die Konzentrationsverteilungen für die Antibiotika mit den häufigsten Positivbefunden - Sulfamethoxazol und Trimethoprim - in der KA Glessen bzw. dem GWK Nordkanal. Abbildung 18 enthält zusätzlich zu den Messwerten am Zu- und Ablauf der KA Glessen Messwerte vom Ablauf der GAK-Filtration, die als Versuchsanlage das Membranpermeat im Teilstrom behandelt und im Rahmen eines begleitenden Forschungsprojektes („Einsatz von granulierter Aktivkohle zur Spurenstoffelimination auf der Membranbelebungsanlage der Kläranlagen Bergheim-Glessen“, gefördert durch das MUNVNRW) regelmäßig beprobt wird. Die eigenen, im Rahmen des ARA-Projektes erhobenen Messwerte am Ablauf der GAK-Filtration sind dabei durch Messwerte aus dem begleitenden Forschungsprojekt zur Versuchsanlage ergänzt, so dass sich für den GAK-Filter eine deutlich größere Zahl analysierter Proben als am KA-Zulauf sowie KA-Ablauf ergibt. Die Konzentrationsverteilungen für sowohl Sulfamethoxazol als auch Trimethoprim unterscheiden sich qualitativ nicht wesentlich von den Verteilungen der KA Grevenbroich und des GWK Euskirchen-Kessenich, mit einer zwar relativ starken Reduzierung der Maximalkonzentrationen am Ablauf, allerdings nur einer geringfügigen Verkleinerung der Mediankonzentrationen. Die GAK-Filtration bewirkt für Trimethoprim eine zusätzliche Reduktion der Konzentrationen auf Werte unterhalb der Berichtsgrenze. Die Sulfamethoxazol-Konzentrationen im Ablauf der GAK-Filtration liegen zum Teil höher, sind allerdings beeinflusst durch einen Durchbruch der beladenen Aktivkohle in der ersten Jahreshälfte 2022. Nach Austausch der Aktivkohle kehrten die am Ablauf gemessenen Konzentrationen auch für

Sulfamethoxazol zu Werten unterhalb der Berichtsgrenze zurück, so dass sich insgesamt ein sehr guter und zuverlässiger Rückhalt beider Stoffe durch die GAK-Filtration ergibt.

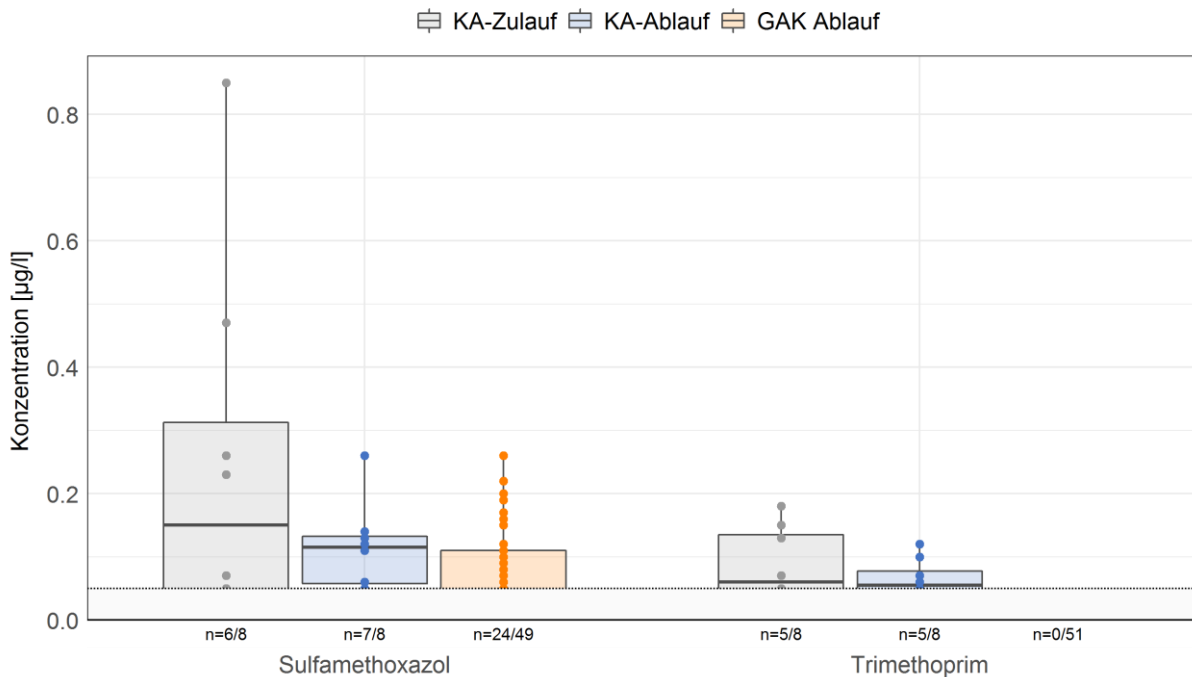


Abbildung 18: Konzentrationen von Sulfamethoxazol und Trimethoprim im Abwasser der KA Glessen.

Die Darstellung ist an der Berichtsgrenze abgeschnitten. n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der Berichtsgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an. Die Konzentrationsverteilungen für Sulfamethoxazol am Ablauf der GAK-Filtration sind von einem Durchbruch der beladenen Aktivkohle beeinflusst (siehe Fließtext für nähere Erläuterungen).

Die Konzentrationsverteilungen für Sulfamethoxazol und Trimethoprim in Abbildung 19 deuten für das GW Nordkanal im Vergleich zur KA Glessen auf eine erheblich stärkere Konzentrationsreduktion zwischen KA-Zulauf und KA-Ablauf hin (insbesondere bezüglich Sulfamethoxazol). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass sich die Beprobung des GW-Nordkanal im ARA-Projekt zeitlich mit einem weiteren Forschungsprojekt („MBR-AKTIV“, gefördert durch das MUNV NRW) überschneidet. Im Zuge von „MBR-AKTIV“ erfolgte auf dem GW Nordkanal eine Dosierung von Pulveraktivkohle (PAK) in die biologische Verfahrensstufe der Kläranlage (Bastian et al., 2021). Die ARA-Probenahmen sind in diesem Zusammenhang wahlweise gar nicht, im Teilstrom (durch eines von vier Belebungsbecken) oder im Vollstrom durch die Anwesenheit von PAK im Abwasserstrom beeinflusst. Es ist daher möglich, dass das festgestellte erhöhte Rückhaltevermögen bezüglich der Sulfamethoxazol- und Trimethoprim-Konzentrationen im GW Nordkanal auf die PAK-Beeinflussung im Untersuchungszeitraum zurückgehen könnte. Eine systematische Untersuchung des PAK-Einflusses auf die Ergebnisse konnte im Rahmen des Projektes aufgrund (a) relativ geringer Probenzahl und (b) der Art und Weise der Probenahme (am Zu- und Ablauf der Kläranlage, ohne Berücksichtigung der hydraulischen Aufenthaltszeit des Abwassers) nicht durchgeführt werden. Für eine genaue Ergebnisdarstellung bezüglich des gesteigerten Spurenstoffrückhalts durch die PAK-Dosierung sei an dieser Stelle auf den MBR-Aktiv-Projektbericht verwiesen (Bastian et al., 2021).

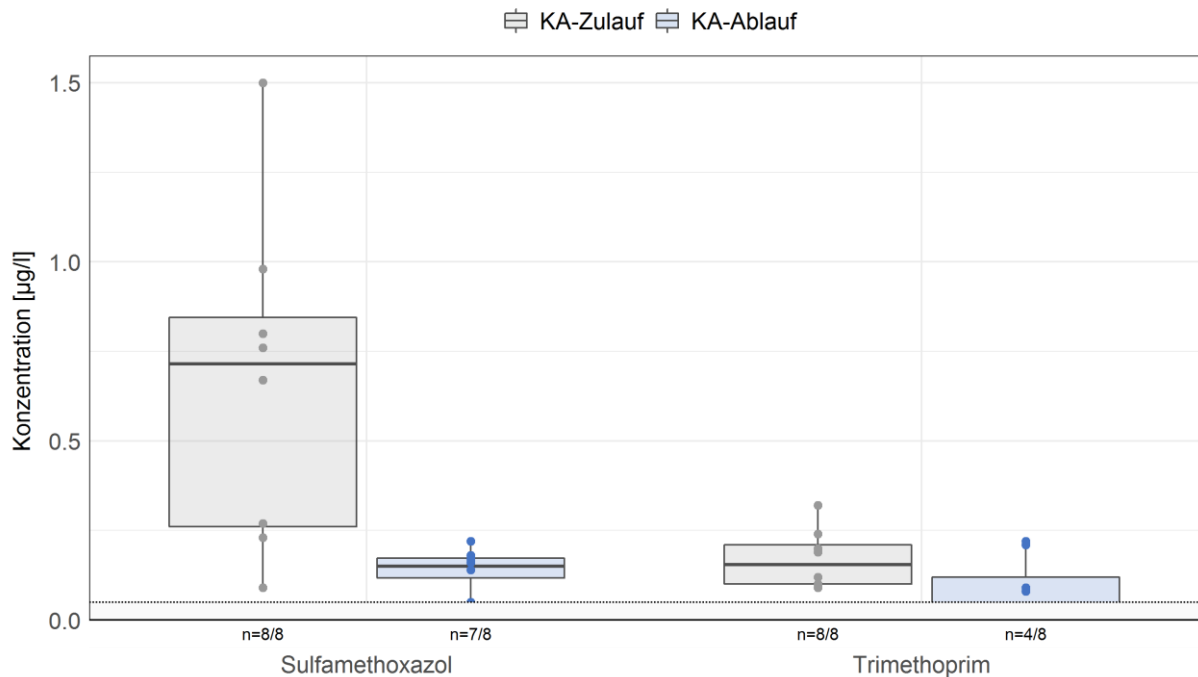


Abbildung 19: Konzentrationen von Sulfamethoxazol und Trimethoprim im GWK Kaarst-Nordkanal. Die Darstellung ist an der Berichtsgrenze abgeschnitten. n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der Berichtsgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

3.4.2 Indikatororganismen

Die Konzentrationen der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Indikatorparameter für die Membrankläranlagen sind in Abbildung 20 (GWK Kaarst-Nordkanal) und Abbildung 21 (KA Glessen) gezeigt. Die Mediane im Zulauf der Kläranlagen sind sehr ähnlich, für den Parameter somatische Coliphagen konnten mediane Konzentrationen von $1,69 \times 10^6$ PBE/100mL (GWK Kaarst-Nordkanal) und $4,47 \times 10^5$ PBE/100mL (KA Glessen) bestimmt werden. Im Ablauf der Kläranlagen lag die mediane Konzentration nur noch bei 264 PBE/100 mL (GWK Kaarst-Nordkanal) bzw. 43 PBE/100mL (Ablauf KA Glessen ohne GAK-Filter). Nach dem GAK-Filter konnten noch mediane Konzentrationen von 19 PBE/100mL nachgewiesen werden.

Abbildung 20 zeigt, dass bei medianen Konzentrationen im Zulauf des GWK Kaarst-Nordkanal von $6,47 \times 10^7$ MPN/100mL (*E. coli*), $1,41 \times 10^6$ MPN/100mL (Int. Enterokokken) und $1,15 \times 10^5$ KBE/100 mL (*Clostridium* spp.) durch die Abwasseraufbereitung mit MBR mediane Konzentrationen von 61 MPN/100mL (*E. coli*), 30 MPN/100mL (Int. Enterokokken) und 24 KBE/100mL (*Clostridium* spp.) in das Gewässer eingeleitet werden. Die medianen Zulauf-Konzentrationen für die Parameter *E. coli* mit $9,35 \times 10^6$ MPN/100mL und intestinale Enterokokken mit $1,17 \times 10^6$ MPN/100mL wurden durch die Passage in der KA Glessen mit MBR auf eine maximale Konzentration von je 15 MPN/100mL reduziert (Abbildung 21). In fünf von acht Proben konnte *E. coli* im Ablauf der Kläranlage nicht nachgewiesen werden, intestinale Enterokokken konnten in sechs der acht Proben nicht nachgewiesen werden. Nach der Passage durch den nachgeschalteten GAK-Filter (Stichproben) konnten maximale Konzentrationen von 94 MPN/100mL (*E. coli*) und 46 MPN/100 mL (Intestinale Enterokokken) gefunden werden. In drei von sieben Proben gelang kein Nachweis von *E. coli* und in vier von sieben kein Nachweis von intestinalen Enterokokken.

Clostridium spp. wurden im Zulauf der Kläranlagen mit $1,25 \times 10^5$ KBE/100mL (Median) detektiert und in der Kläranlage, sowie der nachgeschalteten GAK-Filtration bis auf einen Median von 4 KBE/100mL reduziert. Die Reduktionsleistung der beiden Kläranlagen mit Membranbioreaktoren sind für ausgewählte Parameter ausführlich in Abschnitt 4.3 dargestellt.

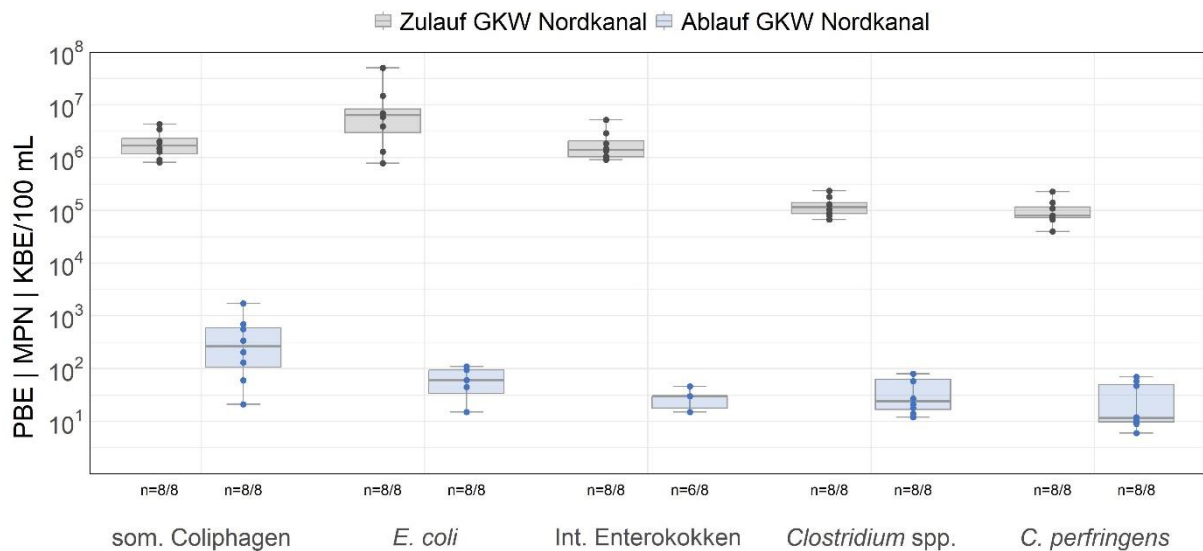


Abbildung 20: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben des GWK Kaarst-Nordkanal. n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

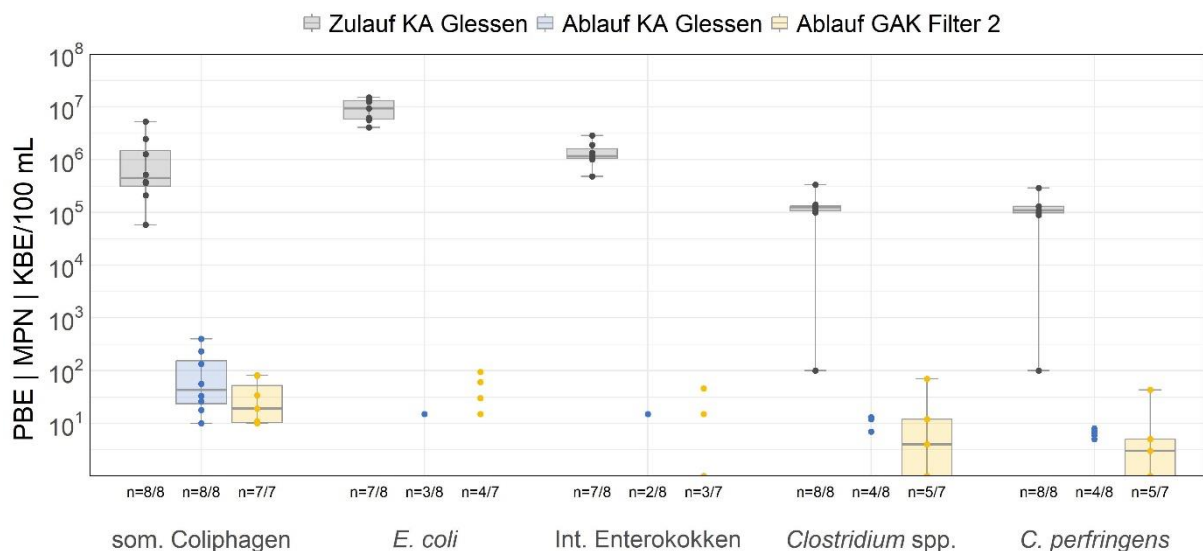


Abbildung 21: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben der KA Glessen. n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

3.4.3 Antibiotika-resistente Bakterien

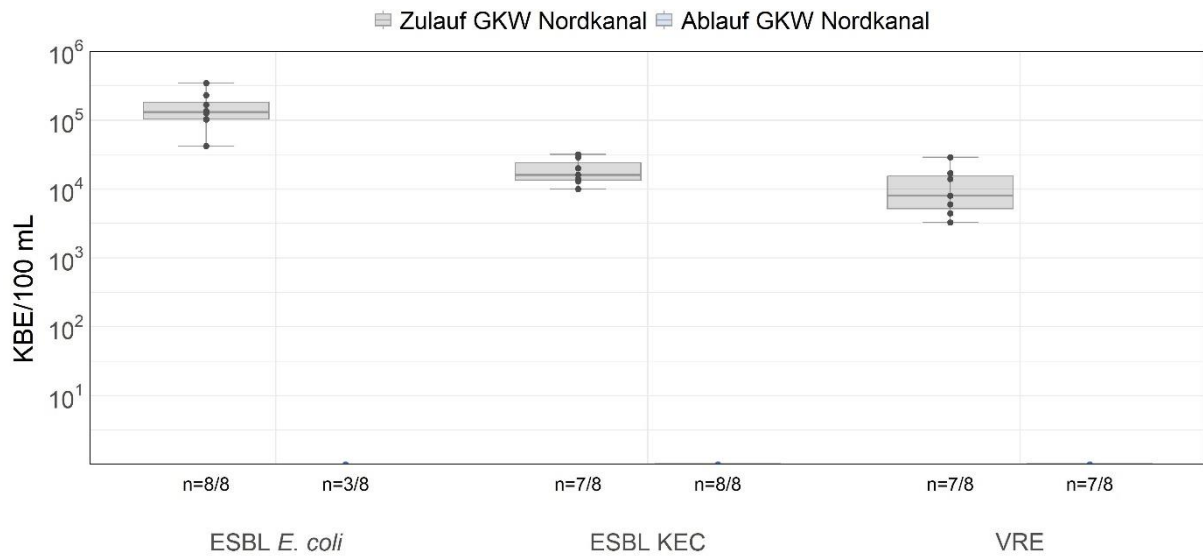


Abbildung 22: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms GKW Kaarst-Nordkanal (Membrankläranlage).

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Abbildung 22 zeigt die Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des GKW Kaarst-Nordkanal. Die medianen Konzentrationen im Zulauf der Kläranlage liegen bei $1,31 \times 10^5$ KBE/100mL ESBL-produzierenden *E. coli*, $1,60 \times 10^4$ KBE/100mL ESBL-produzierende KEC und $8,00 \times 10^3$ KBE/100 mL VRE. Im Kläranlagenablauf sind in 100 mL keine der gezeigten Antibiotika-resistenten Bakterien quantifiziert worden. Für drei von acht Proben lagen die Befunde von ESBL-produzierenden *E. coli* bei <1 KBE/100 ml. Die Quantifizierung erfolgte für ESBL-produzierenden KEC im Zulauf und VRE im Zu- und Ablauf bei jeweils sieben von acht durchgeführten Probenahmen. Es wurden im Durchschnitt pro Probe 20 Isolate von den CHROMagar ESBL Platten abgeimpft und weiter charakterisiert. Es wurden alle Isolate phänotypisch auf Resistenzcharakteristika untersucht, die nach finaler Auswertung mittels MALDI-TOF-MS den definierten Zielorganismen entsprachen (99 Isolate). Im Ablauf des GKW Nordkanal wurden im Durchschnitt zwei Isolate pro Probe abgeimpft (Einzelbefunde von ESBL-produzierenden *E. coli*), von denen insgesamt 14 Isolate weiter hinsichtlich ihrer phänotypischen Resistenz-Charakteristika untersucht wurden.

Die Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben der KA Glessen sind in

Abbildung 23 gezeigt. Die Zulaufkonzentrationen der gezeigten Antibiotika-resistenten Bakterien sind ausgehend vom Median jenen des GKW Kaarst-Nordkanal ähnlich. So liegt die mediane Konzentration von ESBL-produzierenden *E. coli* bei $5,18 \times 10^4$ KBE/100mL und von ESBL-produzierenden KEC bei $3,27 \times 10^4$ KBE/100mL. Die Konzentrationen für VRE liegen zwischen $2,46 \times 10^3$ KBE/100mL und $2,20 \times 10^4$ KBE/100mL. Die medianen Konzentrationen im Ablauf des Membranfilters und dem Ablauf des GAK-Filters liegen für die dargestellten ARB bei 0 KBE/100 mL. Abschließend quantifiziert werden konnten ESBL-produzierende *E. coli* in sieben bis acht Proben, ESBL-produzierende KEC in sechs bis acht Proben und VRE in drei bis acht Probenahmen.

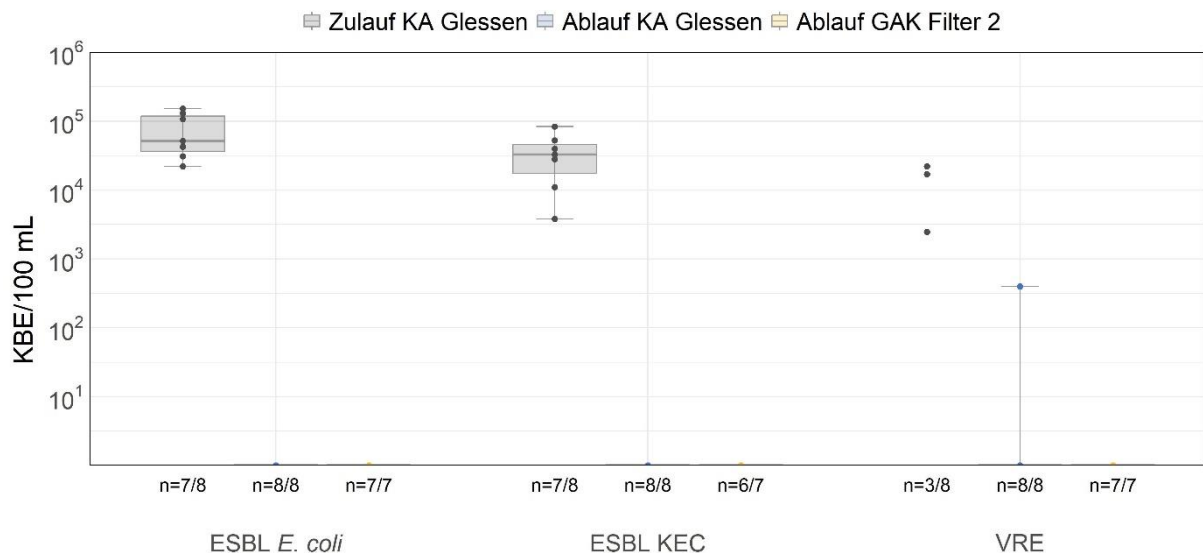


Abbildung 23: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms KA Glessen (Membrankläranlage).

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Pro Probe am Zulauf der KA Glessen wurden im Durchschnitt ebenfalls 20 Isolate von den CHROMagar ESBL Platten abgeimpft und weiter charakterisiert. Nach finaler Auswertung mittels MALDI-TOF-MS wurden 81 Isolate weiter hinsichtlich der phänotypischen Resistenz (Kapitel 2.2.4) getestet. Im Ablauf des GWK Glessen erfolgte nie ein Nachweis von ESBL-produzierenden Bakterien.

3.4.4 Antibiotikaresistenzgene

In Abbildung 24 ist das Vorkommen und die Konzentration der ARGs *mcr-1*, *ermB*, *bla_{NDM-1}* und *bla_{TEM}* in den Proben des GWK Kaarst-Nordkanal dargestellt. Das ARG *ermB* konnte in allen untersuchten Proben (n=8) sowohl im Zu- als auch im Ablauf der Kläranlage nachgewiesen werden. Durch die Aufbereitung des Abwassers mithilfe eines MBR fand eine Reduktion der *ermB*-Konzentration um 4,4 Log-Stufen statt. Für das ARG *bla_{TEM}* wurde im Zulauf der Kläranlage eine mediane Konzentration von $8,9 \times 10^6$ GU/100 mL Kopien ermittelt. Auch für dieses ARG konnte eine Reduktion im Ablauf des GWK Kaarst-Nordkanal gezeigt werden, in sechs von acht Proben lag der Ablauf-Wert unterhalb der LOD. Das ARG *bla_{NDM-1}* wurde deutlich weniger häufig und in deutlich geringeren Konzentration im Zulauf des GWK nachgewiesen als *ermB* und *bla_{TEM}*. Das ARG *mcr-1* konnte nur in vereinzelten Proben des Zulaufes nachgewiesen werden. So lag die Genkonzentration für *mcr-1* im Zulauf der Kläranlage bei sechs von acht Proben und im Ablauf der Kläranlage bei fünf von acht Proben unterhalb der LOD.

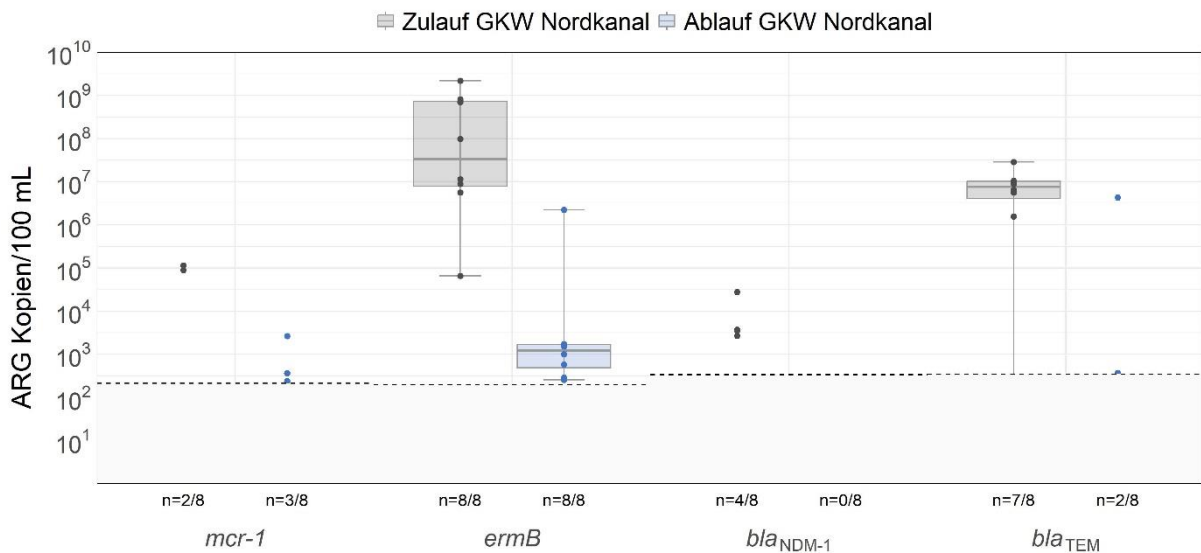


Abbildung 24: Konzentration der ARGs in den Proben des Monitoring-Programms GKW Kaarst-Nordkanal.

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der jeweiligen LOD = Nachweisgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Im Monitoring-Programm KA Glessen konnte das Resistenzgen *ermB* im Zulauf der Kläranlage in einer medianen Konzentration von $2,5 \times 10^8$ GU/100mL nachgewiesen werden (Abbildung 25). Nach Aufbereitung in der Kläranlage fand eine fast komplette Reduktion der Genkonzentration (um 8 Log-Stufen) statt, im Kläranlagenablauf konnte das ARG nur noch in einer von acht Proben mit einer Konzentration $8,9 \times 10^2$ GU/100mL Kopien nachgewiesen werden. Im Ablauf des GAK Filters konnte das Gen in zwei Proben nachgewiesen werden. Die beiden ARGs *mcr-1* und *bla_{TEM}* konnten im Zulauf in fast allen Proben mit einer medianen Konzentration von $4,5 \times 10^4$ GU/100mL bzw. $3,6 \times 10^7$ GU/100mL nachgewiesen werden. Das Gen *bla_{NMD-1}* konnte nur in vereinzelt Proben des Zulaufs der KA Glessen (n=2) nachgewiesen werden. Im Kläranlagenablauf als auch dem Ablauf des GAK-Filters waren alle Befunde für das ARG unterhalb der LOD.

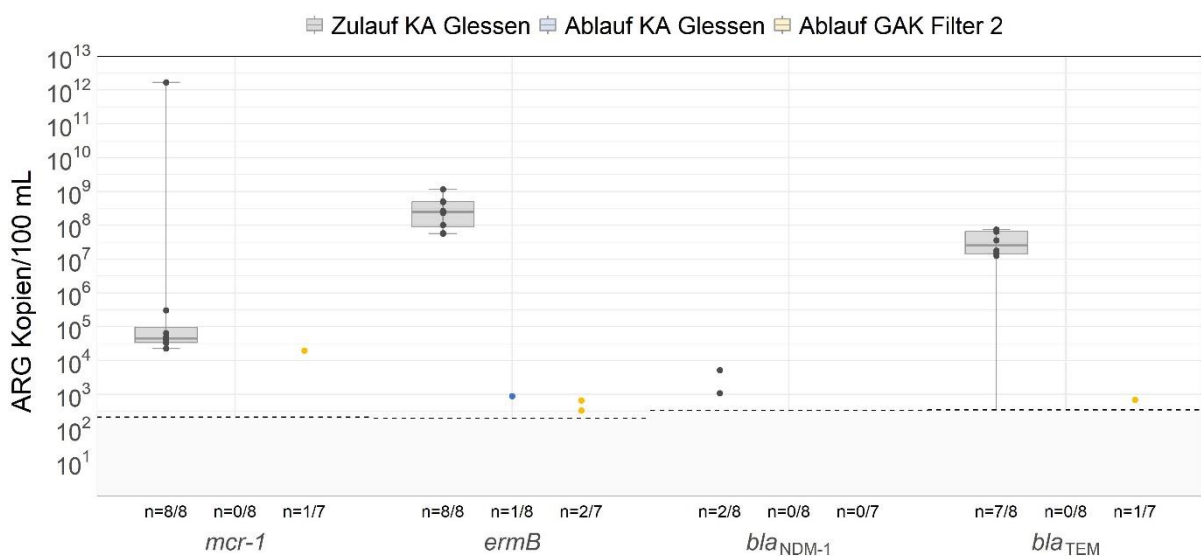


Abbildung 25: Konzentration der ARG in den Proben des Monitoring-Programms KA Glessen.

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der jeweiligen LOD = Nachweisgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

3.5 RBF+ in Rheinbach

3.5.1 Antibiotika

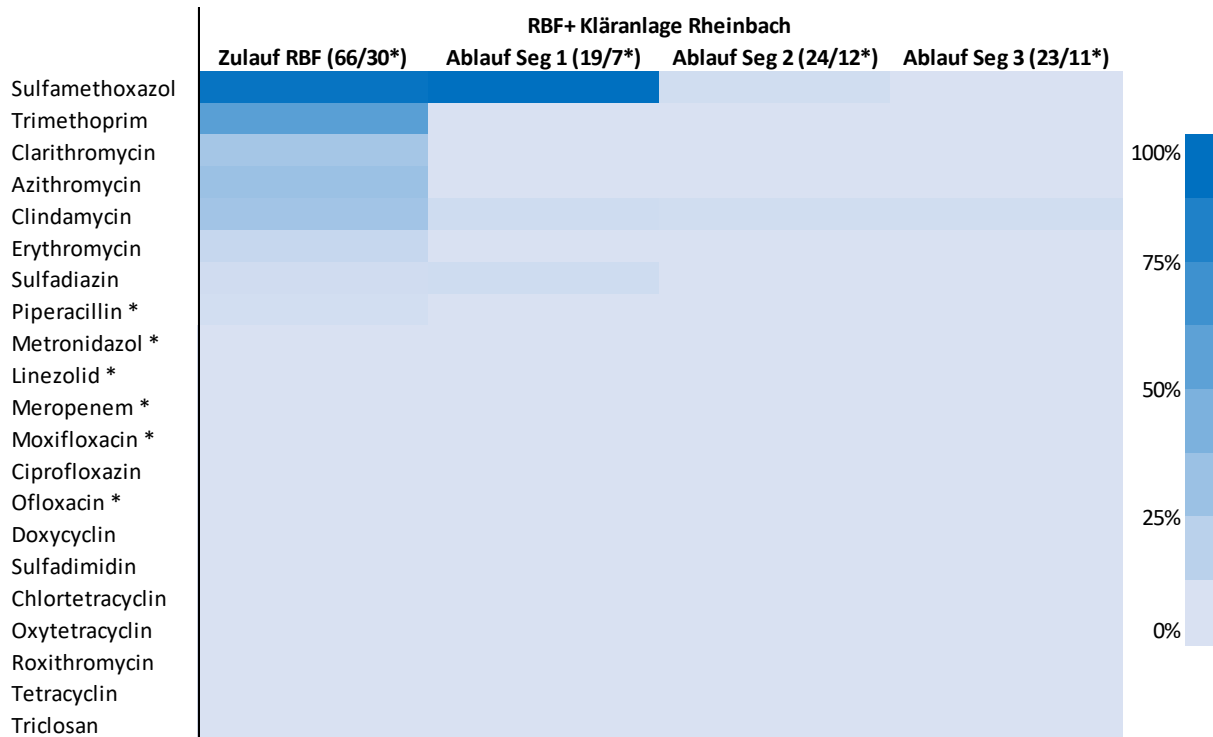


Abbildung 26: Positivbefunde der untersuchten Antibiotika an Zu- und Abläufen des RBF+ in Rheinbach (Routine-Betrieb).

In Klammern ist die Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben angegeben, die von der jeweiligen Probenahmestelle stammen. Die dem Standardparameterkanon des Erftverbandes hinzugefügten Antibiotika (*) sind nicht in allen Abwasserproben untersucht worden, so dass sich die Probenzahl für diese Wirkstoffe wie angegeben verringert.

Abbildung 26 zeigt die Befundhäufigkeiten der untersuchten Antibiotika (mit Triclosan) am Zulauf und Ablauf des RBF+ in Rheinbach. Sie sind erweitert um Daten, welche im Rahmen verschiedener anderer Forschungsprojekte des Erftverbandes erhoben worden sind („RBF Rheinbach“, gefördert durch das MUNV NRW, und „Flex treat“, gefördert durch das BMBF) und umfassen damit die gesamte Betriebszeit des RBF+ seit Ende 2019. Es handelt sich ausschließlich um Messergebnisse, die im Routine-Betrieb des RBF erhoben worden sind, d.h. in seiner Funktion als weitergehende Behandlungsstufe der KA Rheinbach. Die Probenahme am Zulauf des RBF ist in diesem Fall daher gleichbedeutend mit einer Probenahme am Ablauf der (konventionellen) KA Rheinbach, mit einem ähnlichen Spektrum mehr oder weniger regelmäßig nachgewiesener Wirkstoffe wie in den Abläufen der anderen im Projekt untersuchten Kläranlagen. Dies sind im Wesentlichen Sulfamethoxazol und sein Synergist Trimethoprim, Clindamycin sowie die Makrolid-Antibiotika Clarithromycin, Azithromycin und Erythromycin. Alle anderen untersuchten Antibiotika sowie Triclosan werden im Zulauf des RBF gar nicht mehr oder nur noch vereinzelt nachgewiesen. An den verschiedenen RBF-Abläufen wird kein einziger Stoff noch regelmäßig nachgewiesen, mit Ausnahme von Sulfamethoxazol am Ablauf des (aktivkohlefreien) RBF-Segmentes 1.

Aufgrund der geringen Befundzahlen aller anderen Stoffe beschränkt sich die folgende Auswertung der gemessenen Konzentrationen auf Sulfamethoxazol. In dieser Auswertung sind ebenso wie in der Auswertung der Befundhäufigkeiten zusätzliche Daten aus den bereits

benannten Forschungsprojekten „RBF Rheinbach“ und „Flextrat“ inkludiert. Abbildung 27 zeigt die gemessenen Sulfamethoxazol-Konzentrationen im Zulauf sowie den Abläufen des RBF. Es wird deutlich, dass alle drei Segmente eine Konzentrationsreduktion bewirken, eine zuverlässige Reduktion auf Werte unterhalb der Berichtsgrenze aber nur in den Segmenten 2 und 3, d.h. mit zugesetzter GAK im Filterkörper möglich ist. Der Effekt der GAK wird im Detail in Abbildung 28 deutlich, in der für die einzelnen Filtersegmente der Verlauf der bestimmten Mediankonzentrationen für Sulfamethoxazol vom RBF-Zulauf über verschiedene Tiefen des Filterkörpers zum RBF-Ablauf dargestellt sind (jeweils zulaufnah und -fern). Auch diese Abbildung enthält zusätzliche Daten, die im Rahmen der anderen genannten Forschungsprojekte erhoben worden sind. Es zeigt sich, dass die Reduktion der Sulfamethoxazol-Konzentration in Segment 2 und 3 bereits in der obersten Schicht des Filterkörpers stärker ausfällt als in Segment 1 und der Unterschied bis zum RBF-Ablauf weitgehend bestehen bleibt (mit Ausnahme von Segment 2, zulaufnah, für welches sich die Mediankonzentration in der mittleren Filterkörperschicht zwischenzeitlich wieder der Mediankonzentration in Segment 1 annähert). Die GAK in Segment 2 und 3 befindet sich mit einem Masseanteil von 20 % in der obersten Filterschicht und mit einem Masseanteil von 30 % bzw. 40 % in der untersten Filterschicht.

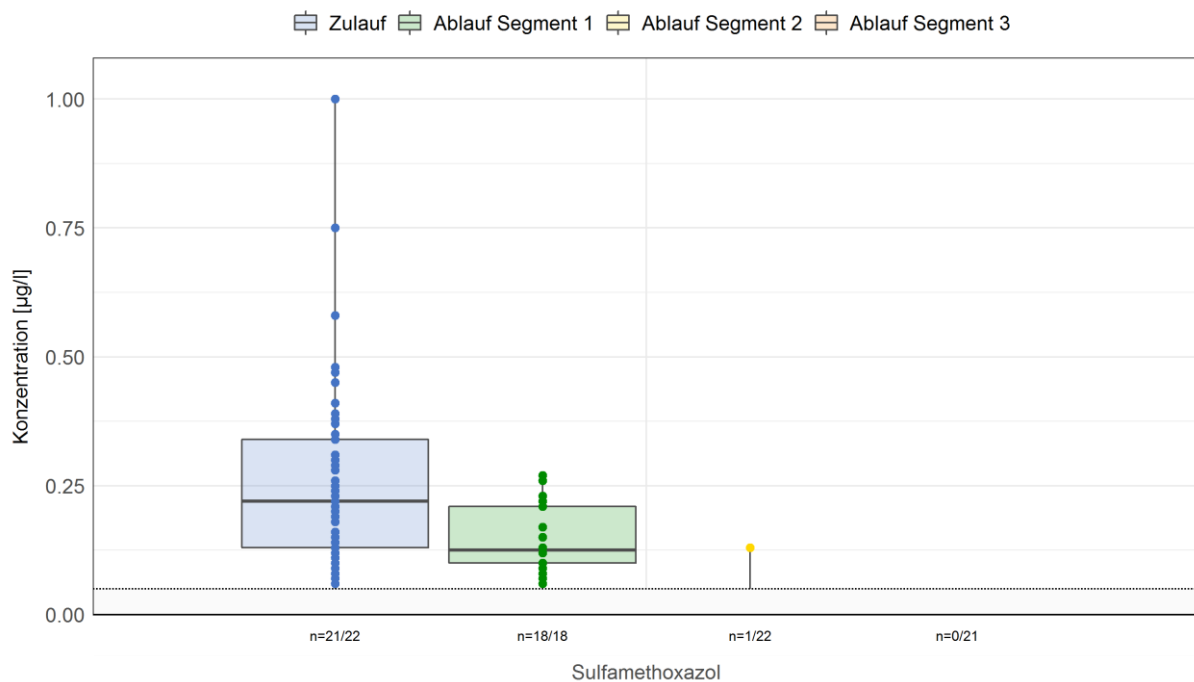


Abbildung 27: Konzentrationen von Sulfamethoxazol im RBF-Zulauf sowie den drei RBF-Abläufen (RBF-Segment 1 ohne GAK, Segment 2 und 3 mit GAK).

Die Darstellung ist an der Berichtsgrenze abgeschnitten. n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der Berichtsgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

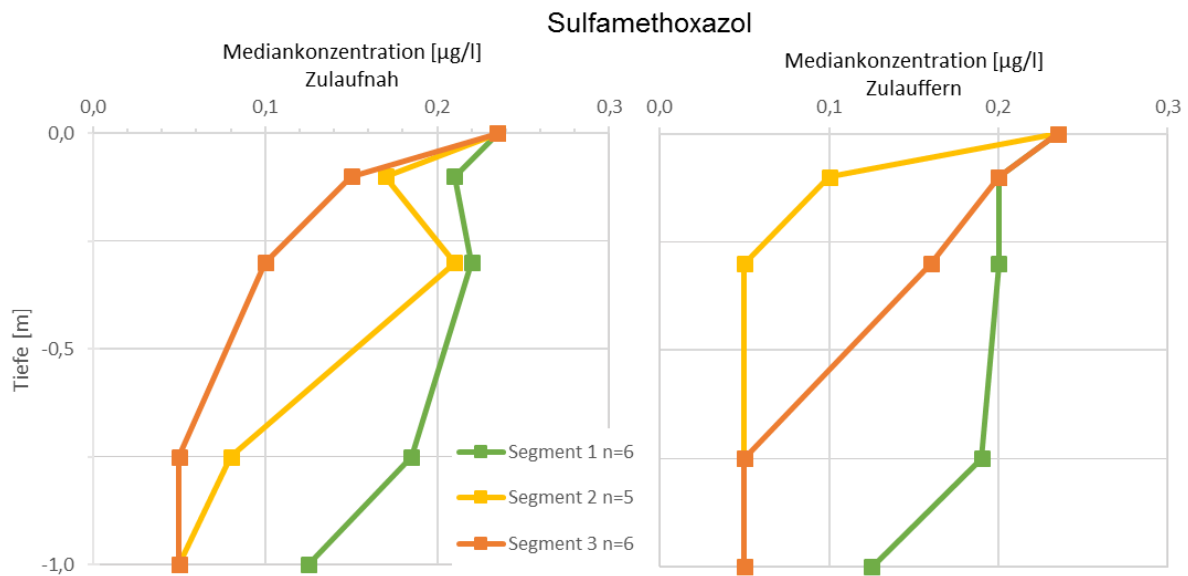


Abbildung 28: Mediankonzentration von Sulfamethoxazol in verschiedenen Tiefen des RBF-Filterkörpers nach RBF-Segment und Position relativ zum RBF-Zulauf- und Verteilerbauwerk.

Für die Darstellung werden Messwerte unterhalb der Berichtsgrenze gleich der Berichtsgrenze angenommen (0,05 µg/l, *worst-case*-Annahme). n bezeichnet die Anzahl der Messwerte pro Tiefe.

Abbildung 29 zeigt die Heatmap der Antibiotika-Befunde in den vom RBF+ behandelten Mischwasserabschlägen seit Beginn des Regelbetriebs Ende 2019. Aufgrund der Verdünnung des Schmutzwassers mit Regenwasser finden sich insgesamt geringere Antibiotika-Konzentrationen im Zulauf des RBF als im Ablauf der Kläranlage Rheinbach (entspricht Zulauf RBF+). Es werden dementsprechend seltener Antibiotika im Zulauf des RBF nachgewiesen als im Routinebetrieb. Auch die Zusammensetzung der im Zulauf nachgewiesenen Wirkstoffe ist gegenüber dem Routinebetrieb verändert: Clindamycin ist nun das am häufigsten nachgewiesene Antibiotika, gefolgt von Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Ciprofloxacin. In den Abläufen aller drei RBF-Segmente finden sich kaum Antibiotika wieder. Eine wichtige Ausnahme ist Sulfamethoxazol, das im Ablauf des ersten Filtersegments in 100 % der genommenen Mischwasserproben nachgewiesen wurde. Diese im Vergleich zum RBF-Zulauf erhöhte Befundrate geht einher mit tendenziell erhöhten Konzentration von Sulfamethoxazol im Ablauf von Filtersegment 1, was auf eine Rücklösung von Sulfamethoxazol bei der Behandlung von Mischwasser hindeutet (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Umkehr des Austauschs zwischen adsorbiertem und gelöstem Sulfamethoxazol im Filterkörper, wenn der Filter mit den geringeren Antibiotika-Konzentrationen aus der Mischwasserentlastung beaufschlagt wird. Dieser Effekt ist allerdings nur für das GAK-freie Filtersegment 1 zu beobachten. In den GAK-Segmenten 2 und 3 wird Sulfamethoxazol verlässlich auf Konzentrationswerte unterhalb der Berichtsgrenze reduziert, so dass keine Nachweise im Ablauf dieser Segmente vorliegen.

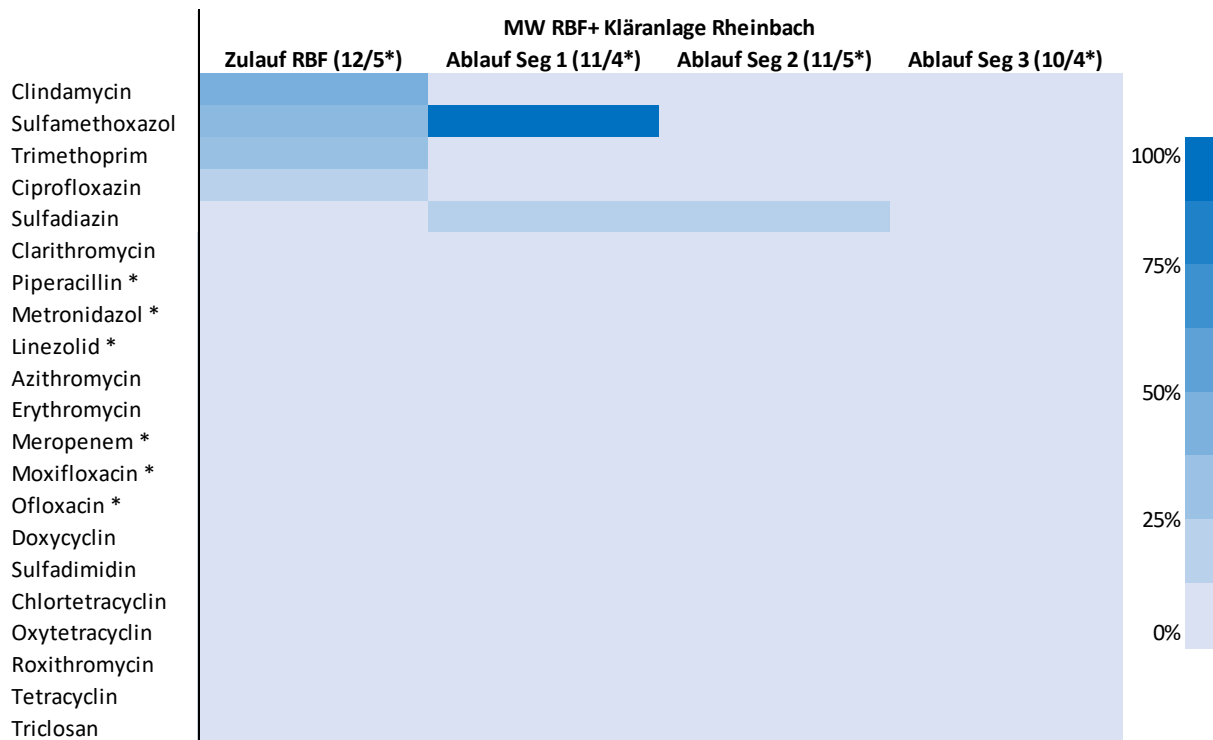


Abbildung 29: Positivbefunde der untersuchten Antibiotika an Zu- und Abläufen des RBF+ in Rheinbach (Mischwasserabschläge).

In Klammern ist die Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben angegeben, die von der jeweiligen Probenahmestelle stammen. Die dem Standardparameterkanon des Erftverbandes hinzugefügten Antibiotika (*) sind nicht in allen Abwasserproben untersucht worden, so dass sich die Probenzahl für diese Wirkstoffe wie angegeben verringert.

3.5.2 Indikatororganismen

Im Routine-Betrieb werden die Segmente des RBF+ alternierend mit dem Ablauf der KA Rheinbach beaufschlagt. Die Zulaufkonzentrationen (entspricht den Konzentrationen im Ablauf der KA Rheinbach) an somatischen Coliphagen lagen im Median bei $6,7 \times 10^2$ PBE/100mL. Im Ablauf aller drei Segmente lagen die Konzentrationen bei allen Proben unterhalb 10 PBE/100mL (Negativbefund in 10 mL Probe), mit einem maximalen Wert bei Segment 3 von 4 PBE/100mL. Im Regelbetrieb wurden *E. coli* Konzentrationen von $2,0 \times 10^3$ MPN/100mL (Median) im Zulauf des RBF gemessen. In den Segmenten 1 und 3 konnten nur in jeweils zwei von acht Proben ein positiver Nachweis von *E. coli* im Ablauf erfolgen. Bei Segment 2 gelang ein Nachweis bei sechs der acht Proben, mit einer medianen Konzentration von 26 MPN/100mL. Intestinale Enterokokken konnten im Regelbetrieb bei einer medianen Zulaufkonzentration von $9,0 \times 10^2$ MPN/100mL nur vereinzelt im Ablauf der Segmente nachgewiesen werden. Für *E. coli* und intestinale Enterokokken lagen die meisten Werte im Ablauf unterhalb der Nachweisgrenze des Verfahrens bei <15 MPN/100mL. *Clostridium* spp. bzw. *C. perfringens* wurden im Ablauf der Kläranlage in medianen Konzentrationen von $2,44 \times 10^2$ KBE/100mL bzw. 90 KBE/100mL nachgewiesen. In Segment 2 konnte in keiner der Proben nach der Passage *Clostridium* spp. nachgewiesen werden, in Segment 1 lag der maximale Wert der Konzentration bei $2,44 \times 10^2$ KBE/100mL *Clostridium* spp. (kein Nachweis von *C. perfringens*). Bei den Proben des Ablaufes von Segment 3 konnten in fünf von acht Proben *Clostridium* spp. und in sieben von acht Proben

C. perfringens nachgewiesen werden. Die mediane Konzentration für *Clostridium* spp. lag bei 5 KBE/100mL.

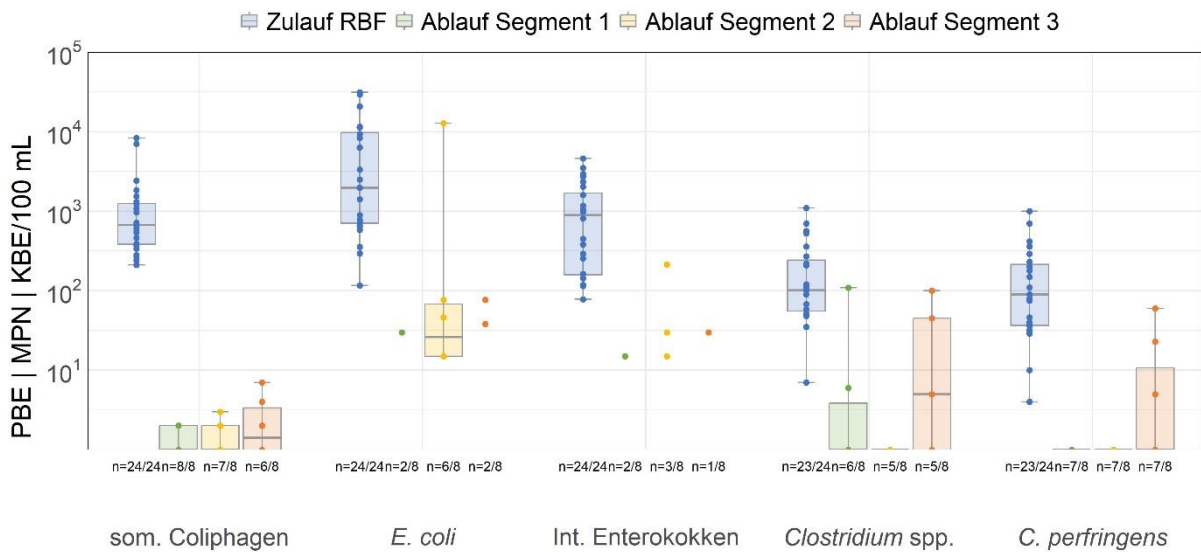


Abbildung 30: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) im Routine-Betrieb.

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Neben dem Regelbetrieb als vierte Reinigungsstufe wird der RBF+ im Falle von Starkregen zur Behandlung des Mischwassers eingesetzt. Das Mischwasser hat eine völlig andere mikrobiologische Zusammensetzung als das geklärte Abwasser der Kläranlage. Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der Indikatorparameter bei der Behandlung des Mischwassers. Es werden bei einem Ereignis alle Segmente gleichzeitig beaufschlagt, aber unabhängig voneinander beprobt.

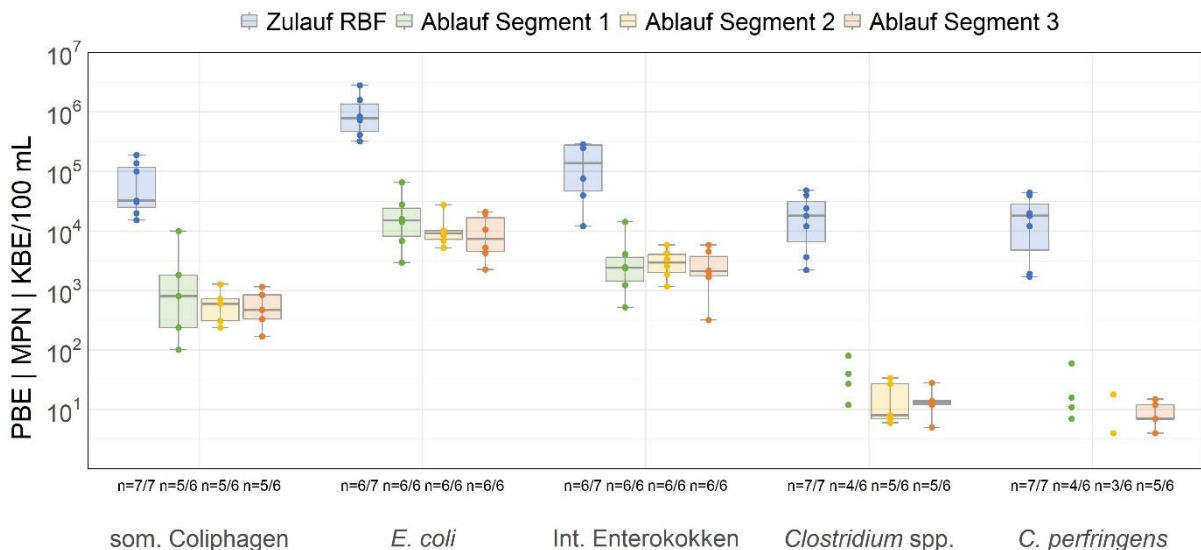


Abbildung 31: Konzentrationen der Indikatororganismen in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) im Falle eines Mischwasserabschlags.

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Im Mischwasser konnten im Median $3,2 \times 10^4$ PBE/100mL somatische Coliphagen, $7,8 \times 10^5$ MPN/100mL *E. coli*, $1,4 \times 10^5$ MPN/100mL intestinale Enterokokken und $1,8 \times 10^4$ KBE/100mL *Clostridium* spp. und *C. perfringens* nachgewiesen werden. Für die meisten Parameter unterscheiden sich die medianen Konzentrationen im Ablauf der Segmente kaum. Somatische Coliphagen konnten nach der Behandlung des Mischwassers durch den RBF in medianen Konzentrationen von $8,1 \times 10^2$ PBE/100mL (Segment 1), $6,0 \times 10^2$ PBE/100mL (Segment 2) und $4,8 \times 10^2$ PBE/100mL (Segment 3) nachgewiesen werden. *E. coli* wurde in medianen Konzentrationen von $1,5 \times 10^4$ MPN/100mL, $9,1 \times 10^3$ MPN/100mL und $7,4 \times 10^3$ MPN/100mL (Segment 1-3) detektiert, bei den intestinalen Enterokokken lagen die Konzentrationen im Ablauf bei $2,4 \times 10^3$ MPN/100mL, $2,9 \times 10^3$ MPN/100mL und $2,1 \times 10^3$ MPN/100mL. Für die sporenbildenden Parameter *Clostridium* spp. und *C. perfringens* konnten in den Abläufen der Segmente in Konzentrationen $<10^2$ KBE/100mL gefunden werden.

Wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben wurden neben den Zu- und Abläufen der Segmente des RBF+ auch zulaufnahe und zulaufferne Zwischenschichten untersucht. In die Auswertung mit aufgenommen wurden für die Indikatorparameter die Parameter *E. coli* (Abbildung 32) und intestinale Enterokokken (Abbildung 33). Für beide Parameter lässt sich feststellen, dass bereits in einer Tiefe von 0,3 m keine Nachweise mehr erfolgen konnten. Auch Zacharias et al. (2020) konnten beschreiben, dass der Rückhalt für mikrobiologische Parameter zum größten Teil in der Schicht 0,1 m bis 0,3 m erfolgte.

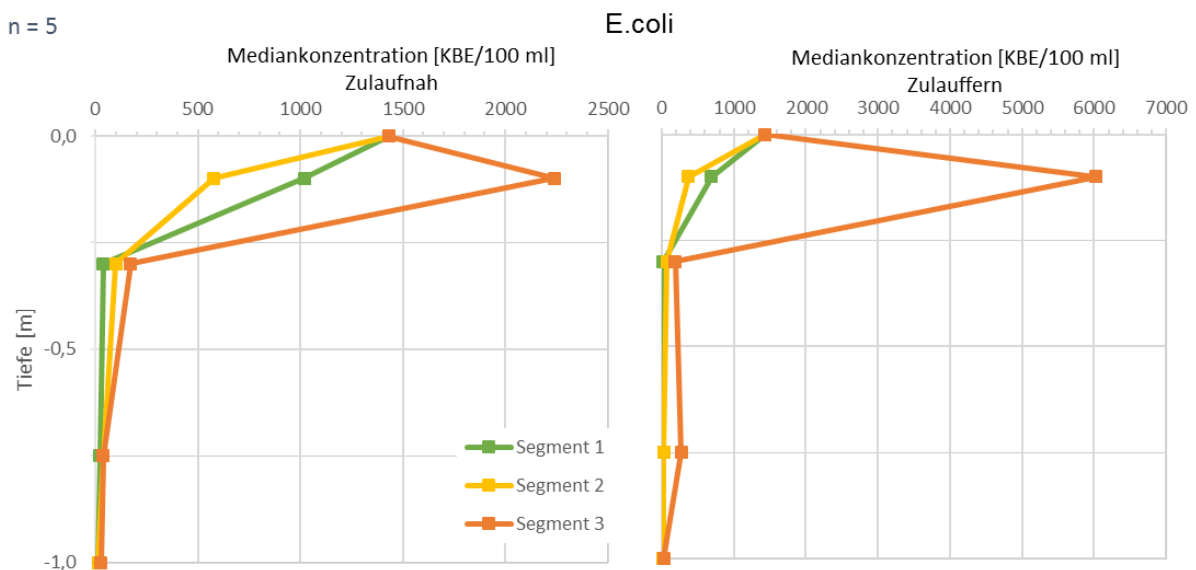


Abbildung 32: Mediankonzentration von *E. coli* in verschiedenen Tiefen des RBF-Filterkörpers nach RBF-Segment und Position relativ zum RBF-Zulauf- und Verteilerbauwerk.

n bezeichnet die Anzahl der Messwerte pro Tiefe.

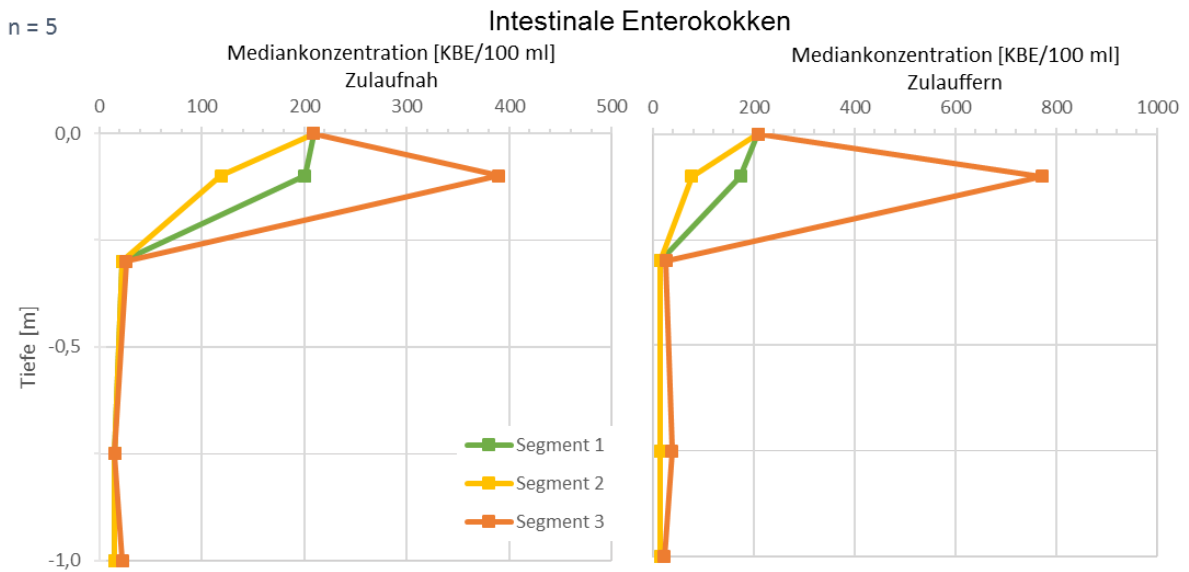


Abbildung 33: Mediankonzentration von intestinalen Enterokokken in verschiedenen Tiefen des RBF-Filterkörpers nach RBF-Segment und Position relativ zum RBF-Zulauf- und Verteilerbauwerk.
n bezeichnet die Anzahl der Messwerte pro Tiefe.

3.5.3 Antibiotika-resistente Bakterien

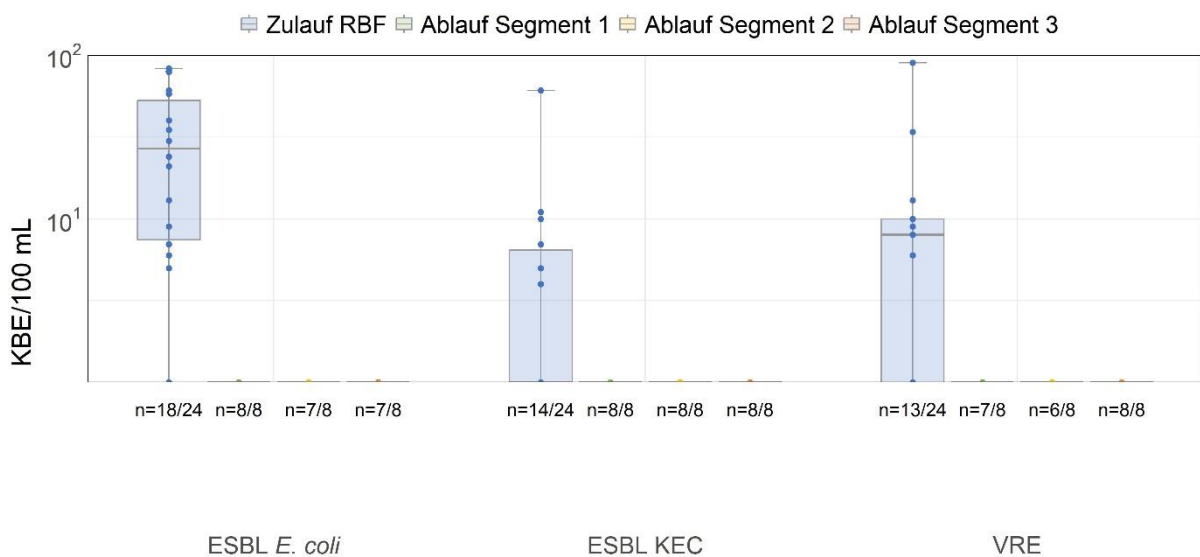


Abbildung 34: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) im Routine-Betrieb.

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

In Abbildung 34 sind die Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach gezeigt. Im Zulaufwasser vom Retentionsbodenfilter sind mediane Konzentrationen von 27 KBE/100mL ESBL-produzierenden *E. coli* und 8 KBE/100mL VRE ermittelt worden. Der Median für ESBL-produzierende KEC lag bei 0 KBE/100mL, eine maximale Konzentration konnte mit 61 KBE/100mL bestimmt werden. In den Abläufen der Segmente lagen die Messwerte für die gezeigten Antibiotika-resistenten Bakterien ausschließlich bei 0 KBE/100mL. Pro Probe am

Zulauf des RBF+ wurden im Regelbetrieb im Durchschnitt sieben Isolate von den CHROMagar ESBL Platten abgeimpft und weiter charakterisiert. Nach finaler Auswertung mittels MALDI-TOF-MS wurden 133 Isolate weiter hinsichtlich der phänotypischen Resistenz (Kapitel 2.2.4) getestet. Im Ablauf der Segmente konnten im Regelbetrieb nur fünf Isolate gewonnen werden, die den Zielorganismen entsprachen.

Abbildung 35 zeigt die Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach bei einem Mischwasserabschlag. Das ungeklärte Abwasser, das nach einem Starkregenereignis aufgrund der ausgelasteten Aufnahmekapazität der KA Rheinbach auf den Retentionsbodenfilter geleitet wurde, hatte im Zulauf mediane Konzentrationen von $6,71 \times 10^3$ KBE/100mL ESBL-produzierenden *E. coli* und $6,00 \times 10^2$ KBE/100mL ESBL-produzierenden KEC), sowie maximale Konzentrationen VRE von $2,80 \times 10^3$ KBE/100 mL. Man beachte, dass diese Konzentrationen im abgeschlagenen Mischwasser ca. 1-2 Log-Stufen oberhalb der zugehörigen Konzentrationen geklärten Abwasser aus dem KA-Ablauf liegen (siehe die oben gezeigten Zulaufdaten im Routine-Betrieb). ESBL-produzierende *E. coli* wurden im Ablauf von Segment 1 ausgehend vom Median mit $7,71 \times 10^1$ KBE/100mL detektiert. Die mediane Konzentration der Abläufe von Segment 2 und 3 liegen bei $5,43 \times 10^1$ KBE/100mL und $4,20 \times 10^1$ KBE/100mL. Somit werden ESBL-produzierende *E. coli* vom RBF+ um bis zu 2 Log-Stufen reduziert.

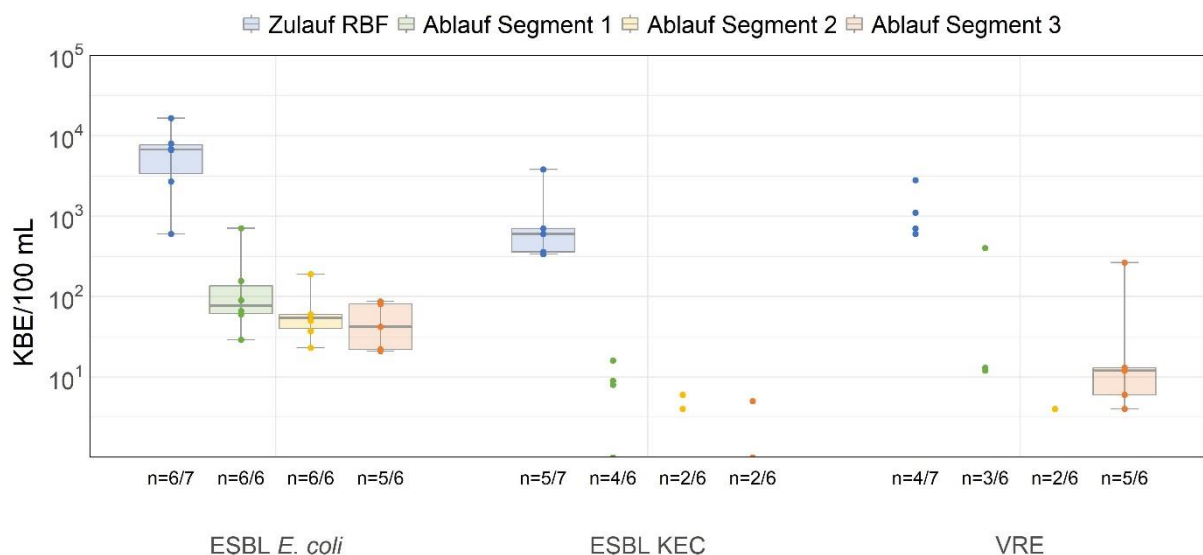


Abbildung 35: Konzentrationen der Antibiotika-resistenten Bakterien in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) bei Mischwasserabschlag.

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. nachweisbar und statistisch sicher, siehe Abschnitt 3.1) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Pro Probe am Zulauf des RBF+ wurden im Mischwasserbetrieb im Durchschnitt 20 Isolate abgeimpft und weiter getestet (siehe Abschnitt 2.2.4).

Auch die einzelnen Zwischenschichten wurden auf das Vorkommen von Antibiotika-resistenten Bakterien hin untersucht. Analog zu den in Kapitel 3.5.2 dargestellten (nicht-resistenten) Parametern, wurden in der hier dargestellten Auswertung die Parameter ESBL-produzierende *E. coli* und VRE ausgewählt.

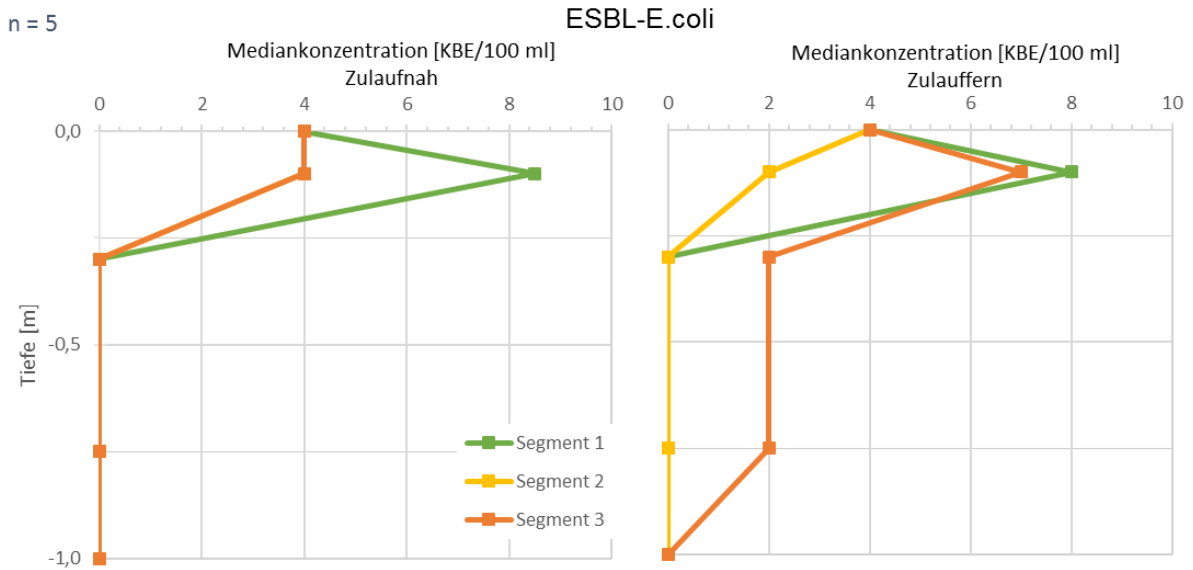


Abbildung 36: Mediankonzentration von ESBL-produzierenden *E. coli* in verschiedenen Tiefen des RBF-Filterkörpers nach RBF-Segment und Position relativ zum RBF-Zulauf- und Verteilerbauwerk. n bezeichnet die Anzahl der Messwerte pro Tiefe.

Für fast alle Segmente lässt sich feststellen, dass bereits in einer Tiefe von 0,3 m keine Nachweise mehr erfolgen konnten. In den zulauffernen Proben des Segmentes 3 konnten in einer Tiefe von 0,3 m noch ganz vereinzelt ESBL-produzierende *E. coli* nachgewiesen werden, die auch noch bis zu einer Tiefe von 0,75 m nachweisbar waren. Im Ablauf des Segmentes konnten dann aber keine ESBL-produzierenden Bakterien mehr nachgewiesen werden. Außerdem konnte in den zulaufnahen Proben des Segmentes 1 auch in einer Tiefe von 0,3 m VRE nachgewiesen werden. In tieferen Schichten und im Ablauf erfolgte kein Nachweis mehr. Zulauffern konnte bereits in einer Tiefe von 0,1 m kein Nachweis von VRE erfolgen.

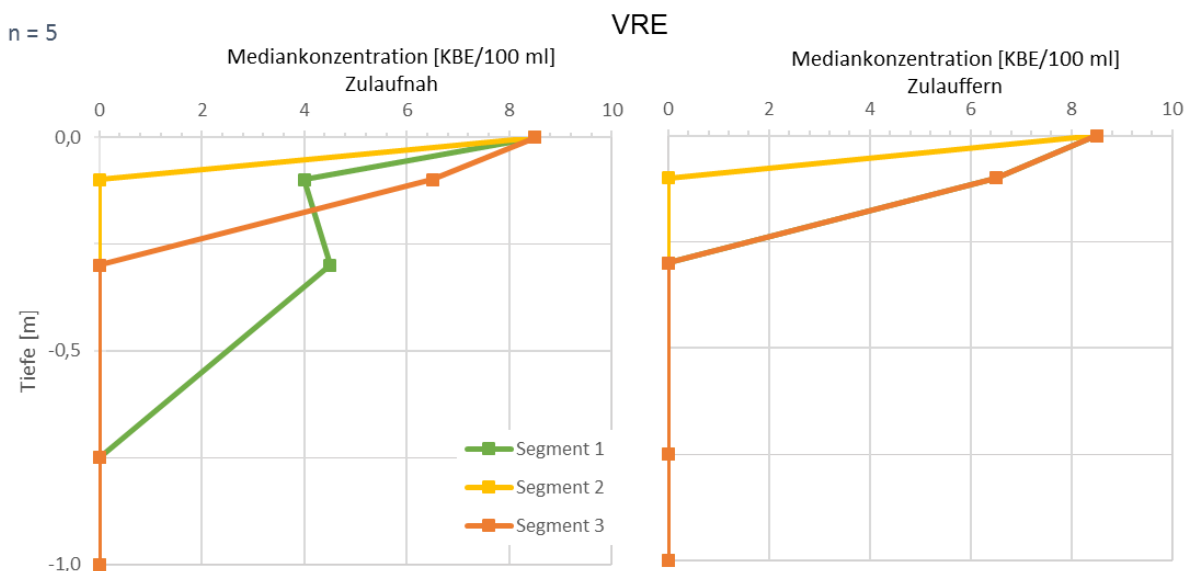


Abbildung 37: Mediankonzentration von VRE in verschiedenen Tiefen des RBF-Filterkörpers nach RBF-Segment und Position relativ zum RBF-Zulauf- und Verteilerbauwerk. n bezeichnet die Anzahl der Messwerte pro Tiefe. Zulauffern wird der Verlauf der Mediane für Segment 1 vollständig durch den Verlauf der Mediane von Segment 2 verdeckt.

3.5.4 Antibiotikaresistenzgene

Im Regelbetrieb werden die Segmente des RBF+ alternierend mit dem Ablauf der KA Rheinbach beaufschlagt. In Abbildung 38 ist das Vorkommen der ARGs *mcr-1*, *bla_{TEM}*, *bla_{NDM-1}* und *ermB* in diesen Proben zusammengefasst. Im Ablauf der Kläranlage Rheinbach (Zulauf RBF) konnten lediglich die Resistenzgene *ermB* und *bla_{TEM}* mit medianen Konzentrationen von $9,9 \times 10^4$ GU/100mL und $5,9 \times 10^3$ GU/100mL nachgewiesen werden. Die beiden ARGs *mcr-1* und *bla_{NDM-1}* konnten nur in vereinzelt Proben des Kläranlagenablaufs detektiert werden. Die maximalen Werte lagen bei $1,8 \times 10^3$ GU/100mL bzw. $2,2 \times 10^3$ GU/100mL.

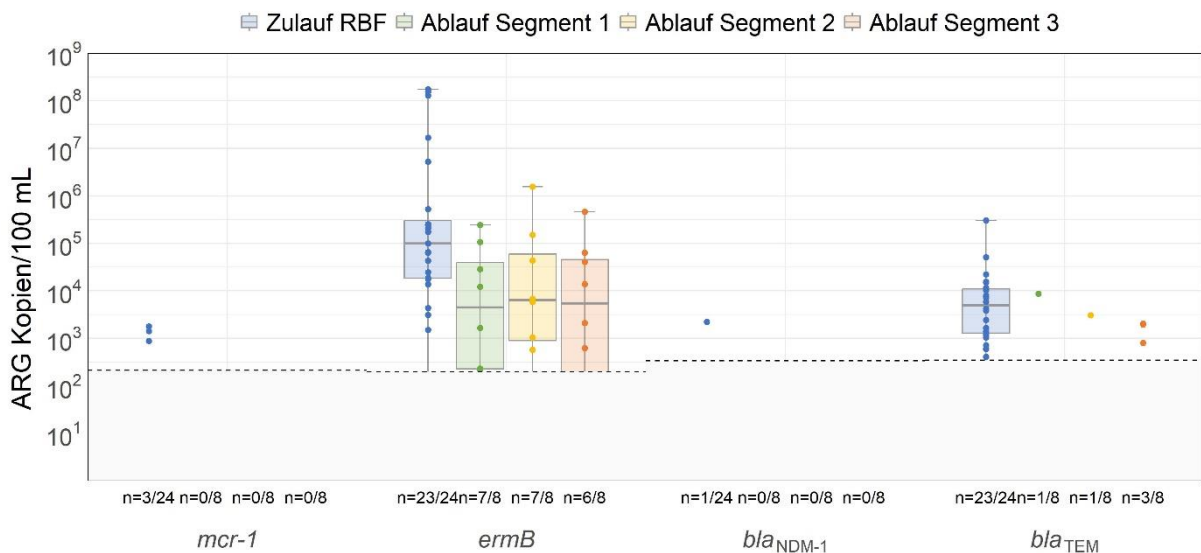


Abbildung 38: Konzentrationen der ARG in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) im Regelbetrieb.

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der jeweiligen LOD = Nachweisgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

Im Ablauf aller drei Segmente des Retentionsbodenfilters lagen die Konzentrationen der Resistenzgene *mcr-1* und *bla_{NDM-1}* unterhalb des jeweiligen LOD. Auch *bla_{TEM}* zeigte ein deutlich reduziertes Vorkommen mit nur vereinzelt Proben >LOD. Bei dem Gen *ermB* kann eine Reduktion über die medianen Konzentrationen im Zu- und Ablauf des RBF im Regelbetrieb von ca. 1,5 Log-Stufen gezeigt werden. Der Anteil der Aktivkohle im Filterkörper scheint auf die Reduktion dieses ARGs keinen Einfluss zu haben.

Zusätzlich zum Routine-Betrieb des RBF+ wurde das Vorkommen der Resistenzgene auch für die Behandlung von Mischwasser untersucht. Vergleichend mit der Beprobung im Regelbetrieb, traten auch bei den Mischwasserabschlägen die beiden ARGs *ermB* und *bla_{TEM}* am häufigsten und in den höchsten Konzentrationen auf. Die mediane Konzentration für *ermB* lag dabei bei $3,3 \times 10^5$ GU/100 mL und die mediane Konzentration von *bla_{TEM}* bei $3,9 \times 10^5$ GU/100 mL. Das Gen *mcr-1* konnte nur in vier von sieben Proben detektiert werden, darunter war eine Probe mit einem Maximalwert von $5,6 \times 10^{11}$ GU/100 mL (Ausreißer). Das ARG *bla_{NDM-1}* konnte nur in einer einzelnen Probe im Ablauf des Segmentes 2 nachgewiesen werden und wies für alle Mischwasserproben Konzentrationen unterhalb der LOD auf. Im Ablauf der Segmente 1-3 konnte in fast allen Proben (n=6) das Resistenzgen *bla_{TEM}* nachgewiesen werden. Die medianen Konzentrationen lagen von Segment 1-3 bei $4,4 \times 10^3$ GU/100mL, $8,9 \times 10^3$ GU/100mL und $1,7 \times 10^4$ GU/100mL.

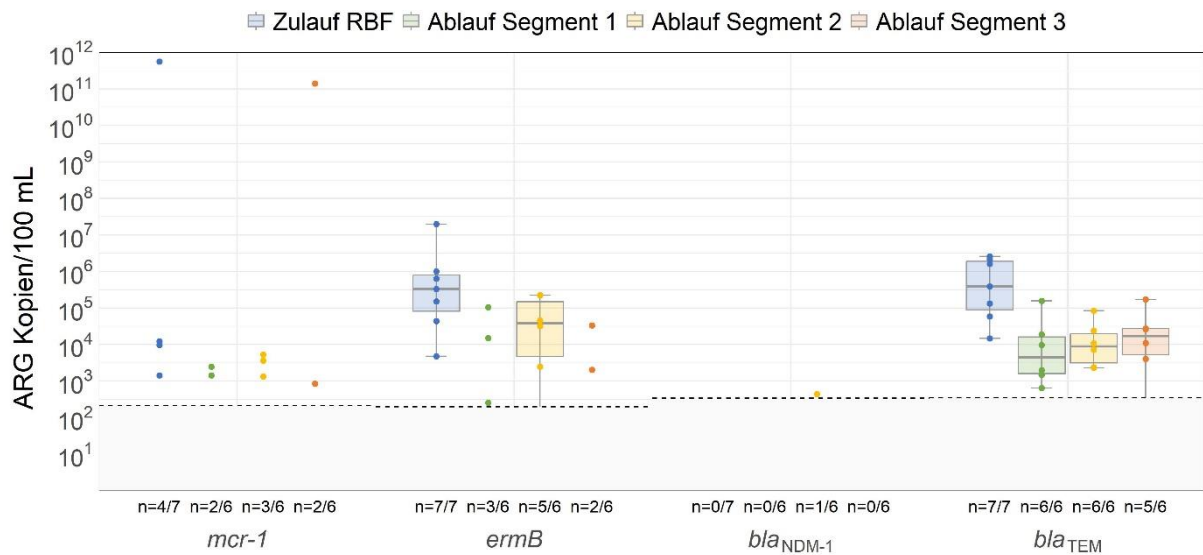


Abbildung 39: Konzentrationen der ARG in den Proben des Monitoring-Programms KA Rheinbach (Retentionsbodenfilter) bei einem Mischwasserabschlag.

n gibt die Anzahl der quantifizierbaren Konzentrationen (d.h. Konzentrationen oberhalb der jeweiligen LOD = Nachweisgrenze) im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Abwasserproben an.

4. Synoptische Bewertung und Einordnung der Ergebnisse

4.1 Krankenhausabwasser

Abwasser stellt einen wichtigen potenziellen Verbreitungsweg für Antibiotika-resistente Organismen dar (Bougnom and Piddock, 2017). Die Biomasse von menschlichen und tierischen (Haus- und Nutztiere) Fäkalien nimmt seit 2003 schätzungsweise um mehr als 52 Milliarden Kilogramm pro Jahr zu; es wird erwartet, dass die insgesamt produzierten Fäkalien bis zum Jahr 2030 mindestens 4,6 Billionen Kilogramm pro Jahr erreichen werden (Berendes et al., 2018). Der Einsatz von Antibiotika schafft einen Selektionsdruck auf Bakterien, der die Entwicklung resistenter Stämme begünstigt. Diese Resistenz kann sich weiterverbreiten, da resistente Bakterien sich vermehren und Resistenzgene durch horizontalen Gentransfer (HGT) innerhalb derselben Art oder zwischen verschiedenen Arten übertragen werden können (Burmeister, 2015; Zarei-Baygi and Smith, 2021). Dabei können Abwässer im Allgemeinen medizinisch wichtige Antibiotika-resistente Bakterien, wie Carbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* enthalten, einschließlich besonders resistenter Stämme in Krankenhausabwässern (Lamba et al., 2017; Voigt et al., 2020). Im wissenschaftlichen Diskurs wurde die Überwachung von Krankenhausabwässern als mögliche Ressourcen-effiziente Ergänzung zur herkömmlichen klinischen Überwachung von Antibiotikaresistenzen vorgeschlagen, da eine einzige Abwasserprobe Bakterien von einer großen Zahl von Personen enthält.

In dem Projekt HyReKA wurde durch das Institut für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen eine Bewertung der urbanen Gewässereinträge und Möglichkeiten der Eintragsminderung dargestellt (Pinnekamp et al., 2019). Auf der Abschlusskonferenz des HyReKA-Projektes (04.04.2019, Berlin) wurde anhand der Projektdaten sowie einer modellgestützten Frachtbilanzierung der Frage nachgegangen, ob Krankenhäuser oder Siedlungsgebiete für den Haupteintrag von Antibiotika, Antibiotika-resistenten Bakterien und Antibiotikaresistenzgenen verantwortlich sind. Die Antwort fällt je nach Parameter unterschiedlich aus. Substanzen wie Meropenem, Linezolid und Ampicillin werden gemäß HyReKA-Daten vornehmlich über Krankenhäuser in das Abwasser entlassen. Auch Piperacillin wird mit ca. 80 % der Gesamtfracht aus Krankenhausabwasser identifiziert. Die Substanz Amoxicillin wurde dagegen mit einem Anteil von 100 % an der Gesamtfracht aus dem Siedlungsgebiet emittiert. Über alle im HyReKA-Projekt untersuchten Wirkstoffe wurden mehr als 80 % der Gesamtfracht dem Siedlungsgebiet als Ursprung zugeordnet.

In dem Projekt ARA wurde Abwasser von zwei Krankenhäusern der Grund- und Regelversorgung untersucht, um deren Rolle bei dem Austrag von Antibiotika, Antibiotika-resistenten Bakterien und Resistenzgenen in die Umwelt zu bewerten. Die Untersuchung der im ARA-Projekt genommenen Proben auf Antibiotika zeigt, dass sich im näherungsweise unverdünnten Klinikabwasser extrem hohe Antibiotika-Konzentrationen einstellen können. So wurden beispielsweise in einzelnen Klinikabwasserproben aus Grevenbroich Tagesdurchschnittskonzentrationen für Piperacillin von deutlich über einem 1 mg/l gemessen. Solch hohe Wirkstoffkonzentrationen lassen die Selektion von Antibiotika-resistenten Krankheitserregern im Kanalsystem – zumindest lokal – möglich erscheinen (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016; Voigt et al., 2020). Piperacillin scheint darüber hinaus auch ein hochspezifischer Marker für einen Klinikeinfluss in kommunalem Abwasser zu sein: An den im ARA-Projekt untersuchten KA-Zuläufen mit Klinikeinfluss wurde Piperacillin praktisch immer nachgewiesen, an den übrigen KA-Zuläufen ohne Klinikeinfluss war es hingegen nie oder nur vereinzelt detektierbar.

Die Untersuchungen in ARA zeigten Konzentrationen von ESBL-produzierenden Bakterien (bzw. 3GCR Bakterien) im Rohabwasser von 10^5 KBE/100mL, unabhängig von der Herkunft des Abwassers (klinisch oder nicht klinisch, siehe Kapitel 3.3.3 und 3.4.3). Auch die gemessenen Konzentrationen in den Proben nach konventioneller Abwasseraufbereitung (Kapitel 3.3.3 und 3.5.3) zeigten unabhängig von einer klinischen Beeinflussung Befunde in der gleichen Größenordnung. Damit werden die Ergebnisse aus dem HyReKA-Projekt hinsichtlich des ubiquitären Vorhandenseins dieser Bakterien im Abwasser bestätigt. Auch dort lagen die medianen Konzentrationen im Rohabwasser (klinisch und nicht klinisch) im Bereich 5 Log-Stufen KBE/100mL und im behandelten Abwasser zwischen 10^1 und 10^2 KBE/100mL (Zacharias, 2021). Blaak et al. (2015) konnten ESBL-produzierende *E. coli* ebenfalls in klinischem und kommunalem Abwasser nachweisen. Anders als die Daten aus dem ARA und HyReKA Projekt zeigten, wurden die Konzentrationen im Median von den Autoren für das klinische Abwasser mit $2,0 \times 10^9$ KBE/100mL und für das kommunale Abwasser mit $8,2 \times 10^7$ KBE/100mL angegeben. Auch Bréchet et al. (2014) stellten fest, dass die ESBL-produzierende *E. coli*-Belastung im Krankenhausabwasser höher als im kommunalen Abwasser war ($2,7 \times 10^6$ bzw. $8,0 \times 10^4$ KBE/100mL). ESBL-produzierende *E. coli* wurden dort in fast allen Umweltproben gefunden und machten 0,3 % aller *E. coli* im Rohwasser des Kläranlagenzulaufes aus.

Für den Parameter ESBL-produzierende KEC konnte festgestellt werden, dass die Konzentration der Antibiotika-resistenten Bakterien in klinisch beeinflusstem Abwasser größer war als im nicht klinisch beeinflussten Abwasser, was eher den Ergebnissen der genannten Publikationen für den Parameter ESBL-produzierende *E. coli* entspricht. Im klinischen Rohabwasser lagen die Konzentrationen der ESBL-KEC im ARA Projekt im Bereich 10^6 KBE/100mL (Abbildung 13 und Abbildung 14) und im klinisch nicht beeinflussten Abwasser bei 10^4 KBE/100mL (Abbildung 22 und

Abbildung 23). Diese Ergebnisse bestätigen auch die in dem Projekt HyReKA formulierten Aussagen für das Abwasser des dort untersuchten Maximalversorgers. Hassoun-Kheir et al. (2020) stellten in einem Literatur-Review die Ergebnisse aus 37 Publikationen zusammen, die sich mit dem Vergleich von klinischem und kommunalem Abwasser beschäftigten. Die Autoren stellten fest, dass 30 von 37 (81 %) der eingeschlossenen Studien eine höhere Menge an Antibiotikaresistenz-Determinanten in Krankenhausabwässern beobachten konnten. Im Rahmen des ARB-Projekts (2019-2022) des LANUV wurden *E. coli*- sowie KEC-3GCR in sämtlichen Krankenhausabwasser- bzw. Abwasserproben mit klinischem Einfluss sowie in allen Rohabwasser- und behandelten Abwasserproben nachgewiesen. Das Vorkommen von 4MRGN-Erregern konnte hingegen nur in klinisch beeinflusstem Abwasser nachgewiesen werden (Dericks et al., 2023). Für die im HyReKA Projekt untersuchten Antibiotika-resistenten Bakterien wurde ausgewertet, dass diese unabhängig einer Multiresistenz zu fast 100 % der Gesamtfracht aus dem Siedlungsgebiet stammen (Pinnekamp et al., 2019). Dies ist damit zu begründen, dass die gegen ein Cephalosporin der 3. Generation resistenten Bakterien bereits ubiquitär vorhanden sind, und die Abwassermengen aus dem Siedlungsabwasser sehr viel größer sind als aus dem Klinikbereich.

Pinnekamp et al. (2019) stellten daneben auch für die im HyReKA-Projekte untersuchten ARG vor, welcher Anteil der Gesamtfrachten von Krankenhausabwasser oder von Abwasser des Siedlungsgebietes stammt. Die untersuchten Antibiotikaresistenzgene *bla_{NDM-1}* und *bla_{TEM}* wurden im HyReKA Projekt als Gene identifiziert, die mit einem höheren Anteil an der Gesamtfracht aus Krankenhäusern entlassen werden. Die Gene *ermB* und *mcr-1* hingegen wurden mit einem Anteil von mehr als 90 % aus dem Siedlungsgebiet identifiziert. Im ARA-

Projekt wurde das Vorhandensein und die Konzentration von vier Resistenzgenen (Tabelle 8) in den Abwasserproben untersucht. Um zu untersuchen, ob die einzeln gemessenen Resistenzgene im Projekt ARA in den unterschiedlichen Abwassermatrizes in deutlich anderen Konzentrationen und Häufigkeiten nachgewiesen werden konnten, wurden die Einzelergebnisse nach der Herkunft der Probe gruppiert. Die beiden Abläufe der Kliniken (Marien-Hospital Euskirchen und Elisabethkrankenhaus Grevenbroich) werden unter „Krankenhausabwasser“ zusammengefasst. Die Zuläufe der Kläranlagen, die dieses Abwasser aufnehmen, werden als „klinisch beeinflusstes Rohabwasser“ und die Zuläufe der KA Glessen und des GWK Kaarst-Nordkanal als „klinisch unbeeinflusstes Rohabwasser“ klassifiziert. Die Befunde an den Probenahmestellen des aufbereiteten Abwassers sind nach „Ablauf konventionelle KA“ (Ablauf KA Grevenbroich, Ablauf GWK Euskirchen-Kessenich, Ablauf KA Rheinbach), „Ablauf MBR“ (Ablauf KA Glessen, Ablauf GWK Kaarst-Nordkanal) und „Ablauf RBF+“ (alle drei Segmente) unterschieden.

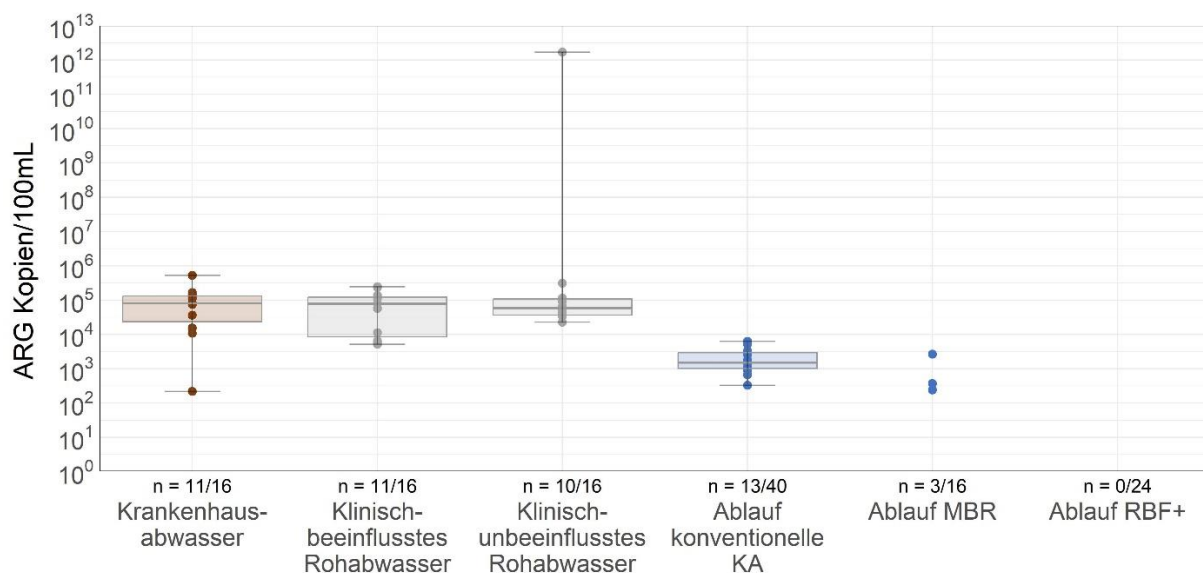


Abbildung 40: Nachweishäufigkeit und gemessene Konzentrationen des Resistenzgens *mcr-1* in den nach Abwassermatrix gruppierten Probenahmestellen.

Das Gen *mcr-1* konnte anteilig ähnlich häufig im Krankenhausabwasser und im klinisch beeinflussten Abwasser wie auch im klinisch unbeeinflusstem Abwasser nachgewiesen werden. Auch bezüglich der gemessenen Konzentration kann keine Unterscheidung gemacht werden. Der Wert von *mcr-1* im Zulauf der KA Glessen ist wahrscheinlich als Ausreißer zu werten. Hembach et al. (2017) haben das *mcr-1* Gen in den HyReKA-Rohabwasser-Proben ebenfalls nachgewiesen. Die untersuchten Kläranlagen behandelten sowohl städtisches als auch ländliches Abwasser, nicht alle wiesen Kliniken im Einzugsgebiet auf. Pires et al. (2023) konnten in einer größeren Studie aus Portugal zeigen, dass die Nachweishäufigkeit des *mcr-1* Gens in kommunalem Abwasser höher war als in Krankenhausabwasser.

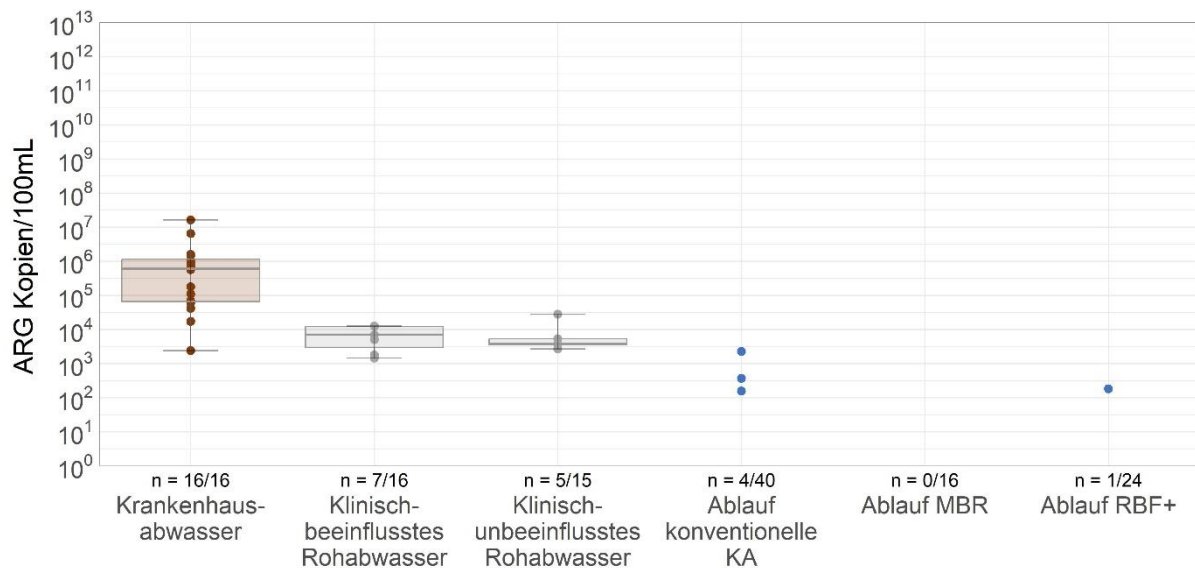


Abbildung 41: Nachweishäufigkeit und gemessene Konzentrationen des Resistenzgens *bla_{NDM-1}* in den nach Abwassermatrix gruppierten Probenahmestellen.

Das Gen *bla_{NDM-1}* wurde sehr überwiegend im Krankenhausabwasser nachgewiesen (100 % der Proben, Abbildung 41). In dieser Abwassermatrix war auch die Konzentration am höchsten. Im klinisch beeinflusstem Abwasser waren Nachweishäufigkeit und Konzentration sehr ähnlich zum klinisch unbeeinflussten Rohabwasser. Im Ablauf der konventionellen Kläranlagen und nach weitergehender Abwasserbehandlung konnte das Gen nur noch sehr vereinzelt nachgewiesen werden.

Lamba et al. (2018) fanden in Abwasserkanalsystemen in Indien Konzentrationen von 10^8 - 10^{10} GU/100 mL des *bla_{NDM-1}* Gens in kommunalem Abwasser, in klinischem Abwasser lagen die Konzentrationen bei 10^{10} - 10^{15} GU/100 mL. Diese Werte sind mit den Gegebenheiten in Deutschland nicht zu vergleichen, da die Nutzung von Antibiotika eine andere ist. Die Befunde dort sind besonders problematisch aufgrund des hohen Antibiotikakonsums, der großen Bevölkerungsdichte und der unzureichenden Abwasserbehandlung. Krankenhäusern wiesen laut den Autoren um bis zu 9 Größenordnungen höhere Konzentrationen des *bla_{NDM-1}* Gens auf als das Abwasser aus örtlichen Kanalisationen.

Lee et al. (2017) konnten in Zuläufen von kommunalen Kläranlagen Konzentrationen der ARGs *bla_{TEM}* und *ermB* von 4×10^4 - 1×10^6 GU/ μ L bzw. 1×10^5 - 2×10^6 GU/ μ L Extrakt nachweisen. Im Ablauf der kommunalen Kläranlagen konnte eine Reduktion des *bla_{TEM}* Gens um 2-3 Log-Stufen festgestellt werden, für das Gen *ermB* waren es 4 Log-Stufen.

Pires et al. (2023) konnten zeigen, dass die Nachweishäufigkeit von *bla_{TEM}* in Klinikabwasser statistisch signifikant höher war als im Zulauf der behandelnden Kläranlagen. Für das Gen *mcr-1* war die Beobachtung umgekehrt. Auch die Konzentrationen waren für das Gen *bla_{TEM}* im Zulauf der Kläranlagen höher als im Klinikabwasser und das Umgekehrte galt wiederum für das *mcr-1* Gen. Die Konzentrationen im Abwasser von *bla_{TEM}* lagen dabei deutlich über denen des *mcr-1* Gens.

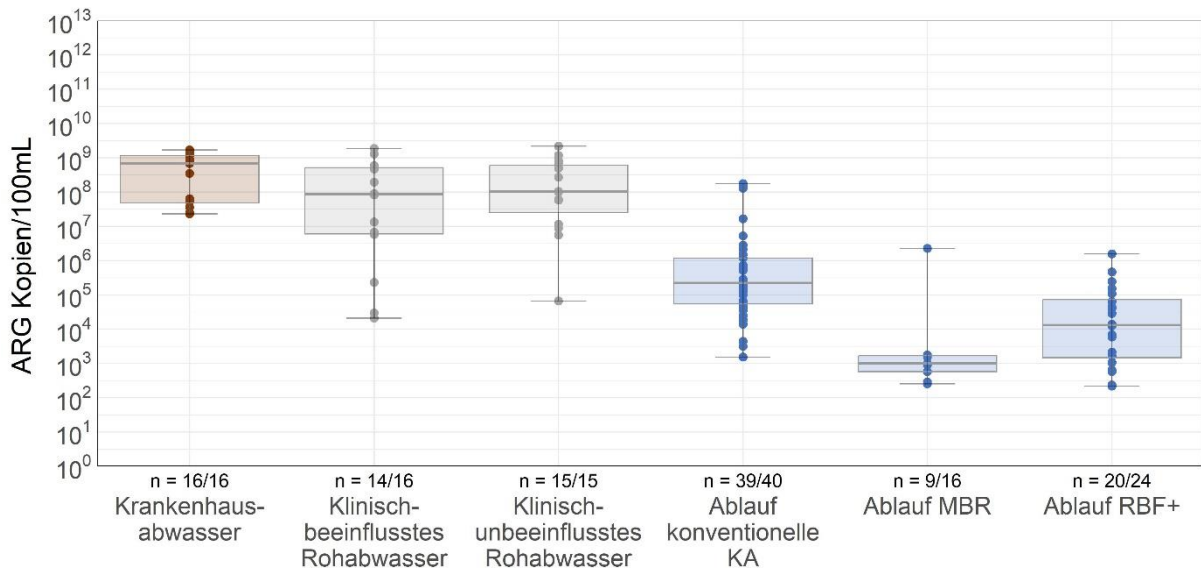


Abbildung 42: Nachweishäufigkeit und gemessene Konzentrationen des Resistenzgens *ermB* in den nach Abwassermatrix gruppierten Probenahmestellen.

Im Gegensatz dazu gab es in der Abundanz von *ermB* und *bla_{TEM}* keinen Unterschied zwischen klinisch beeinflusstem und klinisch unbeeinflusstem Abwasser (Abbildung 42 und Abbildung 43). Das Gen *ermB* wurde gewählt, weil es laut Literatur und den Ergebnissen des Projektes HyReKA bereits sehr verbreitet in der Umwelt vorkommt und so, eine Aussage zu den unterschiedlichen Reduktionen in den untersuchten Kläranlagen ermöglicht. Gleiches gilt hier für das ARG *bla_{TEM}*.

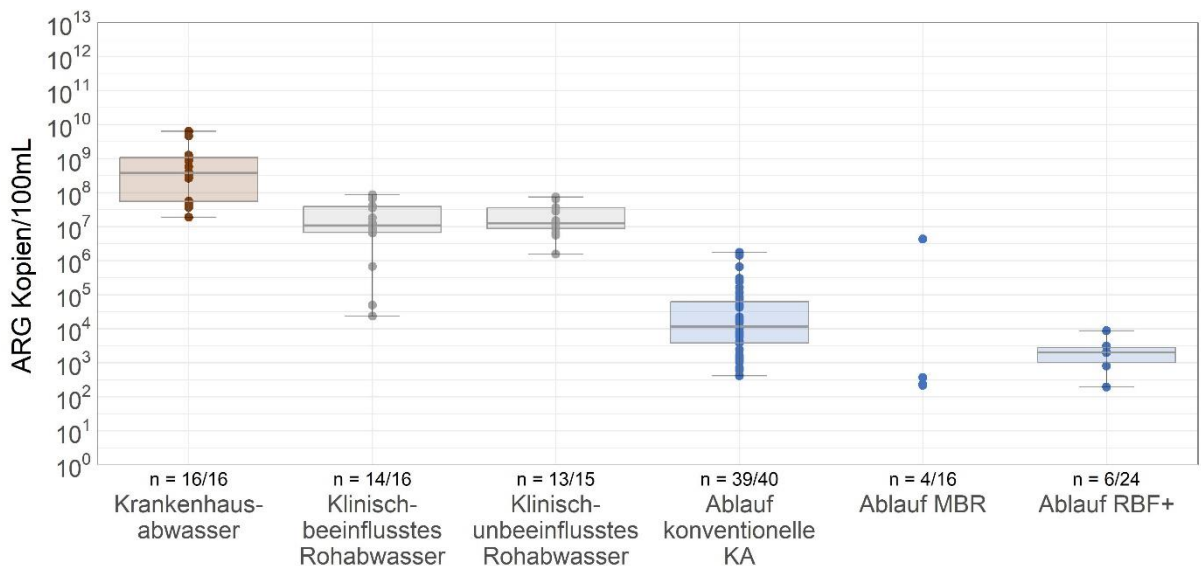


Abbildung 43: Nachweishäufigkeit und gemessene Konzentrationen des Resistenzgens *bla_{TEM}* in den nach Abwassermatrix gruppierten Probenahmestellen.

Bei beiden Genen (*ermB* und *bla_{TEM}*) liegt die Konzentration im Krankenhausabwasser im Median um 1-2 Log-Stufen höher als im Kläranlagenzulauf. In der konventionellen Abwasseraufbereitung können beide Gene um ca. 3 Log-Stufen reduziert werden. Bei den untersuchten Beispielen der weitergehenden Abwasserbehandlung lag die Reduktion für das ARG *ermB* bei 4 (RBF+) bis 5 Log-Stufen (MBR). Für das ARG *bla_{TEM}* konnte meistens eine vollständige Reduktion bis unterhalb der LOD mittels MBR erzielt werden. Bei der Behandlung

über den RBF+ konnte die mediane Konzentration gegenüber klinisch unbeeinflusstem Rohabwasser um 4 Log-Stufen reduziert werden.

Neben einer weitergehenden Abwasserbehandlung an kommunalen Kläranlagen mit konventioneller (mechanisch-biologischer) Klärtechnik untersuchten Paulus et al. (2019) die Auswirkung und Effizienz verschiedener dezentraler Vor-Ort-Behandlungen (Kombination von MBR, Ozonung, GAK-Filtration und UV-Bestrahlung) am Krankenhaus bezüglich des Rückhaltes von Antibiotika und ARG. Die Autoren stellen mit Blick auf die starke Belastung von Klinikabwässern die hohe Wirksamkeit einer dezentralen Behandlung von Krankenhausabwasser bei der Reduktion Antibiotika und ARG fest. Eine dezentrale Reduktion dieser Wasserinhaltsstoffe kann zudem horizontalem Gentransfer (HGT) von ARG in der Kanalisation vorbeugen, da Selektionsdruck vermindert wird (Paulus et al., 2019). Dies ist insbesondere für Last-Resort-Antibiotika, die häufig in Krankenhäusern der Maximalversorgung verwendet werden, wichtig (siehe die teilweise extrem hohen Konzentrationen beispielsweise von Piperacillin, die im ARA-Projekt für Klinikabwasser festgestellt wurden). Dazu müssen gesetzliche Vorgaben und Anforderungen formuliert werden, um Anreize zu schaffen und die praktische Umsetzung der dezentralen Abwasserbehandlung zu erhöhen (Paulus et al., 2019). Die im ARB Projekt des LANUV (Dericks et al., 2023) untersuchten dezentralen Behandlungsanlagen am Marienhospital Gelsenkirchen⁶ sowie am Waldkrankenhaus Waldbröl (Mauer, 2011) zeigen, dass auch aufwendigere Maßnahmen zur gesonderten Aufbereitung von Krankenhausabwasser mit Erfolg realisierbar sind.

Um sich den weiter offenen Fragen zu stellen werden am Institut für Hygiene & Public Health seit September 2019 in dem Interreg Projekt SPOWAR⁷ zusammen mit mehreren Partnern aus Deutschland und den Niederlanden neue Technologien für die effiziente und ressourcenschonende Behandlung von Abwasser ohne Einsatz von Verbrauchskemikalien (z.B. Bioziden) untersucht. Diese basieren auf sono/aktinisch aktivierbaren Bi-Super-Katalysatoren. Als möglicher Anwendungsbereich wird in dem Projekt die dezentrale Behandlung von Abwasser aus Hochrisiko-Einrichtungen (Medizinische Einrichtungen) sowie anderen kritischen Bereichen genannt.

Wichtig bei dieser Diskussion ist aber auch, dass die im Abwasser nachgewiesenen Antibiotika-resistenten Bakterien nicht ausschließlich auf Krankenhausquellen zurückzuführen sind (u.a. Schmiege et al., 2021). In dem Projekt HyReKA konnte gezeigt werden, dass Maximalversorger, gemessen an der Gesamtmenge des Abwassers, keine Hauptquelle für Antibiotika-resistente Bakterien sind (siehe auch Kapitel 4.5), aber den höheren Anteil an multiresistenten Erreger beinhaltet (Voigt et al., 2020). Für die Daten aus dem ARA-Projekt werden die Anteile der multiresistenten Erreger in den untersuchten Abwässern im nachfolgenden Kapitel dargestellt.

⁶ <https://klaerwerk.info/nuetzliches/allgemeine-meldungen-und-berichte/emschergenossenschaft-pills-klaeranlage-geht-in-gelsenkirchen-an-den-start/>

⁷ <https://deutschland-niederland.eu/projects/spowar/>

Klinikabwasser – Kernaussagen

Antibiotika-resistente Bakterien und Antibiotika sind ubiquitär in kommunalem Abwasser zu finden (Siehe Kernaussage 1, Kapitel 5).

Die Erkenntnisse bezüglich des Emissionsgeschehens sollten anhand weiterer Klinikstandorte und Kanaleinzugsgebiete abgesichert werden. Für die Aufklärung etwaiger zeitlicher Trends im Aufkommen von Antibiotikaresistenzen im Abwasser bedarf es systematischer Langzeituntersuchungen (Siehe Kernaussage 3, Kapitel 5).

Die konventionelle (d.h. mechanisch-biologische) Abwasserbehandlung erreicht bereits eine weitgehende Reduktion von Antibiotika-resistenten Bakterien im Abwasser, für einen vollständigen Rückhalt bedarf es allerdings einer weitergehenden Abwasserbehandlung (Siehe Kernaussage 4, Kapitel 5).

Die Frage nach einer dezentralen oder zentralen Lösung ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht pauschal zu beantworten und erfordert passgenaue Einzelfallentscheidungen (Siehe Kernaussage 7, Kapitel 5).

4.2 Multiresistente Bakterien in klinisch beeinflusstem und nicht klinisch beeinflusstem Abwasser

Krapner et al. (2021) fanden in Laborversuchen Hinweise darauf, dass Krankenhausabwasser auf Resistenzeigenschaften selektiert. Die Freisetzung von unbehandeltem Krankenhausabwasser, z.B. durch Mischwasserabschläge, hat also das Potential, die Prävalenz von Antibiotika-resistenten Bakterien und Resistenzgenen in Gewässern zu erhöhen. Im HyReKA-Projekt konnte gezeigt werden, dass Antibiotika-resistente Bakterien im Krankenhausabwasser eines Maximalversorgers, in der dazugehörigen Kläranlage und bis in die Einleitung in den Vorfluter nachweisbar waren (Kehl et al., 2021; Voigt et al., 2020; Zacharias, 2021). Die ARA-Messergebnisse im Ablauf des GWK Euskirchen-Kessenich und der KA Grevenbroich bestätigen diese Erkenntnis (Abbildung 13 und Abbildung 14). Das Risikopotenzial von Krankenhausabwasser wird zusätzlich durch die Tatsache erhöht, dass Krankenhäuser häufiger Last-Resort-Antibiotika (z. B. Piperacillin und Vancomycin) verwenden und daher ihre Resistenz-Profile im Vergleich zu anderen Abwässern anders sein können (Kümmerer and Henninger, 2003).

Aufbauend auf der Erkenntnis aus HyReKA, dass der untersuchte Maximalversorger ein Emittent von hochresistenten Bakterienisolaten ist (ein „Superspreader“; Zacharias, 2021), wurden zwei Krankenhäuser der Grund- bzw. Regelversorgung untersucht, um zu bewerten, ob dies auch für die in Deutschland am häufigsten vorkommende Krankenhausgröße gilt und eventuelle Maßnahmen abgeleitet werden können. Analog zu den Auswertungen von Zacharias (2021) wurde für jede Probenahmestelle der Anteil multiresistenter Isolate im Vergleich zu allen ESBL-Isolaten an der Probenahmestelle berechnet.

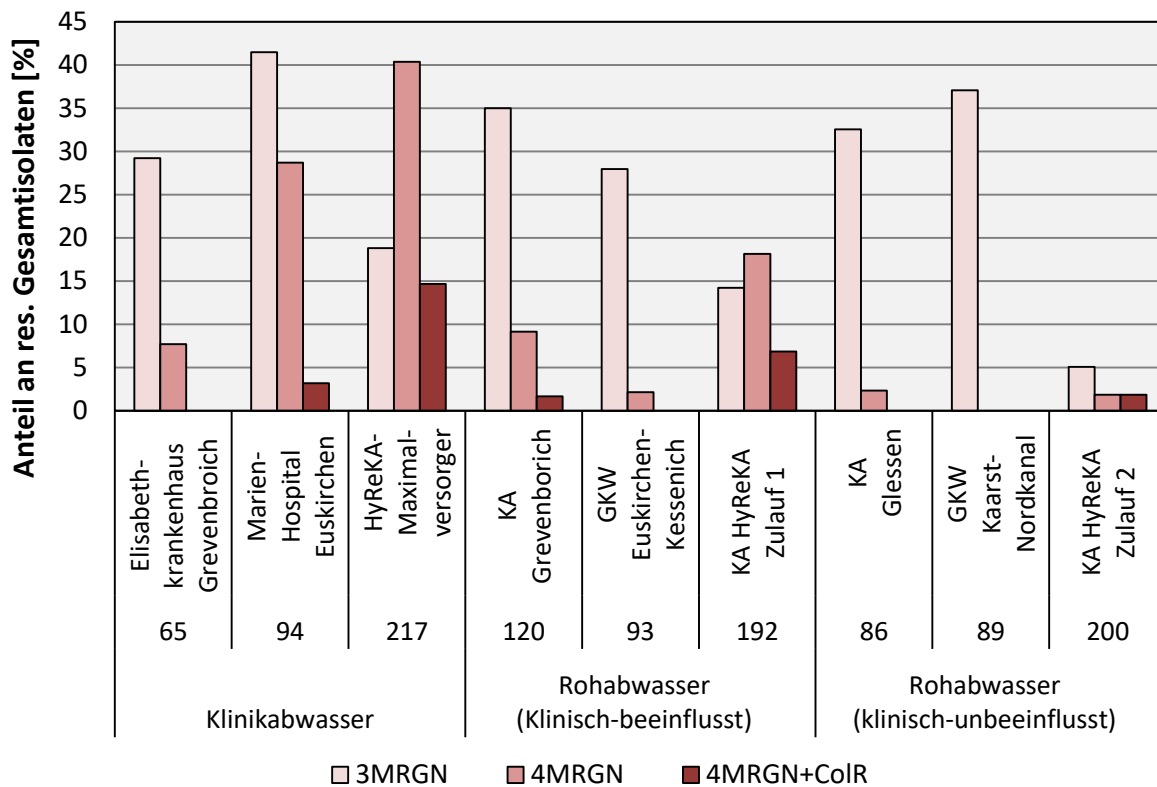


Abbildung 44: Anteile von multiresistenten Isolat an den resistenten Gesamtisolaten der Rohabwasserproben des ARA Projektes im Vergleich zu den Proben des urbanen Fallbeispiels im Projekt HyReKA.

In HyReKA wiesen insgesamt 28,4 % der Isolate aus dem klinisch-urbanen Untersuchungsgebiet einen 4MRGN-Status auf und weitere 13,2 % einen 3MRGN-Status auf (Zacharias, 2021). Im klinisch unbeeinflussten Abwasser aus dem ländlich-kommunalen Untersuchungsgebiet des HyReKA-Projektes konnten hingegen insgesamt nur 7,4 % der Isolate aus der Abwassermatrix einer der beiden Resistenzgruppen zugewiesen werden (6,7 % 3MRGN und 0,7 % 4MRGN).

Abbildung 44 zeigt die Anteile der multiresistenten Isolate an den resistenten Gesamtisolaten für die Rohabwasserstellen des ARA-Projektes und die relevanten Rohabwasser-Probenahmestellen aus dem HyReKA-Projekt. Im Rohabwasser der Krankenhäuser der Grund- bzw. Regelversorgung wiesen 41,5 % (Marien-Hospital Euskirchen) bzw. 29,2 % (Elisabethkrankenhaus Grevenbroich) der Isolate einen 3MRGN-Status auf und 7,7 % bzw. 3,2 % einen 4MRGN-Status auf. Multiresistente Bakterien (v.a. 3MRGN-Isolate) sind ubiquitär in (kommunalem) Abwasser nachzuweisen. Krankenhäuser der Regel- (Marien-Hospital Euskirchen) und Maximalversorgung emittieren ähnliche Gesamtanteile multiresistenter Bakterien (3MRGN und 4MRGN) in das kommunale Abwassernetz, wobei im Abwasser des Maximalversorgers mehrheitlich die besonders kritischen 4MRGN-Isolate nachgewiesen wurden. 3,2 % der 4MRGN Isolate aus dem Marien-Hospital Euskirchen zeigten eine zusätzliche Resistenz gegen das Reserveantibiotikum Colistin (CoIR). In den Zuläufen der aufnehmenden Kläranlagen wiesen 30,1 % (Zulauf GKW Kessenich) bzw. 45,8 % (Zulauf KA Grevenbroich) der Isolate einen Multiresistenzstatus auf (3MRGN oder 4MRGN, siehe Abbildung 44). Damit zeigt sich, dass auch Krankenhäuser der Grund- und Regelversorgung einen hohen Anteil an multiresistenten Erregern in das Abwassernetz abgeben und dass diese Erreger auch an den kommunalen Kläranlagen ankommen. Bei den Untersuchungen am

Elisabethkrankenhauses in Grevenbroich konnte nicht der gesamte Klinikabwasserstrom erfasst werden (Abschnitt 2.1.1), was die dort detektierten geringeren Anteile an 3- und 4MRGN Bakterien erklären kann.

In kommunalem Abwasser ohne Kliniken im Einzugsgebiet (Abbildung 44, klinisch unbeeinflusstes Rohabwasser) ließen sich weniger hochresistente Isolate (4MRGN und 4MRGN + CoIR) nachweisen. Im Zulauf des GWK Kaarst-Nordkanal und der KA Glessen wiesen 37,1 % bzw. 32,6 % der Isolate einen 3MRGN-Status auf. Nur 2,3 % der Isolate im Zulauf der KA Glessen wiesen einen 4MRGN-Status auf, im Zulauf des GWK Kaarst-Nordkanal konnten keine 4MRGN-Isolate gefunden werden. Die Ergebnisse an den KA-Abläufen sind aufgrund der kaum noch vorhandenen Grundbelastung nur von geringer Aussagekraft bzw. Relevanz, denn im Ablauf der KA Glessen und des GWK Kaarst-Nordkanal wurden keine bzw. lediglich 14 Isolate (davon zwei Isolate mit 3MRGN Status) gewonnen.

Das Abwasser-Einzugsgebiet der KA Rheinbach weist ebenfalls keine Krankenhäuser auf. Im Ablauf der Kläranlage (Zulauf des RBF+ im Regelbetrieb) konnten insgesamt 133 ESBL-Isolate untersucht werden. 35,3 % der Isolate wiesen einen 3MRGN-Status auf. Im Fall einer Mischwasserbeschickung konnten im Zulauf zum RBF+ 11 Isolate (16,5 %) mit einem 3MRGN-Status identifiziert werden. Das Niederschlagswasser verdünnt das Schmutzwasser, wodurch die Konzentrationen multiresistenter Erreger niedriger sind als im kommunalen Abwasser.

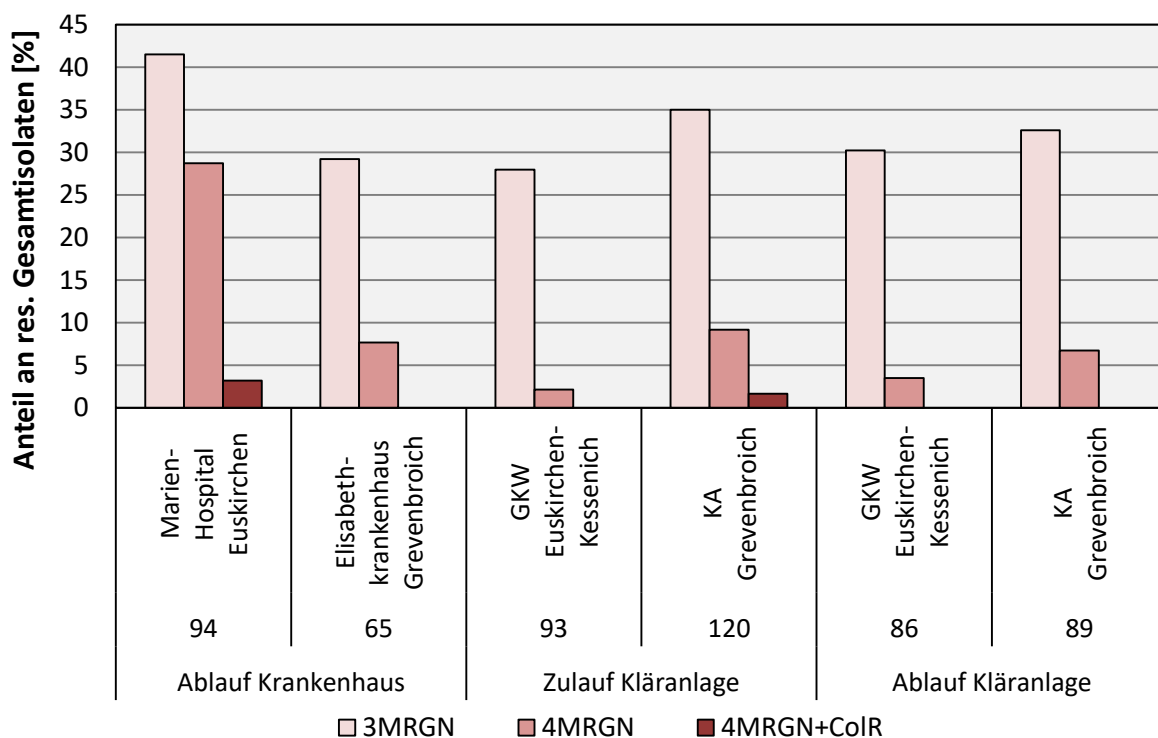


Abbildung 45: Anteile von multiresistenten Isolaten an den resistenten Gesamtisolaten des Monitoring Programmes Klinikabwasser.

Im Regelbetrieb konnte nur einmal ein Isolat im Ablauf des Segmentes 2 gefunden werden. Dieses Isolat konnte einem 3MRGN-Status zugeordnet werden. Im Mischwasserbetrieb gab es mehr positive Nachweise auf dem ESBL CHROM-Agar und hier konnten im Mittel über alle drei Segmente 32,6 % der Isolate mit einem 3MRGN-Status identifiziert werden. Ein einzelnes Isolat im Ablauf des Segmentes 3 wurde im Mischwasserbetrieb als 4MRGN-Isolat identifiziert.

Von 1.143 Einzelisolaten, die in ARA (2020-2023) generiert wurden, wiesen 5,7 % eine phänotypische Resistenz gegen das Antibiotikum Colistin auf, in HyReKA (2016-2019) waren es bei der Verwendung der gleichen Methode nur 2,7 % der Isolate. Ob diese Abweichung einen zeitlichen Trend und damit eine wachsende Verbreitung von Resistenzen gegen Colistin widerspiegelt oder auf andere Faktoren im Zusammenhang mit den beiden Messprogrammen zurückzuführen ist müssen weitere Untersuchungen klären. Es bestätigen sich die Erkenntnisse aus HyReKA und die des LANUV ARB-Projekts, dass insbesondere multiresistente Isolate mit dem kritischen 4MRGN-Status vornehmlich aus Krankenhäusern in das Abwasser gelangen. Allerdings ist anders als erwartet kein relevanter Unterschied in Bezug auf den Anteil multiresistenter Bakterien zwischen Abwasser aus Krankenhäusern der Regelversorgung und dem in HyReKA untersuchten Maximalversorger ermittelt worden.

Um darzustellen, dass die Kläranlagen multiresistenten Bakterien keinen Selektionsvorteil verschaffen, zeigt Abbildung 45 die Anteile der multiresistenten Bakterien an den resistenten Gesamtisolaten für die beiden im ARA Projekt untersuchten Krankenhäuser und der aufnehmendem Kläranlagen. Dabei wird deutlich, dass sich die Anteile der multiresistenten Bakterien durch die konventionelle Klärung des Abwassers (Vergleich Zu- und Ablauf der Kläranlagen) nicht wesentlich erhöht. Im Ablauf der Kläranlagen waren 33,7 % bzw. 39,3 % der Isolate multiresistent. Die kommunalen Kläranlagen sind in der Lage, die Konzentration der Erreger zu reduzieren (Kapitel 3.3.3), der Anteil an multiresistenten Erregern an der Gesamtpopulation verändert sich aber nicht.

Eine immer noch im wissenschaftlichen Diskurs gestellte Frage ist, ob die Abundanz von resistenten und multiresistenten Bakterien im Abwasser und in der Umwelt stagniert oder es einen steigenden Trend gibt. In HyReKA wurde der Zulauf und auch der Ablauf der KA Rheinbach untersucht. Im Untersuchungszeitraum 2016-2019 konnten im Ablauf der KA Rheinbach (Regelbetrieb) bei 8,3 % der Isolate (n=189) ein 3MRGN-Status festgestellt werden, 0,5 % der Isolate wiesen in dem Untersuchungszeitraum auch einen 4MRGN-Status auf. Im Zulauf der KA Rheinbach (hier nicht untersucht) konnten im Untersuchungszeitraum 2016-2019 7,4 % der 209 Isolate einem 3MRGN-Status zugeordnet werden und weitere 2,3 % einem 4MRGN-Status. Mit einem Anteil von 35 % multiresistenter Isolate im Ablauf der KA Rheinbach liegt der Anteil im ARA-Projekt deutlich höher als im HyReKA-Projekt. Die Zu- und Abläufe der kommunalen, klinisch nicht beeinflussten Kläranlagen in HyReKA wiesen im Mittel einen Anteil von 7,3 % 3MRGN- und 0,6 % 4MRGN-Isolaten im Zulauf der Kläranlagen und 5,8 % bzw. 0,1 % im Ablauf der Kläranlagen auf. In ARA lag bei den Zuläufen der kommunalen, klinisch nicht beeinflussten Kläranlagen (GKW Kaarst-Nordkanal und KA Glessen) der Anteil an 3MRGN-Isolaten im Mittel bei 34,0 % und der Anteil an 4MRGN-Isolaten bei 1,2 %. Auch hier müsste durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden, ob die im ARA-Projekt höhere Belastung kommunaler Abwässer mit multiresistenten Krankheitserregern einen zeitlichen Trend widerspiegelt oder auf andere Faktoren zurückgeführt werden kann.

Ein Anstieg der Resistenzen bei gleichzeitiger Stagnation der Einführung neuer Antibiotika in der Medizin ist vor allem bei Infektionen mit Gram-negativen Bakterien kritisch (Walsh, 2010). Die WHO bezeichnete Antibiotika-resistente Bakterien als eine ernsthafte Bedrohung für die moderne Medizin (WHO, 2014). Antibiotika-Resistenzen sind von großer wissenschaftlicher, medizinischer und gesellschaftlicher Bedeutung. Aufgrund der Todesfälle, die durch Infektion mit Antibiotika-resistenten Bakterien verursacht werden, ergibt sich eine neue globale Public-Health-Krise. O'Neill (2016) beschreibt, dass die Anzahl der Todesfälle durch Infektionen mit Antibiotika-resistenten Bakterien bis 2050 die Zahl der Todesfälle vieler anderer geläufiger Krankheiten übertreffen könnte. Der unsachgemäße und übermäßige Einsatz von Antibiotika

in der Human- und Veterinärmedizin sowie in der Landwirtschaft wurde als einer der Haupttreiber für die beschleunigte Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen identifiziert (Davies and Davies, 2010). Ein Fortschreiten der Verbreitung multiresistenter Erregern über die Zeit ist laut den Autoren besorgniserregend und sollte durch weitere Forschung abgeklärt werden.

Multiresistenzen – Kernaussagen

Klinisch relevante, multiresistente Bakterien sowie kritische Last-Resort-Antibiotika werden in besonderem Maße über Krankenhausabwasser verbreitet (Siehe Kernaussage 1, Kapitel 5).

Im Abwasser der Grund- und Regelversorger (ARA) finden sich mehrheitlich 3MRGN-Isolate. Im Abwasser des Maximalversorgers (HyReKA) werden mehrheitlich die besonders kritischen 4MRGN-Isolate nachgewiesen (Siehe Kernaussage 2, Kapitel 5).

Die Erkenntnisse bezüglich des Emissionsgeschehens sollten anhand weiterer Klinikstandorte und Kanaleinzugsgebiete abgesichert werden. Für die Aufklärung etwaiger zeitlicher Trends im Aufkommen von Antibiotikaresistenzen im Abwasser bedarf es systematischer Langzeituntersuchungen (Siehe Kernaussage 3, Kapitel 5).

4.3 Reduktionsleistungen der Behandlungsverfahren

4.3.1 Reduktionsleistungen der Behandlungsverfahren

Im Folgenden werden die Reduktionsleistungen der verschiedenen Behandlungsverfahren auf den beprobten Kläranlagen (konventionelle Kläranlagen, konventionelle Kläranlagen mit MBR; konventionelle Kläranlage mit RBF+) bewertet und miteinander verglichen. Die Reduktionsleistungen werden beispielhaft für die mikrobiologischen Parameter *E. coli*, ESBL-produzierende *E. coli*, intestinale Enterokokken und VRE sowie den chemischen Parameter Sulfamethoxazol ausgewertet. Zu diesem Zweck werden die im ARA-Projekt erhobenen Messdaten mit den Messdaten aus dem HyReKA-Projekt kombiniert, so dass die Auswertung zusätzlich Messwerte von Zu- und Ablauf der konventionellen Kläranlagen in Rheinbach, Flerzheim, Miel und Heimerzheim sowie der MBR-Anlage GWK Kaarst-Nordkanal umfasst. Die HyReKA-Messdaten stammen aus den Jahren 2016 bis 2018. Es ist zu beachten, dass dies insbesondere eine Ergänzung der Messdaten vom RBF Rheinbach um Messwerte vom Zulauf der vorgeschalteten KA Rheinbach beinhaltet, so dass die Reduktionsleistung des gesamten Klärprozesses vom KA-Zulauf bis zum RBF-Ablauf abgeschätzt wird. Die Reduktionsleistung kann so direkt mit den Reduktionsleistungen auf den übrigen Anlagen verglichen werden. Zu beachten ist im weiteren Verlauf außerdem, dass insbesondere für die mikrobiologischen Parameter eine große Übereinstimmung über alle betrachteten Kläranlagen bezüglich der Zulaufbelastung sowie den verfahrensspezifischen Reduktionsleistungen herrscht, so dass trotz der teils nur relativ geringen Probenzahl je Probenahmestelle von einer guten Repräsentativität und Verallgemeinerbarkeit der nachfolgend diskutierten Ergebnisse ausgegangen werden kann.

Abbildung 46 bis Abbildung 49 stellen die quantifizierbaren Zu- und Ablaufkonzentrationen in jeder Kläranlage für die mikrobiologischen Parameter als Boxplots dar. Für Rheinbach werden die Konzentrationen für den KA Zulauf den KA-Ablauf (entspricht dem RBF-Zulauf) und den RBF-Ablauf dargestellt. Letzterer fasst die Daten für alle drei RBF-Segmente zusammen, da die unterschiedlichen Anteile an Aktivkohle im Filterkörper den Bakterienrückhalt nach den Messdaten nicht signifikant beeinflussen. Die roten Pfeile zeigen die Reduktion der Mediankonzentrationen zwischen Zu- und Abläufen der verschiedenen Anlagen an. Für alle vier mikrobiologischen Parameter zeigt sich, dass in der konventionellen Abwasserreinigung eine Reduktion der Mediankonzentrationen um ca. 2-3 Log-Stufen erzielt wird (entspricht einem Rückhalt von bis zu 99,9 % der Belastung im Zulauf). Für die Kläranlagen mit Membranbelebungen, das GWK Nordkanal und die KA Glessen, ergibt sich für alle Parameter eine Reduktion der Mediankonzentrationen um ca. 5 Log-Stufen zwischen Zu- und Ablauf, was für die Resistenzindikatoren ESBL-*E.coli* und VRE praktisch einer Totalelimination gleichkommt. Interessanterweise erzielt der RBF+ in Rheinbach als naturnahes Verfahren eine vergleichbare Reinigungsleistung: Über die gesamte Verfahrenskette vom Zulauf der vorgeschalteten KA Rheinbach bis zum Ablauf des RBF werden die Mediankonzentrationen aller vier Parameter um ca. 5 Log-Stufen reduziert, ebenfalls gleichbedeutend mit einer Totalelimination der resistenten Bakterien. Für alle Verfahren gilt: Die Verringerung der Mediankonzentrationen fällt für die Indikatorbakterien und die jeweilige resistente Variante vergleichbar aus, d.h. es ergibt sich im Median weder eine Anreicherung noch eine Abreicherung der resistenten Bakterien in der Gesamtpopulation.

Für den Vergleich der Reinigungsleistung hinsichtlich chemischer Parameter wurde das Antibiotikum Sulfamethoxazol ausgewählt, da es über alle beprobten Anlagen die höchsten Befundanteile aller Antibiotika aufweist. Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten 3.3.1 und 3.4.1 dargelegt, kann Sulfamethoxazol in der konventionellen dreistufigen Abwasserbehandlung als relativ persistent betrachtet werden, mit meist nur geringen Abnahmen sowohl der Anzahl der Positivbefunde als auch der Mediankonzentration zwischen den untersuchten Zu- und Abläufen. Abbildung 50 zeigt als Balkendiagramm die mittleren und maximalen Sulfamethoxazol-Konzentrationen in den Zu- und Abläufen aller in HyReKA und ARA untersuchten Kläranlagen. Die Ablaufkonzentrationen in Glessen und Rheinbach beziehen sich dabei jeweils auf den KA-Ablauf, so dass Abbildung 50 den Effekt der GAK-Filtration in Glessen bzw. des RBF+ in Rheinbach unberücksichtigt lässt.

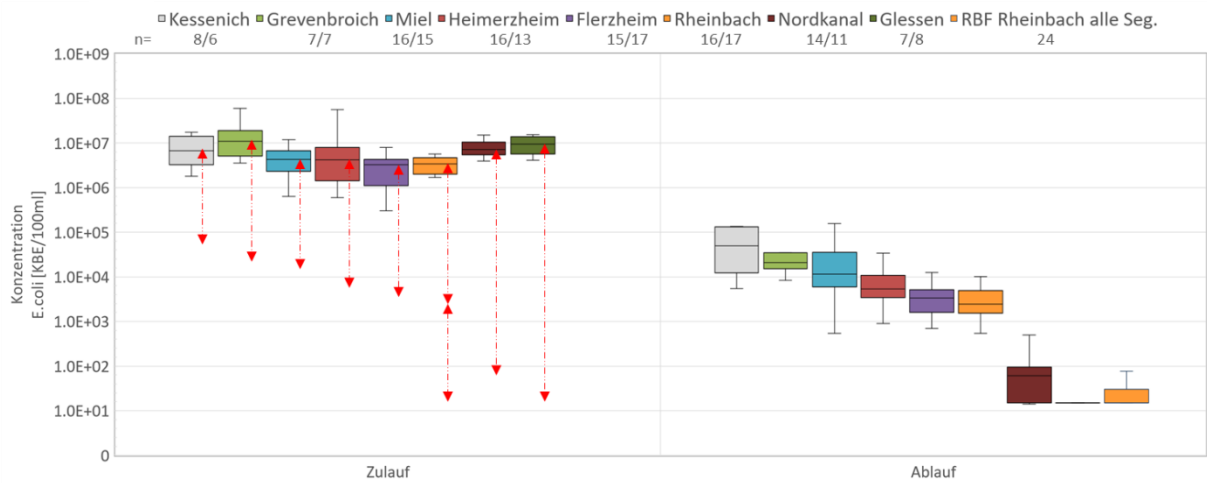


Abbildung 46: Quantifizierbare Konzentrationen koloniebildender Einheiten (KBE) von *E. coli* in den Zu- bzw. Abläufen der untersuchten Kläranlagen.

Das GWK Nordkanal und die KA Glessen sind mit einer Membranbelebung ausgestattet. Die Grafik ist Seiger (2023) entnommen.

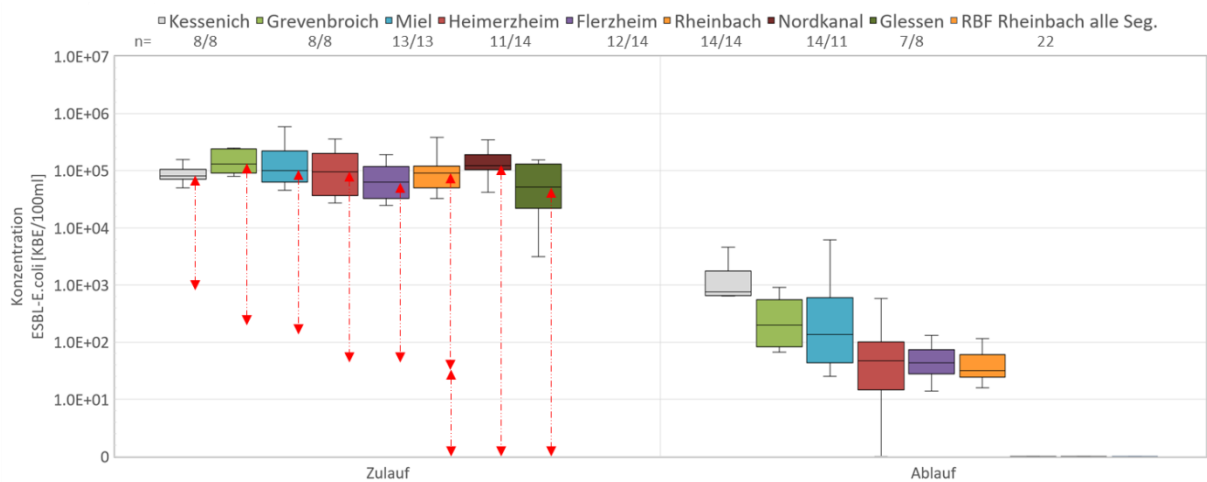


Abbildung 47: Quantifizierbare Konzentrationen koloniebildender Einheiten (KBE) von ESBL-produzierendem *E. coli* in den Zu- bzw. Abläufen der untersuchten Kläranlagen.

Das GWK Nordkanal und die KA Glessen sind mit einer Membranbelebung ausgestattet. Die Grafik ist Seiger (2023) entnommen.

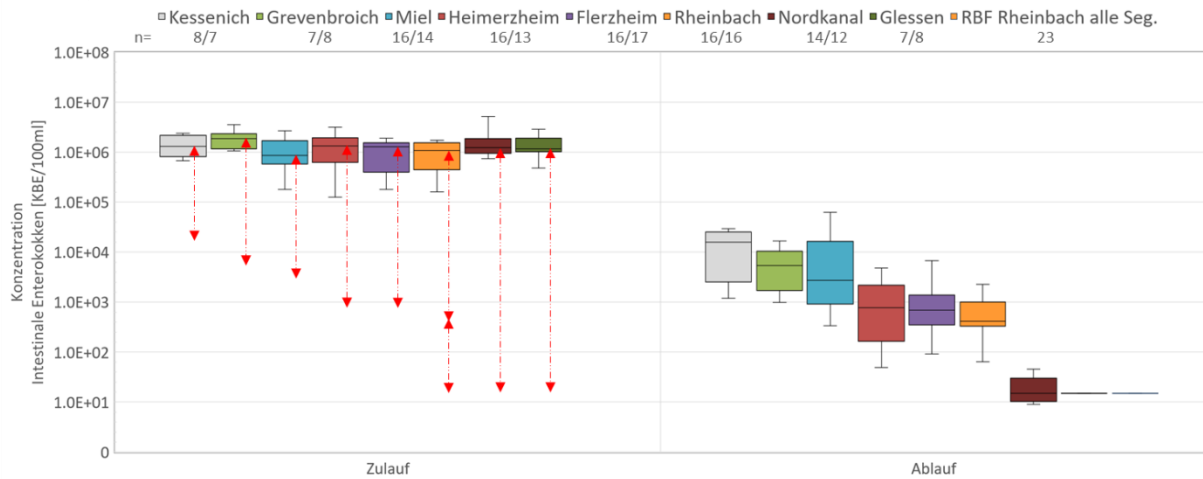


Abbildung 48: Quantifizierbare Konzentrationen koloniebildender Einheiten (KBE) von intestinaler Enterokokken in den Zu- bzw. Abläufen der untersuchten Kläranlagen.

Das GWK Nordkanal und die KA Glessen sind mit einer Membranbelebung ausgestattet. Die Grafik ist Seiger (2023) entnommen.

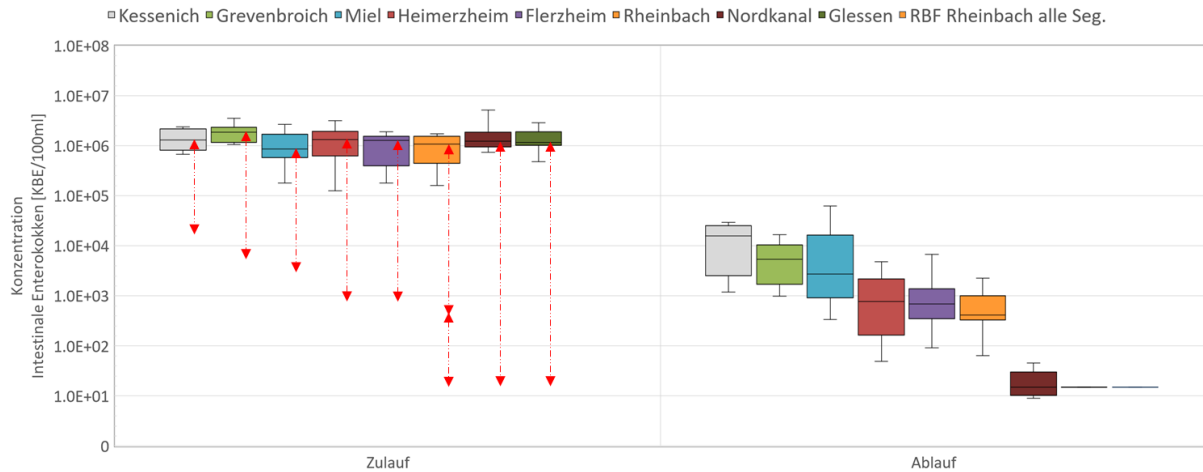


Abbildung 49: Quantifizierbare Konzentrationen koloniebildender Einheiten (KBE) von VRE in den Zu- bzw. Abläufen der untersuchten Kläranlagen.

Das GWK Nordkanal und die KA Glessen sind mit einer Membranbelebung ausgestattet. Die Grafik ist Seiger (2023) entnommen.

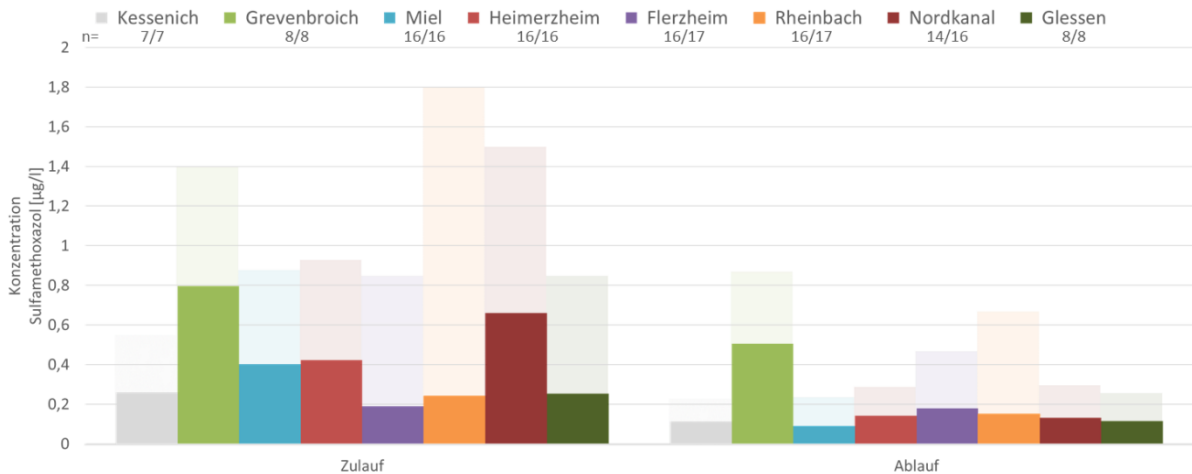


Abbildung 50: Mittlere und maximale Konzentrationen von Sulfamethoxazol in den Zu- bzw. Abläufen der untersuchten Kläranlagen.

Die Maximalwerte sind blass im Hintergrund dargestellt. Für die Bestimmung und Mittel- und Maximalwerte wurden Messwerte unterhalb der Berichtsgrenze wurden der Berichtsgrenze gesetzt (*worst-case-Annahme*). Die Grafik ist Seiger (2023) entnommen.

Die Mittel- und Maximalkonzentrationen an den Zu- und Abläufen sind sehr heterogen. Auffallend ist insbesondere die hohe Durchschnittskonzentration an den Zuläufen der Kläranlagen in Grevenbroich und Nordkanal, die sich vor allem in Grevenbroich auch bis zum KA-Ablauf auswirkt: Die Durchschnittskonzentration von Sulfamethoxazol ist am Ablauf der KA Grevenbroich immer noch größer als an den meisten KA-Zuläufen (die hohen Messwerte am Ablauf der KA Grevenbroich wurden bereits in Abschnitt 3.3.1 erwähnt). Insgesamt schwanken die Reduktionsraten für die mittleren Sulfamethoxazol-Konzentrationen zwischen 6 % für das GWK Flerzheim (mit einer allerdings auch nur relativ geringen Ausgangsbelastung am Zulauf) und 80 % für das GWK Kaarst-Nordkanal. Die Reduktionsraten bezüglich der gemessenen Maximalwerte fallen insgesamt größer aus. Sie schwanken zwischen 38 % für die KA Grevenbroich und 80 % am GWK Kaarst-Nordkanal. Wie bereits in Abschnitt 3.4.1 erörtert, spielt für den relativ guten Sulfamethoxazol-Rückhalt im GWK Kaarst-Nordkanal vermutlich die simultan zum ARA-Monitoring erfolgte PAK-Dosierung in die Belebung der Anlage eine wichtige Rolle (siehe Forschungsprojekt „MBR-AKTIV“). Die Membranfiltration selbst sollte keinen Einfluss auf im Wasserstrom gelöste Spurenstoffe wie Sulfamethoxazol haben. Die Reduktionsleistung auf der zweiten Kläranlage mit MBR – der KA Glessen – sticht dementsprechend auch nicht auffällig unter allen anderen Kläranlagen hervor (sie ist mit rund 60 % bezogen auf die Durchschnittskonzentrationen in etwa vergleichbar mit der Reduktionsleistung des GWK Euskirchen-Kessenich oder der KA Heimerzheim).

Der Effekt der PAK auf den Antibiotika-Rückhalt im GWK Kaarst-Nordkanal konnte im Projekt ARA aufgrund der Art der Probenahme nicht gezielt untersucht werden. Dies verhält sich anders mit der GAK in den Segmenten 2 und 3 des RBF+ in Rheinbach, sowie mit der GAK-Filter-Versuchsanlage auf der KA Glessen. Abbildung 51 zeigt die Maximal- und Mittelwertkonzentrationen des Parameters Sulfamethoxazol im Zulauf der KA Rheinbach, im Zulauf des RBF+ (entspricht dem Ablauf der KA) sowie im Ablauf der einzelnen RBF-Segmente. Es ist ersichtlich, dass alle Segmente die mittlere und maximale Konzentration von Sulfamethoxazol deutlich senken. Für eine verlässliche Reduktion der Konzentration unterhalb der Laborberichtsgrenze bedarf es allerdings der GAK in den Segmenten 2 und 3.

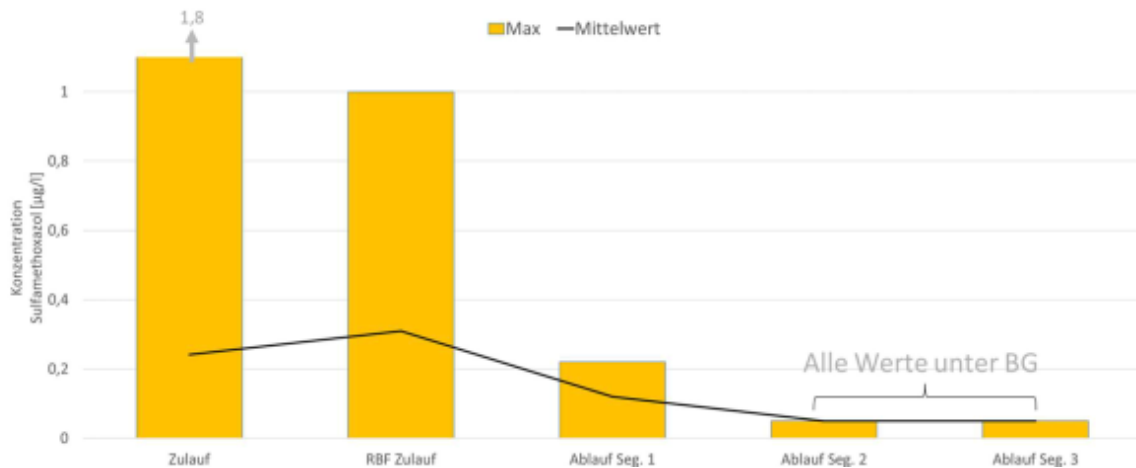


Abbildung 51: Mittlere und maximale Konzentrationen von Sulfamethoxazol in der KA Rheinbach und dem RBF+ (Routinebetrieb).

Messwerte unterhalb der Berichtsgrenze (BG) wurden für die Berechnung und Darstellung hier gleich der Berichtsgrenze gesetzt (im Sinne einer *worst-case*-Betrachtung für die Reduktionsleistung an den jeweiligen Abläufen). Die Grafik ist Seiger (2023) entnommen.

Ein ähnliches Bild zeigt sich in der Auswertung der Daten zur GAK-Filtration der KA Glessen. Abbildung 52 zeigt den zeitlichen Verlauf Sulfamethoxazol-Konzentrationen an den verschiedenen Probenahmestellen im ARA-Untersuchungszeitraum. Wie bereits in Abschnitt 3.4.1 erläutert, wurden für die Auswertung Messwerte am Ablauf der GAK-Filtration aus dem die Versuchsanlage begleitenden Forschungsprojekt hinzugezogen, so dass sich für die Probenahmestellen am Ablauf beider Filter eine dichtere Abfolge von Datenpunkten ergibt. Es wird ersichtlich, dass sich der Untersuchungszeitraum in zwei Phasen einteilt: Bis zum Sommer 2022 liegen die Sulfamethoxazol-Konzentrationen am Ablauf beider Filter systematisch oberhalb der Konzentration im Membranpermeat. Dies ist mit einem Durchbruch des Sulfamethoxazols in den Filtern zu erklären. Nach Austausch der Aktivkohle im Sommer wurden die Sulfamethoxazol-Konzentrationen am Ablauf beider Filter verlässlich auf Werte unterhalb der Laborberichtsgrenze reduziert. Unter der "*worst-case*"-Annahme, dass Messwerte unterhalb der Berichtsgrenze gleich der Berichtsgrenze sind, ergibt sich ab diesem Zeitpunkt eine Reinigungsleistung der GAK-Filtration von 97 % bezüglich der Sulfamethoxazol-Durchschnittskonzentration, was die Effektivität von Aktivkohle beim Rückhalt organischer Spurenstoffe (inklusive Antibiotika) im Abwasser nochmals bestätigt.

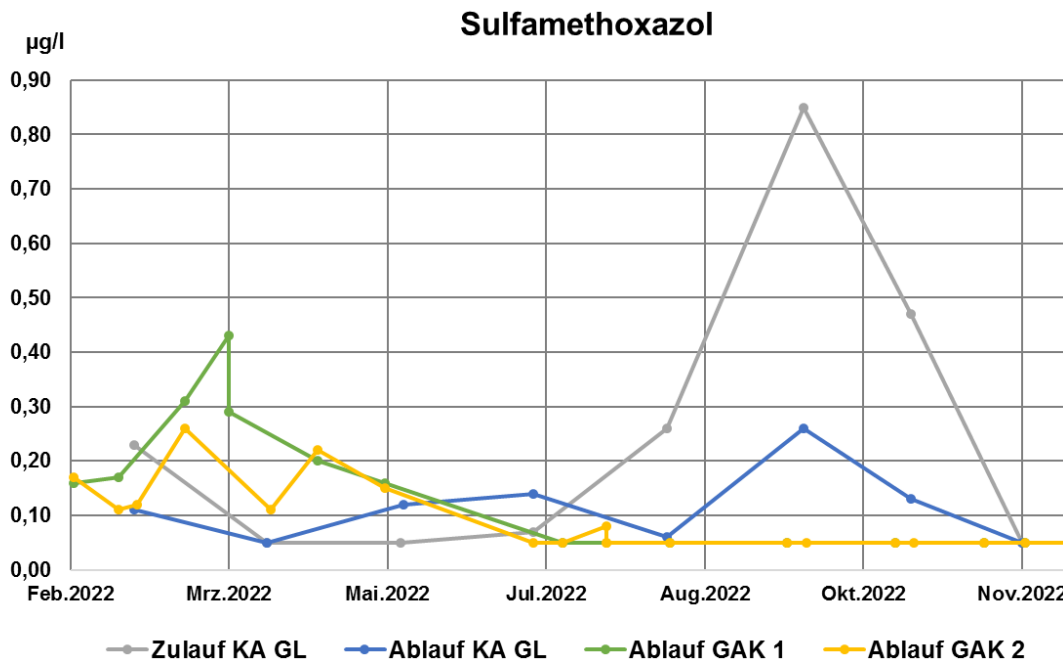


Abbildung 52: Zeitlicher Verlauf der gemessenen Sulfamethoxazol-Konzentrationen an den Probenahmestellen auf der KA Glessen (KA GL).

Messwerte unterhalb der Berichtsgrenze wurden gleich der Berichtsgrenze gesetzt (im Sinne einer *worst-case*-Betrachtung für die Reduktionsleistung an den jeweiligen Abläufen). Im Sommer 2022 erfolgte ein Austausch der GAK in beiden GAK-Filtereinheiten. Die Grafik ist Seiger (2023) entnommen.

4.3.2 Bewertung der Resistenzselektion der untersuchten Kläranlagen anhand der untersuchten Antibiotikaresistenzgene

Unter Berücksichtigung der ESBL-produzierenden *E. coli* und VRE kann gezeigt werden, dass diese in gleichem Maße über die Abwasseraufbereitung reduziert werden wie die entsprechenden Gesamtparameter (resistente und nicht-resistente *E. coli* bzw. intestinale Enterokokken). Auch internationale Studien stimmen im Allgemeinen darin überein, dass (konventionelle) Abwasserbehandlungsanlagen die Konzentration von Bakterien im Wasser reduzieren, jedoch keinen relevanten Rückgang im relativen Anteil resistenter Bakterien bewirken (Amador et al., 2015; Blaak et al., 2015; Korzeniewska et al., 2013).

Über die Berechnung des Anteiles der untersuchten Resistenzgene (*mcr-1*, *ermB*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{TEM}*) an der Gesamtbakterienpopulation (16S rRNA-Gen) kann eine Aussage getroffen werden, ob bestimmte Resistenzeigenschaften im Klärprozess positiv selektiert werden.

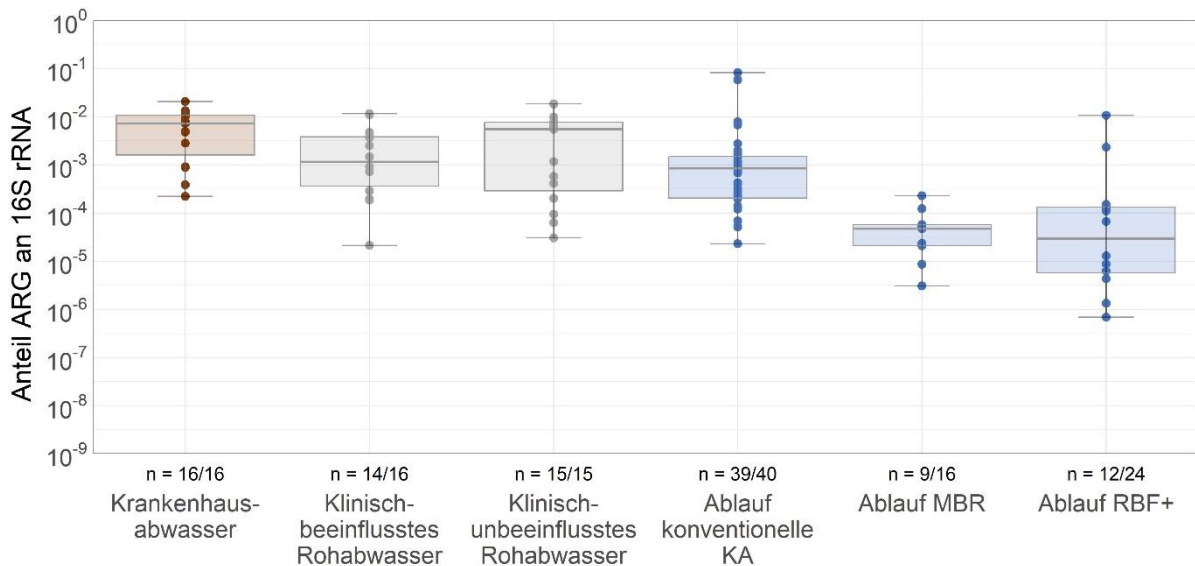


Abbildung 53: Anteile des Resistenzgens *ermB* an der in der Probe vorhandenen 16S rRNA.
Die Probenahmestellen wurden nach Matrix gruppiert.

Für die Resistenzgene, die häufig nachzuweisen waren (*ermB* und *bla_{TEM}*), zeigt sich, dass auch der Anteil an der Gesamtpopulation höher ist als bei den Resistenzgenen, die seltener nachgewiesen werden konnten (*mcr-1* und *bla_{NDM-1}*). Für die Abbildungen wurden die Probenahmestellen nach Matrix gruppiert. Die Ergebnisse zu dem Ablauf der Kliniken (Marien-Hospital Euskirchen und Elisabethkrankenhaus Grevenbroich) sind unter Krankenhausabwasser zusammengefasst. Die Zuläufe der Kläranlagen, die dieses Abwasser aufnehmen, sind als klinisch beeinflusstes Rohabwasser dargestellt, als klinisch unbeeinflusstes Rohabwasser sind die Zuläufe der Kläranlage Glessen und des GWK Kaarst-Nordkanal gemeinsam dargestellt. Die Probenahmestellen des aufbereiteten Abwassers sind in Ablauf konventionelle KA (Ablauf KA Grevenbroich, Ablauf GWK Euskirchen-Kessenich, Ablauf KA Rheinbach), Ablauf MBR (Ablauf KA Glessen, Ablauf GWK Kaarst-Nordkanal) und Ablauf RBF+ (alle drei Segmente) unterschieden. Abbildung 53 und Abbildung 54 zeigen die Anteile der Resistenzgene *ermB* und *bla_{TEM}* für die gruppierten Probenahmestellen. Dabei kann gezeigt werden, dass die Abwasseraufbereitung generell keinen höheren Anteil der Resistenzgene an der 16S rRNA zeigt. Im Ablauf nach MBR und RBF+ liegen die Mediane eine Log-Stufe niedriger für das *ermB* Gen. Die beiden Resistenzgene *ermB* und *bla_{TEM}* sind nicht nur häufiger nachgewiesen worden, sondern zeigen auch einen höheren Anteil an der bakteriellen Gesamtpopulation (gemessen am 16S rRNA-Gen) als die Resistenzgene *mcr-1* und *bla_{NDM-1}* (Abbildung 55 und Abbildung 56).

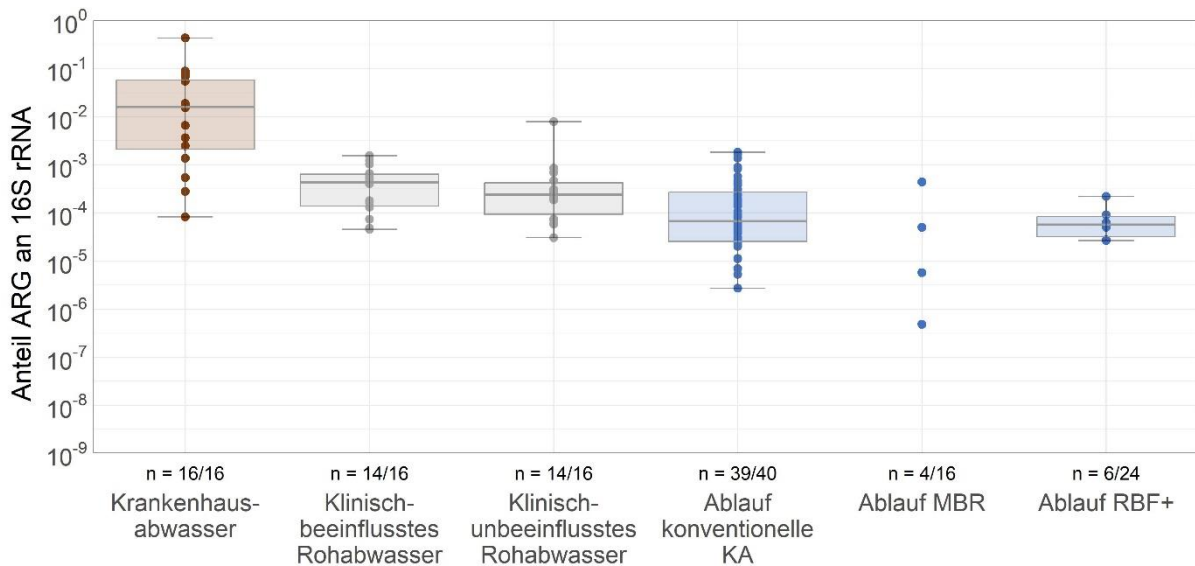


Abbildung 54: Anteile des Resistenzgens *bla_{TEM}* an der in der Probe vorhandenen 16S rRNA.
Die Probenahmestellen wurden nach Matrix gruppiert.

Bei den seltener in den unterschiedlichen Matrizes nachzuweisenden Resistenzgenen *mcr-1* und *bla_{NDM-1}* konnte auch ein deutlich geringerer Anteil an der bakteriellen Gesamtpopulation (gemessen an dem 16S rRNA-Gen) gezeigt werden.

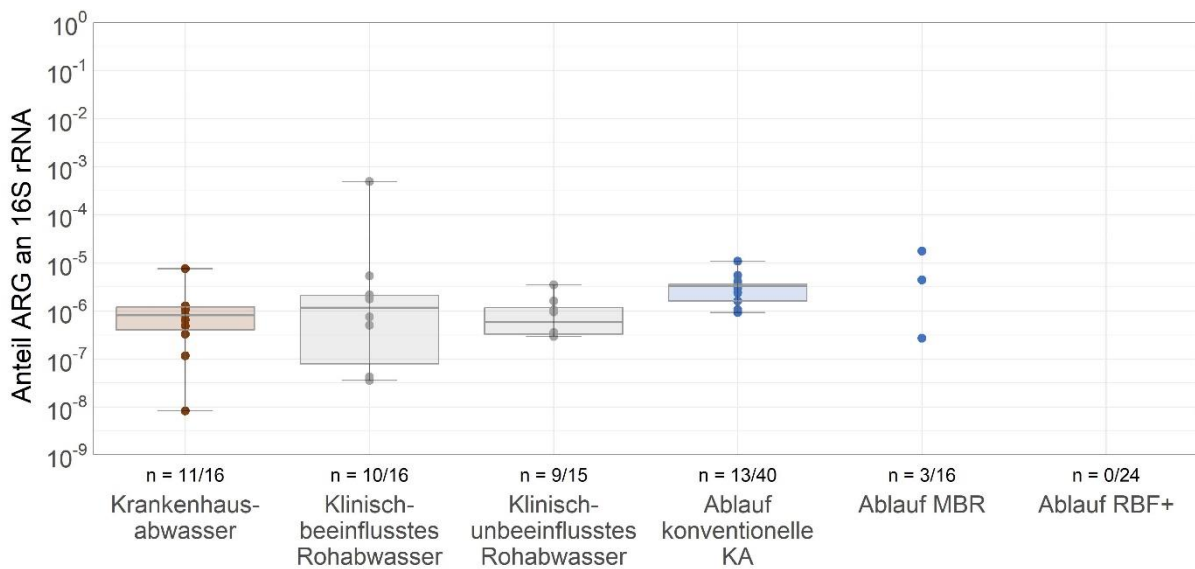


Abbildung 55: Anteile des Resistenzgens *mcr-1* an der in der Probe vorhandenen 16S rRNA-Genen.
Die Probenahmestellen wurden nach Matrix gruppiert.

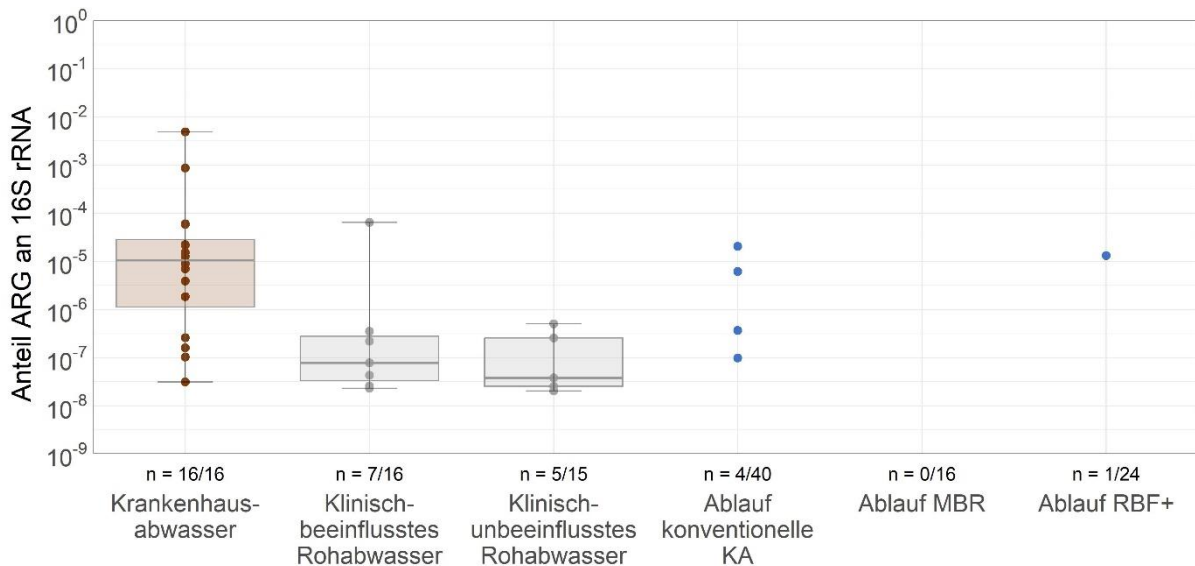


Abbildung 56: Anteile des Resistenzgens *bla_{NDM-1}* an der in der Probe vorhandenen 16S rRNA-Gene.
Die Probenahmestellen wurden nach Matrix gruppiert.

Bei dem Resistenzgen *bla_{NDM-1}* zeigt sich bei den wenigen Nachweisen die vorliegen ein leicht höherer Anteil im aufbereiteten Abwasser. Da die entsprechenden Stichprobengrößen trotz Gruppierung sehr klein sind (vier von 40 und eins von 24) ist es aber schwierig hier von einer relevanten Erhöhung des Anteiles des Resistenzgens *bla_{NDM-1}* zu sprechen.

Abwasserbehandlungsverfahren – Kernaussagen

Die konventionelle (d.h. mechanisch-biologische) Abwasserbehandlung erreicht eine weitgehende Reduktion von Antibiotika-resistenten Bakterien im Abwasser, für einen vollständigen Rückhalt bedarf es allerdings einer weitergehenden Abwasserbehandlung (Siehe Kernaussage 4, Kapitel 5).

Membranbioreaktoren (MBR) und Retentionsbodenfilter (RBF) erreichen gleichwertige Reduktionsleistungen bezüglich (Antibiotika-resistenter) Bakterien und eignen sich in dieser Hinsicht gleichermaßen zur weitergehenden Abwasserbehandlung (Siehe Kernaussage 5, Kapitel 5).

Diese Erkenntnisse sind unabhängig vom bakteriellen Resistenzstatus, was bedeutet, dass während des Klärprozesses keine relative Zu- oder Abnahme der Zahl Antibiotika-resistenter Bakterien in der Gesamtpopulation stattfindet (Siehe Kernaussagen 4 und 5, Kapitel 5).

4.4 Kosten-Nutzen-Analyse

Im Folgenden werden die im vorangegangenen Abschnitt ermittelten Reduktionsleistungen der verschiedenen Behandlungsarten (konventionelle Abwasserbehandlung sowie Abwasserbehandlung mit MBR bzw. nachgeschaltetem RBF+) vor dem Hintergrund der damit jeweils verbundenen Kosten diskutiert. Als Maß für die Kosten dient die Entwicklung des Projektkostenbarwertes (PKBW) für die verschiedenen Behandlungsarten. Der PKBW ist eine

finanzmathematische Kennzahl, die in der Investitionsrechnung verwendet wird. Er gibt an, welcher Betrag notwendig ist, um alle Investitionskosten, Betriebskosten und Reinvestitionen im Zusammenhang mit einem Projekt oder einer Investition über einen bestimmten Zeitraum zu decken. Der PKBW berücksichtigt den Zeitwert des Geldes und ermöglicht die Diskontierung zukünftiger Zahlungsströme auf ihren Gegenwartswert. Dies erfordert die Anwendung von Diskontierungsfaktoren. In diesem Zusammenhang werden zwei Arten von Zahlungen berücksichtigt: Investitionskosten und Reinvestitionen (Einmalzahlungen) sowie Betriebskosten (gleichförmige Kostenreihe). Der ausgewählte Diskontierungszinssatz und das Betrachtungsjahr spielen dabei eine entscheidende Rolle.

Die Berechnung des PKBW wurde gemäß den KVR-Leitlinien (Wasser, 2012) durchgeführt. Dabei wurde ein Zinssatz von 3 % verwendet, und der Betrachtungszeitraum wurde auf 30 Jahre festgelegt, beginnend im Bezugsjahr 2021. Die Aufteilung der Investitionskosten auf die Bereiche Bautechnik (BT), Maschinentechnik (MT), Elektrotechnik (ET) sowie Mess-, Steuer- und Regelungstechnik (MSR) ist in Tabelle 11 ersichtlich, wobei die Kosten für ET und MSR zusammengefasst wurden. Die angesetzten Zeitspannen für erforderliche Reinvestitionen sind in der letzten Zeile angegeben. Die absoluten Investitions- und Betriebskosten wurden für eine Modellkläranlage mit einer Ausbaugröße von 65.000 EW auf Grundlage von Literaturdaten oder – sofern keine Literaturdaten vorhanden waren – Betriebsdaten des Erftverbandes abgeschätzt. Die Betriebskosten berücksichtigen Ausgaben für Energie, Personal sowie Instandhaltung, Ersatzteile und Chemikalienverbrauch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 aufgelistet. Details können Seiger (2023) entnommen werden.

Tabelle 11: Kostenanteile der Behandlungsstufen und Reinvestitionszeiten. BT = Bautechnik. MT = Maschinentechnik. ET = Elektrotechnik, MSR = Mess- Steuer und Regelungstechnik.

Die Kostenanteile stammen aus Horstmeyer et al. (2014) für die konventionelle Kläranlagen, aus Betriebsdaten des Erftverbandes für den RBF+ und aus Wasser (2012) für die Kläranlagen mit MBR.

Ausbau	Anteil BT	Anteil MT	Anteil ET&MSR
Konventionell	55 %	29 %	16 %
RBF+	85 %	10 %	5 %
MBR	39 %	44 %	17 %
Reinvestitionen	30 a	15 a	7,5 a (10 a)

Tabelle 12: Investitions- und Betriebskosten der Modellkläranlage mit einer Ausbaugröße von 65.000 EW nach Seiger (2023).

BT = Bautechnik. MT = Maschinentechnik. ET = Elektrotechnik, MSR = Mess- Steuer und Regelungstechnik.

	Konventionell	RBF+	MBR
Investitionskosten	17.026.750,00 €	5.270.070,00 €	5.921.418,96 €
Anteil BT	9.364.712,50 €	4.479.559,50 €	2.309.353,39 €
Anteil MT	4.937.757,50 €	527.007,00 €	2.605.424,34 €
Anteil ET&MSR	2.724.280,00 €	263.503,50 €	1.006.641,22 €
Betriebskosten	651.116,60 €/a	151.991,31 €/a	507.318,61 €/a

Der PKBW wurde mit den unten stehenden Formeln nach DWA (Wasser, 2012) und unter Verwendung der berechneten Diskontierungsfaktoren sowie der Daten aus den genannten Tabellen für die Modellkläranlage mit und ohne weitergehende Abwasserbehandlung ermittelt.

1. *Diskontierung einmaliger Kosten* $DFAKE(i;n) = \frac{1}{(1+i)^n}$
2. *Diskontierung gleichförmige Kostenreihe* $DFAKR(i; n) = \frac{(1+i)^n - 1}{(1+i)^n}$

Der Verlauf des PKBW für jede Behandlungsart über den Gesamtbetrachtungszeitraum ist in Abbildung 57 dargestellt, wobei der PKBW für die weitergehenden Behandlungsverfahren den PKBW für die konventionelle Abwasserreinigung inkludiert. Es zeigt sich, dass sich für die betrachtete Modellkläranlage die Gesamtkosten nach 30 Jahren für einen RBF+ um etwa 25 % und für einen MBR um etwa 50 % gegenüber der konventionellen Klärtechnik erhöhen. Wie am Verlauf der Kurven in Abbildung 57 ersichtlich, sind hierfür vor allem die höheren Betriebskosten des MBR-Verfahrens verantwortlich, insbesondere für Energie und Instandhaltung sowie Chemikalienverbrauch. Zusätzlich kommen beim MBR gegenüber dem RBF+ höhere Reinvestitionen in MT sowie ET und MSR über den 30-jährigen Betrachtungszeitraum zum Tragen. Für das MBR-Verfahren wurden zwei verschiedene Zeitspannen für erforderliche Reinvestitionen in ET und MSR angenommen (7,5 bzw. 10 Jahre, siehe Tabelle 11). Über den gesamten Betrachtungszeitraum ist der Unterschied zwischen diesen beiden Szenarien vernachlässigbar klein.

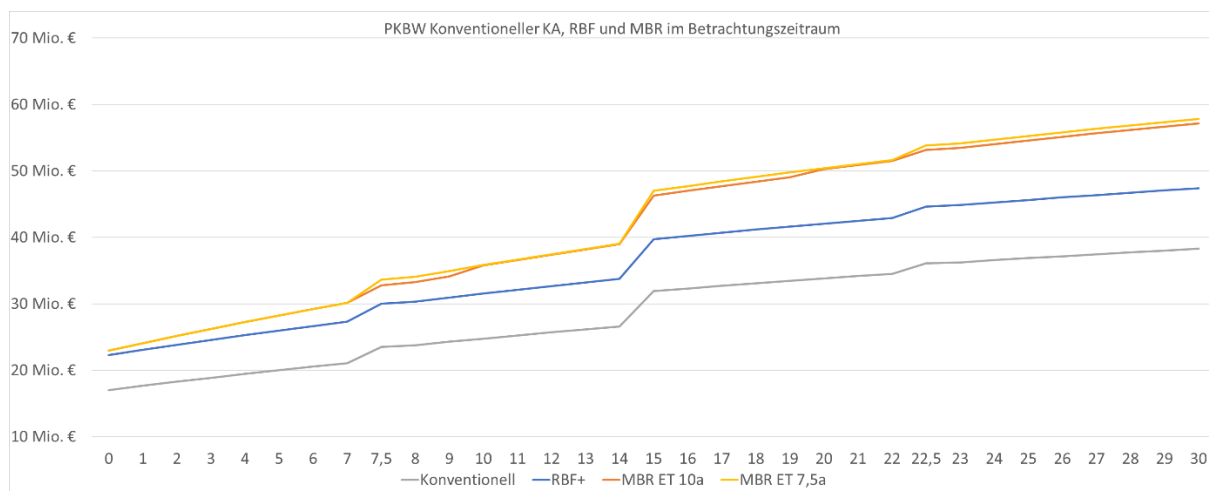


Abbildung 57: Verlauf des Projektkostenbarwertes (PKBW) für eine Modellkläranlage (65.000 EW) unter Annahme verschiedener Abwasserbehandlungsarten über den gesamten 30-jährigen Betrachtungszeitraum (Seiger, 2023).

Der PKBW für die weitergehenden Behandlungsverfahren (MBR und RBF+) schließt den PKBW für die konventionelle Abwasserbehandlung ein. Für das MBR-Verfahren wurden zwei verschiedene Zeitspannen für notwendige Reinvestitionen in die Elektrotechnik (ET) angenommen. Die Grafik ist Seiger (2023) entnommen.

Die Ergebnisse weisen den RBF+ gegenüber dem MBR-Verfahren als eine in vielen Fällen wahrscheinlich deutlich kostengünstigere Alternative für die weitergehende Abwasserbehandlung aus. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der im vorangegangenen Abschnitt 0 dargestellten Reduktionsleistungen beachtlich: (Antibiotika-resistente) Bakterien werden im RBF+ und in den untersuchten MBR-Anlagen vergleichbar gut

zurückgehalten. Der RBF+ stellt mittels der eingesetzten GAK zudem eine wirksame Barriere für Antibiotika (bzw. allgemein organische Spurenstoffe) dar. Diese Funktion kann ein MBR ohne weitere Maßnahmen nicht erfüllen. Zu beachten ist allerdings, dass für den Bau eines RBF+ deutlich mehr Fläche benötigt wird, die nicht an allen Standorten verfügbar sein wird. Da die benötigte Filterfläche maßgeblich von der zu erwartenden Abwassermenge abhängig ist, stellt die Größe der vorgeschalteten Kläranlage einen maßgeblichen Faktor für die Realisierbarkeit dar. Für die KA Rheinbach beträgt die Gesamtfilterfläche des RBF+ 5.000 m², für die in etwa doppelt so große Modellkläranlage hat Seiger (2023) eine benötigte Filterfläche von rund 10.000 m² abgeschätzt. Für noch größere Kläranlagen wird der Einsatz eines RBF+ zur Nachbehandlung des KA-Ablaufs entsprechend zunehmend unrealistisch.

Es ist des Weiteren wichtig zu betonen, dass die Abschätzung des PKBW für den RBF+ stark von der Annahme abhängig ist, dass über den 30-jährigen Betrachtungszeitraum keine Erneuerung der Aktivkohle im Filterkörper zur Aufrechterhaltung des Spurenstoffrückhaltes notwendig wird. Eine Erneuerung der Aktivkohle wäre unvermeidlich mit erheblichen Mehrkosten verbunden. Der Erftverband hat aus dem mehrjährigen Betrieb einer RBF+-Pilotanlage sowie Laborversuchen Hinweise, dass biologische Prozesse im Filterkörper die Lebensdauer der Aktivkohle im RBF+ gegenüber einer konventionellen GAK-Filtration wie auf der KA Glessen deutlich erhöhen. Mit Stand Herbst 2023 ist nach beinahe vierjährigem Betrieb der RBF+-Großtechnik noch kein Durchbruch organischer Spurenstoffe für die GAK-Segmente des Filters festgestellt worden. Ob sich allerdings tatsächlich eine Langlebigkeit der Aktivkohle über mehrere Jahrzehnte ergibt, wird sich erst im weiteren Betrieb des RBF+ in Rheinbach zeigen. In jedem Fall ist allerdings festzuhalten: Das Segment 1 des Filterkörpers erzielt auch ohne Aktivkohle eine gewisse Reduktion der Sulfamethoxazol-Konzentrationen im Ablauf der KA Rheinbach, wenn auch in geringerem Maße und mit geringerer Verlässlichkeit. Für den Rückhalt (antibiotika-resistenter) Bakterien spielt die Aktivkohle im Filterkörper nach den Messergebnissen dieses Projektes gar keine Rolle, so dass auch bei reduziertem Rückhalt von Spurenstoffen aufgrund des GAK-Beladungszustandes ein gleichbleibender Rückhalt von Mikroorganismen zu erwarten wäre.

Allgemein ist festzuhalten, dass die Ergebnisse der dargestellten Kostenermittlung nur eingeschränkt verallgemeinerbar sind. Die für eine Kläranlage anfallenden Betriebs- und Investitionskosten werden von einer Vielzahl von individuellen Faktoren beeinflusst, deren Variabilität in der vorliegenden Analyse einer Modellkläranlage nicht berücksichtigt werden konnte. Die Ergebnisse sind zudem von der Wahl des gewählten Betrachtungszeitraumes sowie weiteren Annahmen abhängig. Einige Teilabschätzungen der Betriebskosten beruhen außerdem auf Betriebsdaten des Erftverbandes nur eines einzigen Jahres (Seiger, 2023). Das betrachtete Jahr 2021 war im Juli durch das extreme Hochwasser in West- und Mitteleuropa beeinflusst, von dem u.a. die Kläranlage Rheinbach betroffen war. Die verwendete Datenbasis ist daher möglicherweise nicht repräsentativ für den langjährigen Betriebskostenaufwand, wobei eingeschränkt werden muss, dass die Betriebsdaten aller in HyReKA und ARA untersuchten Kläranlagen in die Kostenermittlung eingeflossen sind, diese nicht alle vom Hochwasserereignis betroffen waren und der Großteil der Kostenschätzungen auf Literaturdaten beruhen und daher unabhängig von der Betriebsdatenbasis des Erftverbandes ist.

Kosten-Nutzen-Analyse – Kernaussagen

Membranbioreaktoren (MBR) und Retentionsbodenfilter (RBF) erreichen gleichwertige Reduktionsleistungen bezüglich (Antibiotika-resistenter) Bakterien und eignen sich in dieser Hinsicht gleichermaßen zur weitergehenden Abwasserbehandlung (Siehe Kernaussage 5, Kapitel 5).

Die weitgehend vergleichbare Reduktionsleistung beider Verfahren bezüglich der untersuchten Parameter ist besonders vor dem Hintergrund der deutlich geringeren Betriebskosten des RBF+ interessant. Die Realisierbarkeit eines RBF+ zur weitergehenden Abwasserbehandlung ist allerdings stark von der Größe der vorgeschalteten Kläranlage und der für den Bau zur Verfügung stehenden Fläche limitiert (Siehe Kernaussage 5, Kapitel 5).

4.5 Eintrag von Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in die Umwelt über die Matrix Abwasser

Eine ganzheitliche Strategie zur Reduzierung von Antibiotikaresistenzen im Abwasser erfordert eine umfassende Betrachtung, die sowohl den breiteren Kontext als auch die lokalen Gegebenheiten berücksichtigt. Dass Kläranlagenabläufe zu einer konstanten mikrobiellen Grundbelastung der aufnehmenden Gewässer beitragen ist durch die Literatur und den aktuellen Bericht in umfassender Weise belegt. Eine Aufrüstung kommunaler Kläranlagen zur Eliminierung von Antibiotikaresistenzen ist eine Möglichkeit, diesen Eintrag zu reduzieren (siehe dazu auch Abschnitt 4.3). Für eine solche Aufrüstung an notwendigen Stellen ist es relevant, die individuellen Kanal-Einzugsgebiete der Kläranlagen genau zu charakterisieren und die Gewässernutzung unterhalb der Einleitung der jeweiligen Kläranlage zu kennen. Denn bei der Priorisierung von Maßnahmen zur Aufrüstung kommunaler Kläranlagen zur Eliminierung von Resistenzen ist es wichtig, eine wirtschaftliche Herangehensweise zu verfolgen. Dabei sollten nicht nur die Investitionskosten betrachtet werden, sondern auch langfristige Effizienz- und Wirksamkeitsaspekte berücksichtigt werden. Sensible Gewässernutzungen, wie beispielsweise Trinkwassergewinnung, müssen dabei besonders beachtet werden, um potenzielle Risiken für die menschliche Gesundheit zu reduzieren. Des Weiteren ist es entscheidend, die Charakteristika des Einzugsgebietes der Kläranlage zu berücksichtigen. Dies umfasst unter anderem die Größe des Einzugsgebiets, die Bevölkerungsdichte, aber auch spezifische Einleitungen, wie beispielsweise Abwasser aus Krankenhäusern oder anderen medizinischen Einrichtungen. Die Ergebnisse des HyReKA- und des ARA-Projektes, sowie der bekannten Literatur (ausführlich in den Kapiteln 1.1, 1.2, 3.3, 4.1, 4) zeigen, dass insbesondere Klinikeinleitungen einen Beitrag zur Gesamtbelastung des Abwassers mit Resistenzparametern leisten. Diese Erkenntnis sollte bei der Entscheidungsfindung für Maßnahmen zur Bekämpfung dieser Problematik eine Rolle spielen.

Unabhängig von der spezifischen Resistenzproblematik wurde die Problematik der Mischwasserentlastungen als ein Hauptanteil zur mikrobiellen Gesamtbelastung (vor allem mit Fäkalindikatoren) der Siedlungsentwässerung in frühen Studien beschrieben und stellt insofern keine neue Erkenntnis dar (Rechenburg et al., 2006). Bei Starkregen gelangen Schadstoffe und Krankheitserreger, darunter auch Antibiotika-resistente Bakterien, direkt aus dem Kanalnetz in die Gewässer und verursachen eine hohe mikrobielle Stoßbelastung

(Atherholt et al., 1998; Gibson et al., 1998; Honda et al., 2020; Kistemann et al., 2002; Mascher et al., 2017; Rechenburg and Kistemann, 2009).

Laut statistischem Bundesamt (aktuellster Datensatz zum Abrufdatum 2019) gab es in Deutschland 2019 mehr als 8.800 Abwasserbehandlungsanlagen, die eine jährliche Abwassermenge von etwa 10 Mrd. m³ behandeln (Statistisches Bundesamt, 2024). Davon sind ca. 50 % als Schmutzwasser und 50 % als Fremd- und Niederschlagswasser angegeben (Statistisches Bundesamt, 2024). Mischkanalisationen haben einen Anteil von über 50 % an allen Kanalisationen in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2019). Dabei gibt es mehr als 20.000 Regenüberlaufbecken bzw. Stauraumkanäle und mehr als 45.000 Mischwassereinleitstellen, wobei ca. 1 % der Schmutzwassermenge nicht in Kläranlagen aufbereitet, sondern unbehandelt ins Gewässer eingeleitet wird (Statistisches Bundesamt, 2019).

Im Rahmen des Projektes HyReKA wurde durch das Institut für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen eine Bewertung der urbanen Gewässereinträge und Möglichkeiten der Eintragsminderung dargestellt (Pinnekamp et al., 2019). Auf der Abschlusskonferenz des Projektes (04.04.2019, Berlin) wurde eine modellgestützte Frachtbilanzierung von Einträgen ins Oberflächengewässer für die untersuchten Antibiotika und Antibiotikarückstände, sowie für die untersuchten Antibiotika-resistenten Bakterien und die Antibiotikaresistenzgene von Mischwasserentlastungen im Vergleich zu Kläranlageneinleitungen dargestellt.

Dabei wurde gezeigt, dass die Kläranlagen einen deutlich höheren Anteil an der Gesamtfracht, bezogen auf Antibiotika und Antibiotikarückstände, zeigten (im Mittel über 21 Substanzen bei >90 %). Die Unterschiede bei den Substanzen sind durch die entsprechenden Abbauraten innerhalb des Klärprozesses zu erklären. Für die 14 in HyReKA untersuchten Antibiotikaresistenzgene konnte berechnet werden, dass der Anteil der Kläranlagen an der Gesamtfracht in die Oberflächengewässer bei ca. 50 % lag. Die Hälfte der Jahresfrachten wird demnach durch Mischwasserabschläge in die Gewässer entlassen. Sehr deutlich wird die Relevanz der Mischwasserabschläge für die untersuchten Antibiotika-resistenten Bakterien, denn hier liegt der Anteil der Kläranlagen an der Gesamtfracht bei nur ca. 5 %. Der weitaus überwiegende Anteil an Belastungen mit Antibiotika-resistenten Bakterien erfolgt demnach über das Mischwasser. Wenn dieses Mischwasser aus einem Kanaleinzugsgebiet stammt in dem Krankenhäuser angeschlossen sind, kann dieses einen hohen Anteil an multiresistenten Bakterien enthalten. Vor diesem Hintergrund könnte die Nachrüstung konventioneller Kläranlagen mit zusätzlichen Behandlungsstufen ineffektiv sein, solange relevante Frachtanteile resistenter Mikroorganismen über Mischwasserabschläge eingeleitet werden. Maßnahmen zur Vermeidung oder Behandlung von Mischwasserabschlägen sollten daher ebenso diskutiert werden wie die Aufrüstung von kommunalen Kläranlagen. Durch die Installation von Retentionsbodenfiltern (RBF) kann der Eintrag von Mikroorganismen, chemischen Substanzen und die hydraulischen Belastungen durch Mischwasserabschläge erheblich gesenkt werden (Brunsch et al., 2020; Christoffels et al., 2014; Overath et al., 2000; Zacharias et al., 2020).

Im ARA-Projekt konnte gezeigt werden, dass der RBF+ neben der Funktion der weitergehenden Abwasserbehandlung auch für die Behandlung des Mischwassers bei einem Starkregenereignis geeignet ist und die hydraulische Stoßbelastung des Gewässers mit Schadstoffen sowie Mikroorganismen reduzieren kann. Im Ablauf des RBF+ konnten die Antibiotika fast vollständig reduziert werden, für die mikrobiologischen Parameter zeigt sich eine Reduktion von 2-3 Log-Stufen, auch wenn diese nicht vollständig reduziert werden konnten. Eine Frachtbetrachtung wurde im ARA-Projekt nicht durchgeführt.

Insgesamt erscheint eine zentrale Lösung zur Entfernung von Antibiotikaresistenzen aus dem Abwasser leichter umsetzbar als eine dezentrale Behandlung an einzelnen Krankenhäusern, birgt jedoch Herausforderungen im Hinblick auf das Verursacherprinzip. Dennoch bietet sie die Möglichkeit, Skaleneffekte zu nutzen und vorhandene Infrastrukturen effizient einzusetzen. Eine Entscheidung für oder gegen eine zentrale Abwasserbehandlung sollte auch im Verhältnis zu anderen Anforderungen und zu bereits bestehenden Regelungen an das Abwasser von Indirekteinleitern betrachtet werden.

Nicht unerwähnt zu lassen ist, dass das Problem der zunehmenden Verbreitung von Antibiotikaresistenzen eine holistische Herangehensweise erfordert, die alle relevanten Bereiche und Akteure einbezieht. Neben der Abwasserbehandlung sind weitere Maßnahmen notwendig, um das Resistenzauftreten in der Umwelt zu reduzieren. Dies umfasst unter anderem die Reduktion des Antibiotikaeinsatzes, die Sensibilisierung der Bevölkerung für den verantwortungsvollen Umgang mit Antibiotika (Schmiege et al., 2020b) und die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Letztendlich ist im Sinne des *One-Health*-Konzeptes eine holistische Herangehensweise erforderlich, die die Verbindung zwischen menschlicher Gesundheit, Tiergesundheit und Umwelt berücksichtigt und eine koordinierte Zusammenarbeit verschiedener Fachbereiche sowie politische Maßnahmen erfordert (Schmiege et al., 2020a).

Eintragspfade in die Umwelt – Kernaussagen

Membranbioreaktoren (MBR) und Retentionsbodenfilter (RBF) erreichen gleichwertige Reduktionsleistungen bezüglich (Antibiotika-resistenter) Bakterien und eignen sich in dieser Hinsicht gleichermaßen zur weitergehende Abwasserbehandlung (Siehe Kernaussage 5, Kapitel 5).

Eine weitergehende Abwasserbehandlung zur Reduktion von Antibiotikaresistenzen im Abwasser muss in ein Gesamtkonzept eingebettet sein, welches allen weiteren Behandlungszielen unter Berücksichtigung lokalen Gegebenheiten (Trenn- oder Mischsystem, Fremdwassereinfluss, Eigenschaften des Vorfluters) gerecht wird. Insbesondere ist die Rolle von Mischwasserabschlägen zu berücksichtigen, welche wahrscheinlich große Frachtanteile Antibiotika-resistenter Bakterien (inklusive multiresistenter Krankheitserreger) in die aquatische Umwelt emittieren (Siehe Kernaussage 6, Kapitel 5).

Eine zentrale „end-of-pipe“-Lösung zur Entfernung von Antibiotikaresistenzen aus dem Abwasser (d.h. eine Ertüchtigung kommunaler Kläranlagen) erscheint leichter realisierbar als eine dezentrale Abwasserbehandlung an den Krankenhäusern, unterläuft allerdings das Verursacherprinzip. Die Frage nach einer dezentralen oder zentralen Lösung ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht pauschal zu beantworten und erfordert passgenaue Einzelfallentscheidungen (Siehe Kernaussage 7, Kapitel 5).

Dem Problem einer wachsenden Verbreitung von Antibiotikaresistenzen über das klinische Umfeld hinaus kann nicht allein auf Ebene der Abwasserbehandlung begegnet werden, sondern muss integriert und unter Einbeziehung aller relevanten Bereiche und Akteure gelöst werden (Siehe Kernaussage 8, Kapitel 5).

5. Kernaussagen

- 1. Antibiotika-resistente Bakterien und Antibiotika sind ubiquitär in kommunalem Abwasser zu finden. Klinisch relevante, multiresistente Bakterien sowie kritische Last-Resort-Antibiotika werden jedoch in besonderem Maße über Krankenhausabwasser verbreitet.**

Die im Projekt untersuchten Antibiotika-resistenten Bakterien (ESBL-produzierende Bakterien und VRE) sind in den Zuläufen aller untersuchten Kläranlagen nachgewiesen worden, unabhängig von einer Beeinflussung durch Krankenhausabwasser in den zugehörigen Einzugsgebieten. Diese Bakterien werden dementsprechend auch aus dem ambulant-häuslichen Bereich (d.h. aus der Allgemeinbevölkerung) in die öffentlichen Kanalsysteme eingebracht. Hierzu zählen auch multiresistente Bakterien, die der 3MRGN-Gruppe zuzurechnen sind. Die besonders kritischen 4MRGN-Erreger finden sich hingegen fast ausschließlich in klinisch beeinflusstem Abwasser. In klinisch unbeeinflusstem Kommunalabwasser hingegen sind diese Erreger kaum vorhanden. Ebenso wie resistente Bakterien waren auch Antibiotikaresistenzgene in allen untersuchten Abwasserproben nachweisbar, allerdings mit deutlichen Unterschieden zwischen den verschiedenen Genen. Insbesondere das Resistenzgen bla_{NDM-1} zeigt eine erhöhte Nachweishäufigkeit in klinischem bzw. klinisch beeinflusstem Abwasser, wohingegen es in klinisch unbeeinflusstem Abwasser nur selten nachgewiesen werden konnte.

Die Antibiotika-Befundmuster ähneln sich in den untersuchten Kläranlagenzuläufen (sowohl klinisch beeinflusst als auch klinisch unbeeinflusst) weitgehend, mit wiederkehrend häufigen Nachweisen der Wirkstoffe Sulfamethoxazol, Trimethoprim, Ciprofloxazin sowie verschiedenen Makrolid-Antibiotika (insbesondere Clarithromycin und Azithromycin). Klinisch beeinflusstes Abwasser zeichnet sich durch die Anwesenheit zusätzlicher Wirkstoffe aus, die als Reserve- oder Last-Resort-Antibiotika ausschließlich im klinischen Umfeld eingesetzt werden. Als hochspezifischer Marker für eine klinische Beeinflussung sticht bei den ARA-Untersuchungsdaten Piperacillin heraus: An den KA-Zuläufen mit Klinikeinfluss wurde es praktisch immer nachgewiesen, an den KA-Zuläufen ohne Klinik im Einzugsgebiet war Piperacillin hingegen nie oder nur vereinzelt nachweisbar. In unverdünntem Klinikabwasser konnten dabei zum Teil sehr hohe Antibiotika-Konzentrationen bestimmt werden. So wurden in einzelnen Klinikabwasserproben aus Grevenbroich Tagesdurchschnittskonzentrationen für Piperacillin deutlich oberhalb therapeutisch wirksamer Werte festgestellt. Solch hohe Wirkstoffkonzentrationen lassen die Selektion von Antibiotika-resistenten Bakterien im Kanalsystem – zumindest zeitweilig und lokal – möglich erscheinen, ohne dass dies im ARA-Projekt gezielt untersucht wurde.

- 2. Die untersuchten Krankenhäuser der Grund-, Regel- und Maximalversorgung emittieren erhöhte Anteile klinisch relevanter, multiresistenter Bakterien. Im Abwasser der Grund- und Regelversorger finden sich allerdings mehrheitlich 3MRGN-Isolate. Im Abwasser des Maximalversorgers werden mehrheitlich die besonders kritischen 4MRGN-Isolate nachgewiesen.**

Die Untersuchungsergebnisse aus dem HyReKA-Projekt zeigen, dass die durch den Maximalversorger freigesetzten, Gram-negativen Krankheitserreger mit Antibiotikaresistenz zu zwei Dritteln einer der beiden klinisch relevanten, multiresistenten Gruppen (3MRGN oder 4MRGN) zugeordnet werden können. Dieser Gesamtanteil bestätigt sich im ARA-Projekt für

den Regelversorger in Euskirchen. An der untersuchten Einleitstelle des Grundversorgers in Grevenbroich ist der Anteil geringer (ca. ein Drittel aller Gram-negativen Erreger haben eine Antibiotikaresistenz). Allerdings liegt hier eine Untererfassung nahe, da nicht der gesamte Abwasserstrom aus dem Krankenhaus erfasst wurde und die Anteile im gesammelten kommunalen Abwasser am Zulauf der Kläranlage Grevenbroich wieder deutlich zunehmen. Wie unter Kernaussage 1 beschrieben ist die Anwesenheit von 4MRGN-Erregern eine charakteristische Eigenschaft von klinisch beeinflusstem Abwasser. Die Untersuchungen im ARA-Projekt zeigen allerdings, dass die Grund- und Regelversorger deutlich geringere Anteile an 4MRGN-Erregern in das Abwasser freisetzen als der HyReKA-Maximalversorger (rund 10 % bzw. 30 % der resistenten Gram-negativen Bakterien beim Grund- bzw. Regelversorger, mehr als 50 % beim Maximalversorger). Umgekehrt emittieren Grund- und Regelversorger in größerem Ausmaß 3MRGN-Erreger (ca. 30 % bzw. 40 % der resistenten Gram-negativen Erreger gegenüber ca. 20 % beim Maximalversorger). Obwohl Klinikabwasser daher insgesamt ein größeres Risikopotenzial bezüglich der Verbreitung Antibiotika-resistenter Krankheitserreger als häuslich-kommunales Abwasser aufweist, bestehen je nach genauer Herkunft des Klinikabwassers (d.h. Klinikgröße und/oder Versorgungsstufe) Unterschiede bezüglich der Erregeranteile nach MRGN-Klassifizierung.

3. Die Erkenntnisse bezüglich des Emissionsgeschehens sollten anhand weiterer Klinikstandorte und Kanaleinzugsgebiete abgesichert werden. Für die Aufklärung etwaiger zeitlicher Trends im Aufkommen von Antibiotikaresistenzen im Abwasser bedarf es systematischer Langzeituntersuchungen.

Über HyReKA und ARA wurden projektübergreifend Abwässer von insgesamt drei Krankenhäusern untersucht (jeweils einem Grund-, Regel- und Maximalversorger). Um die Verallgemeinerbarkeit der Ergebnisse abzusichern, sollten die erhobenen Daten um weitere Krankenhäuser und medizinische Einrichtungen ergänzt werden. Das NRW-weite Monitoring-Programm des LANUV im parallellaufenden ARB-Projekt liefert in dieser Hinsicht vermutlich bereits wertvolle Hinweise. Der Datenvergleich zwischen dem HyReKA-Projekt (2016-2019) und dem ARA-Projekt (2020-2023) ergibt bei gleicher Methodik systematisch höhere Anteile multiresistenter Bakterien im späteren Messzeitraum. Dies betrifft insbesondere das Aufkommen von 3MRGN-Erregern im klinisch unbeeinflussten Abwasser. Ob sich aus dieser Diskrepanz ein zeitlicher Trend im Resistenzauftreten in Abwässern ableiten lässt, muss in Langzeitmessreihen unter Berücksichtigung weiterer Einflussfaktoren wie den spezifischen Eigenschaften der betrachteten Einrichtungen und Einzugsgebiete sowie den Witterungsverhältnissen während der Probenahmen ermittelt werden. Die Aufklärung etwaiger zeitlicher Trends ist essentiell für die Interpretation der erhobenen Messdaten. Diese können entweder einen mehr oder weniger statischen Zustand bei der Verbreitung multiresistenter Bakterien im Abwasser widerspiegeln, oder sie markieren einen Zwischenzustand in einem dynamischen Ausbreitungsgeschehen, welches durch ein sukzessives Vordringen multiresistenter Bakterien aus dem klinischen auch in den ambulanten und häuslichen Bereich gekennzeichnet ist.

4. Die konventionelle (d.h. mechanisch-biologische) Abwasserbehandlung erreicht bereits eine weitgehende Reduktion von Antibiotika-resistenten Bakterien im Abwasser, für einen vollständigen Rückhalt bedarf es allerdings einer weitergehenden Abwasserbehandlung.

Durch die konventionelle Klärung des Abwassers können die hygienisch-mikrobiologischen Parameter um 2-3 Log-Stufen reduziert werden. Dies entspricht einem Rückhalt von bis zu 99,9 % der Zulaufbelastung. Diese Erkenntnis ist sowohl nach den HyReKA- als auch nach den ARA-Daten unabhängig vom bakteriellen Resistenzstatus, was bedeutet, dass in der Kläranlage keine relative Zu- oder Abnahme des Anteils Antibiotika-resistenter Bakterien an der Gesamtpopulation stattfindet. Ebenso ergibt sich in der Kläranlage auch keine Verschiebung hinsichtlich des Anteils multiresistenter Bakterien (3MRGN und 4MRGN), d.h. dass der konventionelle Klärprozess offenbar keinen Selektionsdruck auf Bakterien hinsichtlich ihres Resistenzstatus ausübt. Dies bestätigt sich ebenso auf Ebene der untersuchten Resistenzgene, wenn deren Konzentrationen ins Verhältnis zum bakteriellen 16S rRNA-Gen (d.h. zum allgemeinen Bakterienaufkommen im Abwasser) gesetzt werden. Trotz des bereits guten Rückhaltes resistenter Bakterien in konventionellen Kläranlagen ergibt sich am KA-Ablauf immer noch eine Belastung beispielsweise mit ESBL-bildenden *E. coli* von ca. 100 KBE/100 ml im Median. Eine annähernde Totalelimination resistenter Bakterien am KA-Ablauf kann nur mit einer weitergehenden Abwasserbehandlung erzielt werden. Bezüglich der untersuchten Resistenzgene lassen sich weitgehend analoge Schlussfolgerungen formulieren, wobei die im konventionellen Klärprozess erzielten Reduktionsraten zwischen 1 und 3 Log-Stufen schwanken und damit insgesamt variabler ausfallen als für die kulturbasierten Untersuchungsparameter.

5. Membranbioreaktoren (MBR) und Retentionsbodenfilter (RBF) erreichen gleichwertige Reduktionsleistungen bezüglich (Antibiotika-resistenter) Bakterien und eignen sich in dieser Hinsicht gleichermaßen zur weitergehenden Abwasserbehandlung.

Sowohl die im ARA-Projekt beprobten MBR-Kläranlagen als auch das naturnahe Verfahren des RBF+ in Rheinbach erzielen eine Erhöhung der Reduktionsleistung um ca. 2 Log-Stufen gegenüber der konventionellen Abwasserbehandlung, d.h. über den gesamten Klärprozess ergibt sich eine Gesamtreduktion der Zulaufbelastung um ca. 5 Log-Stufen. Antibiotika-resistente Bakterien finden sich nach der Behandlung mittels MBR oder RBF+ entsprechend gar nicht mehr oder nur noch vereinzelt im Abwasserstrom, so dass ein praktisch vollständiger Rückhalt erzielt wird. Genau wie im rein konventionellen Klärprozess wirken die weitergehenden Behandlungsverfahren dabei nicht selektierend bezüglich des Resistenzaufkommens in der Bakterienpopulation. Die praktisch vollständige Elimination resistenter Bakterien beruht auf der durch Membranfiltration bzw. Bodenpassage erzielten Erhöhung des Gesamtrückhaltes von Mikroorganismen im Abwasser. Beide Verfahren – sowohl MBR als auch RBF+ – führen darüber hinaus zu einer vergleichbaren Reduktionsleistung bezüglich der Reduktion von Resistenzgenen um weitere 1-2 Log-Stufen, wobei sich zwischen den verschiedenen Genen und Anlagentypen teils relativ große Schwankungsbreiten zeigen. Antibiotika (und andere organische Spurenstoffe) lassen sich bei beiden Verfahren durch die Kombination mit Aktivkohle verlässlich aus dem Abwasserstrom entfernen – beispielsweise in Form von PAK als Zusatz zum Belebtschlamm beim MBR-Verfahren oder in Form von GAK als Zusatz zum RBF-Filtersubstrat. Die weitgehend

vergleichbare Reduktionsleistung beider Verfahren bezüglich der untersuchten Parameter ist insbesondere vor dem Hintergrund der deutlich geringeren Betriebskosten des RBF+ interessant. Die Realisierbarkeit eines RBF+ zur weitergehenden Abwasserbehandlung ist allerdings stark von der Größe der vorgeschalteten Kläranlage abhängig und das Einsatzpotenzial von der für den Bau zur Verfügung stehenden Fläche limitiert.

6. Eine weitergehende Abwasserbehandlung zur Reduktion von Antibiotikaresistenzen im Abwasser muss in ein Gesamtkonzept eingebettet sein, welches allen weiteren Behandlungszielen unter den örtlichen Gegebenheiten (Trenn- oder Mischsystem, Fremdwassereinfluss, Eigenschaften des Vorfluters) gerecht wird. Insbesondere ist die Rolle von Mischwasserabschlägen zu berücksichtigen, welche große Frachtanteile Antibiotika-resistenter Bakterien (inklusive multiresistenter Krankheitserreger) in die aquatische Umwelt emittieren.

Im Falle der Aufrüstung kommunaler Kläranlagen mit einer weitergehenden Abwasserbehandlung zur Eliminierung von Antibiotikaresistenzen ist aus Wirtschaftlichkeitserwägungen eine Priorisierung von Anlagen erforderlich. Diese Priorisierung muss dabei in den breiteren Kontext z.B. auch der Spurenstoffproblematik eingebettet sein. Mögliche Priorisierungskriterien sind sensible Gewässernutzungen (z.B. Trinkwassergewinnung) unterhalb der betreffenden Einleitung, die Größenklasse der Kläranlage sowie der anzunehmende Anteil des Abwasseraufkommens am Abfluss des aufnehmenden Gewässers. Darüber hinaus sind die Eigenschaften des Einzugsgebietes der Kläranlage zu berücksichtigen, hier insbesondere das Vorhandensein von Klinikeinleitungen sowie die Verdünnung des klinischen Abwassers im gesamten Abwasser, welches der Kläranlage zufließt. In diesem Zusammenhang ist auch die Rolle von Mischwasserentlastungen aus dem Kanalnetz von entscheidender Bedeutung. Die HyReKA-Ergebnisse haben bestätigt, dass Mischwasserentlastungen einen Haupteintragspfad für resistente Bakterien in die aquatische Umwelt darstellen. Aufgrund der bereits guten Eliminationsleistung von konventionellen Kläranlagen (bis zu 99,9 % der mikrobiellen Grundlast) erscheint deren Nachrüstung mit einer weitergehenden Behandlungsstufe wenig effektiv, wenn in einem Kanalgebiet über Mischwasserabschläge relevante Frachtanteile (resistenter) Krankheitserreger an der Kläranlage vorbei in die Gewässer eingebracht werden. Die Ergebnisse zum RBF+ in dieser Studie zeigen sehr deutlich, dass die Konzentrationen resistenter Bakterien in Mischwasserabschlägen um mehrere Log-Stufen höher liegen können als im Ablauf einer konventionellen Kläranlage. Im Zweifel sollten daher Maßnahmen zur Vermeidung (z.B. Schaffung zusätzlicher Speicherkapazitäten in den Kanalnetzen, intelligente Kanalnetzsteuerung, verstärkter Einsatz von Trennkanalisation) oder Behandlung (z.B. mittels Retentionsbodenfiltern) von Mischwasserabschlägen Vorrang vor der Etablierung weitergehender Behandlungsstufen auf den Kläranlagen haben.

- 7. Eine zentrale „end-of-pipe“-Lösung zur Entfernung von Antibiotikaresistenzen aus dem Abwasser (d.h. eine Ertüchtigung kommunaler Kläranlagen) erscheint leichter realisierbar als eine dezentrale Abwasserbehandlung an Krankenhäusern, unterläuft allerdings das Verursacherprinzip. Die Frage nach einer dezentralen oder zentralen Lösung ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht pauschal zu beantworten und erfordert passgenaue Einzelfallentscheidungen.**

Die HyReKA-Ergebnisse belegen die besondere Rolle der untersuchten Maximalversorger-Klinik für die Verbreitung klinisch-relevanter, multiresistenter Erreger mit dem Abwasser (insbesondere solche mit 4MRGN-Status). Das betreffende Krankenhaus wurde in dieser Hinsicht als ein Risikoeinleiter identifiziert, ohne dass dies bereits regulatorische Konsequenzen gehabt hat. Macht man das Risiko an den Gesamtanteilen multiresistenter Bakterien, der Anwesenheit von 4MRGN-Erregern oder hohen Konzentrationen von (Last-Resort-)Antibiotika im Abwasser fest, müssten nach den ARA-Ergebnissen auch Krankenhäuser der Grund- und Regelversorgung als Risikoeinleiter eingestuft werden. Diese Krankenhäuser machen etwa zwei Drittel aller klinisch-stationären Einrichtungen in Deutschland aus, was folglich einer enormen Steigerung der Zahl potenzieller Risikoeinleiter gleichkäme (über 1.200 Einrichtungen in Deutschland, DeStatis 2022). Insgesamt lässt dies einen „end-of-pipe“-Ansatz zur Entfernung von Antibiotikaresistenzen deutlich leichter realisierbar erscheinen als eine dezentrale Behandlung an jedem einzelnen Klinikstandort, zumal dies die Nutzung von Skaleneffekten sowie der bereits vorhandenen Infrastruktur und Expertise aufseiten der kommunalen Abwasserbeseitigung ermöglichen würde. Eine zentrale Lösung scheint vor dem Hintergrund einer etwaigen fortschreitenden Ausbreitung multiresistenter Bakterien im Abwasser auch aus Vorsorgegesichtspunkten sinnvoll (siehe Kernaussage 3).

Dagegen spricht, dass eine zentrale Lösung der eigentlich wünschenswerten Umsetzung des Verursacherprinzips entgegensteht, sofern Krankenhäuser absehbar die Hauptemittenten z.B. von multiresistenten Erregern bleiben (siehe nochmals Kernaussage 3). Darüber hinaus sind die Entlastungen aus dem Mischsystem bei der Freisetzung multiresistenter Erreger in die aquatische Umwelt zu berücksichtigen, die bei zentraler Ertüchtigung der kommunalen Kläranlagen ohne weitere Maßnahmen nicht unterbunden werden (siehe Kernaussage 6). Eine Entscheidung für oder gegen eine zentrale Abwasserbehandlung (gegenüber einer dezentralen Behandlung) sollte außerdem auch im Verhältnis zu bereits bestehenden Anforderungen an das Abwasser von (industriellen) Indirekteinleitern vertretbar sein. Möglicherweise müssen Entscheidungen spezifisch für einzelne Einzugsgebiete kommunaler Kläranlagen getroffen werden. Als Entscheidungskriterium könnte hier eine Betrachtung der reduzierten Gesamtfrachten auf Ebene des Kanalsystems einschließlich Kläranlage dienen. Die im ARB-Projekt des LANUV untersuchten MBR-Anlagen am Marienhospital Gelsenkirchen und am Kreiskrankenhaus Waldbröl (jeweils mit nachgeschalteter Ozon- oder Aktivkohlebehandlung) zeigen, dass auch ein aufwendiges Verfahren der dezentralen Klinikabwasseraufbereitung mit Erfolg realisierbar ist. Die Abwasserverordnung sowie die geltenden kommunalen Abwassersatzungen beinhalten derzeit jedoch meist keine konkreten hygienischen Anforderungen an Indirekteinleitungen in das kommunale Abwassersystem.

8. Dem Problem einer wachsenden Verbreitung von Antibiotikaresistenzen über das klinische Umfeld hinaus kann nicht allein auf Ebene der Abwasserbehandlung begegnet werden, sondern es muss holistisch und unter Einbeziehung aller relevanten Bereiche und Akteure gelöst werden.

Ungefähr zwei Drittel aller Infektionen mit multiresistenten Krankheitserregern ereignen sich im Klinikumfeld. Dieser Umstand darf dem Problem einer Verbreitung von Antibiotikaresistenzen im Abwasser und der aquatischen Umwelt nichts von seiner Dringlichkeit und Relevanz nehmen. Er zeigt aber, dass die Grundproblematik in ihren Ursachen und Wirkungen über den Abwassersektor hinaus reicht und weite Bereiche des gesellschaftlichen Lebens berührt. Dementsprechend sind neben der Abwasserbehandlung zusätzliche Maßnahmen erforderlich, um das Resistenzauftreten in der breiten Gesellschaft – und damit auch die weitere Emission von Antibiotika-resistenten Krankheitserregern in und über das Abwasser – zu begrenzen. Hierzu können beispielsweise zählen: Die effiziente Reduktion des Antibiotika-Einsatzes in der Humanmedizin und in der veterinärmedizinischen Anwendung, die Schaffung eines erhöhten Problembewusstseins in der Bevölkerung, die Aufklärung über den sachgerechten Umgang mit Antibiotika, sowie die Entwicklung neuer antibiotischer Wirkstoffe. Neben dem Gesundheits- und dem Abwassersektor betrifft dies weitere Bereiche wie die Veterinärmedizin, die Landwirtschaft und die Lebensmittelindustrie (hier beispielsweise Schlachtbetriebe). Für die wirksame Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen ist letztlich, ganz im Sinne des *One-Health*-Konzeptes, eine holistische Herangehensweise anzustreben, welche die Verbindung zwischen menschlicher Gesundheit, Tiergesundheit sowie Umwelt berücksichtigt und eine gebietsübergreifende Zusammenarbeit von Humanmedizin, Veterinärmedizin, Umweltwissenschaften, öffentlicher Gesundheit sowie Politik erfordert.

6. Glossar

Antibiotika und Resistenzen

Antibiotika:

Substanzen, die einen hemmenden Einfluss auf den Stoffwechsel von Bakterien haben und so deren Vermehrung verhindern. Antibiotika werden in der Medizin zur lokalen oder systemischen Therapie bakterieller Infektionskrankheiten verwendet. Antibiotika lassen sich auf verschiedene Weise klassifizieren: Anhand der chemischen Struktur, anhand der Wirkweise oder nach dem Wirkungsort bzw. dem Wirkmechanismus. Bezüglich der Wirkweise werden bakterizide (abtötende) und bakteriostatische (das bakterielle Wachstum hemmende) Antibiotika unterschieden. Unter Betrachtung des Wirkmechanismus lassen sich Antibiotika in folgende Gruppen einteilen:

1. Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese:
Beta(β)-Laktam-Antibiotika und Glykopeptid-Antibiotika
2. Interferenzen mit dem bakteriellen Erbgut:
Chinolone, Nitroimidazol-Derivate und Rifampicin
3. Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese:
Makrolide, Lincosamide, Ketolide, Tetrazykline, Aminoglykoside, Oxazolidinone, Chloramphenicol, Lipopeptide und Pleuromuline und
4. Interferenz mit der bakteriellen Tetrahydrofolsäure-Synthese:
Sulfonamide und Trimethoprim.

Reserveantibiotika:

Sogenannte Reserve- oder Last-Resort-Antibiotika werden zur Sicherung von Behandlungsoptionen primär gegen multiresistente Krankheitserreger eingesetzt. Hierzu zählen beispielsweise Colistin und Carbapeneme.

Antibiotikaresistenzgene (ARG):

Bakterielle Gene, die für die Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika verantwortlich sind und durch Mutationen oder horizontalen Gentransfer erworben werden.

Für das ARA Projekt wurden entsprechende Resistenzgene ausgewählt die (1) auf Plasmiden codiert sind und so einfach zwischen Bakterien weitergegeben werden, solche, die (2) häufig in Abwasser vorkommen und solche, die (3) eher seltener in kommunalem Abwasser vorkommen. Die für das ARA Projekt festgelegten Resistenzgene sind:

mcr-1: Codiert eine Resistenz gegen Colistin/Polymyxin (Reserveantibiotika), selten

blaNDM-1: Resistenz gegen eine Vielzahl von Beta-Lactam-Antibiotika, selten

blaTEM: Für 90 % aller Ampicillin-Resistenzen bei *E. coli* verantwortlich, sehr häufig

ermB: Resistenz gegen Makrolid Antibiotika, sehr häufig

Die Angabe erfolgt i.d.R. als *Gene Units* (dt. Geneinheiten) pro 100 ml (GU/100ml).

Bakterien mit Resistenz gegen ein 3. Generation Cephalosporin (3GCR):

Bakterien, die resistent gegen Antibiotika der dritten Generation von Cephalosporinen sind, einer wichtigen Klasse von Antibiotika für die Behandlung von bakteriellen Infektionen.

Biozide:

Chemische Substanzen, die zur Bekämpfung von Mikroorganismen wie Bakterien, Algen oder Pilzen eingesetzt werden.

Cycle Threshold-Wert (Ct-Wert) in der qPCR:

Ein wichtiger Parameter in der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Er gibt an, in welchem Zyklus das Fluoreszenzsignal während der PCR-Vervielfältigung einen vordefinierten Schwellenwert überschreitet. Der Ct-Wert ist ein Maß für die Anzahl der PCR-Zyklen, die benötigt werden, damit das Zielmolekül (DNA oder RNA) in der Probe nachweisbar wird. Der Wert ist invers proportional zur Menge des Zielgens in der Ausgangsprobe. Das bedeutet, dass eine niedrige Ausgangskonzentration des Zielmoleküls zu einem höheren Ct-Wert führt, während eine höhere Konzentration zu einem niedrigeren

Ct-Wert führt. Der Ct-Wert kann daher verwendet werden, um die Konzentration des Zielgens in der Probe zu quantifizieren, wenn er mit einer Standardkurve verglichen wird, die aus bekannten Konzentrationen des Zielgens erstellt wurde.

ESBL-produzierende Bakterien:

Bakterien, die das Enzym Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) produzieren, das sie gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika, einschließlich Cephalosporinen, resistent macht.

Gene Units (dt.: Genkopie):

Eine Maßeinheit für die Anzahl der Kopien eines bestimmten Gens in einem Organismus oder einer Probe.

Genotypische Resistenz:

Resistenzverhalten von Bakterien, das über den Nachweis von Resistenzgenen z.B. mittels qPCR ermittelt wird.

Horizontaler Gentransfer:

Der Prozess, bei dem genetisches Material zwischen verschiedenen Bakterienzellen derselben oder unterschiedlicher Spezies innerhalb einer Generation ausgetauscht wird.

Interne positiv-Kontrolle (IPC, engl. *internal positive control*):

Die IPC wird zusammen mit den Proben analysiert und dient dazu, mögliche Hemmstoffe oder andere Faktoren zu detektieren, die die PCR-Reaktion beeinflussen könnten. Die IPC besteht typischerweise aus synthetischer DNA, RNA oder einem anderen stabilen Molekül, das nicht in der Probe vorhanden ist.

Last-Resort-Antibiotika:

Werden verwendet, um (schwerwiegende) Infektionen mit bakteriellen Krankheitserregern zu behandeln, die gegenüber den meisten herkömmlichen Antibiotika resistent sind. Diese Antibiotika sollten nur dann eingesetzt werden, wenn alle anderen Behandlungsoptionen ausgeschöpft oder nicht verfügbar sind, da ihre Verwendung mit Risiken wie Resistenzverbreitung und zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden ist. Beispiele für Last-Resort-Antibiotika sind bestimmte Arten von Carbapenemen und Polymyxinen.

Minimale Hemmkonzentration (MHK):

Die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die das Wachstum eines bestimmten Mikroorganismus hemmt oder verhindert. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration ist notwendig, um die Wirksamkeit eines Antibiotikums gegenüber einem bestimmten Erreger zu bestimmen und somit Behandlungsrichtlinien für Infektionen festzulegen.

MRGN-Klassifizierung:

MRGN steht für "Multiresistente Gram-negative Erreger". Die Klassifizierung erfolgt nach einer Empfehlung der KRINKO (2012, 2019). Getestet wird die Resistenz gegen vier Antibiotikaklassen (mit Leitsubstanzen): Acylureidopenicilline (Piperacillin), 3./4. Generation Cephalosporine (Cefotaxim und/oder Ceftazidim), Carbapeneme (Imipenem und/oder Meropenem), Fluorchinolone (Ciprofloxacin). Anhand der Anzahl der vorkommenden Resistenzen werden Isolate als 3MRGN bzw. 4MRGN (Resistent gegen 3 bzw. 4 der genannten Klassen) klassifiziert. Außerdem wird ein Isolat, welches eine Carbapenemase besitzt, unabhängig von der phänotypischen Resistenz als 4MRGN eingestuft.

Multiplex-qPCR:

Eine molekularbiologische Technik, bei der mehrere Zielgene gleichzeitig in derselben Reaktionsmischung vervielfältigt und quantifiziert werden. Im Gegensatz zur herkömmlichen qPCR, bei der nur ein einzelnes Zielgen pro Reaktion vervielfältigt wird. Bei der Multiplex-qPCR werden spezifische Primer und Sonden verwendet, die jeweils auf die verschiedenen Zielgene passen, dabei ist jeder Primer/Sonde-Komplex mit einem anderen

Fluoreszenzfarbstoffen markiert, was es ermöglicht, die Vervielfältigung der verschiedenen Zielgene separat zur gleichen Zeit zu überwachen.

Multiresistente Bakterien:

Bakterien, die gegenüber mehreren Antibiotikaklassen resistent sind. Die Bewertung von Resistenzen wird international unterschiedlich durchgeführt. In der internationalen Literatur haben sich die Begriffe *multidrug-resistant* (MDR), *extensively drug-resistant* (XDR) und *pandrug-resistant* (PDR) etabliert. Dabei gibt es international keine einheitliche Vorgaben wie diese genau definiert und eingeordnet werden.

Normalisierung der Resistenzgene:

Die Normalisierung der Resistenzgene erfolgt über die zusätzliche Bestimmung der Konzentration des 16S ribosomalen RNA-Gens (rRNA). Die 16S rRNA ist ein Bestandteil der Ribosomen von Bakterien.

Dies wird angewandt um eine Einschätzung vorzunehmen, wie stark die Häufigkeit von Antibiotikaresistenzgenen relativ zur Gesamtzahl der Bakterien im untersuchten Probenmaterial ausgeprägt ist. Diese Methode ermöglicht es, die relative Häufigkeit von Resistenzgenen in verschiedenen Umgebungen oder Bakterienpopulationen zu vergleichen.

Phänotypische Resistenz:

Resistenzverhalten von Bakterien, das über kulturelle Verfahren z.B. MHK-Tests ermittelt wird.

Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR):

Ist eine Variante der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), welche eine Vervielfältigung definierter DNA- oder RNA-Abschnitte und ihre Quantifizierung ermöglicht. Auf diese Weise können u.a. Antibiotikaresistenzgene in Wasserproben nachgewiesen und in ihrer Menge erfasst werden. Unter Anwendung von spezifischen Primer- und SONDENSEQUENZEN (spez. Basenfolge), die komplementär zur Ziel-DNA sind, lassen sich Zielgene vervielfältigen. Dabei sind Primer und Sonden kurze, synthetisch hergestellte DNA- oder RNA-Moleküle, die an spezifische Bereiche der Ziel-DNA binden und es der DNA-Polymerase (Enzym) ermöglichen, eine neue DNA-Kette zu synthetisieren. Sonden sind mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die während des PCR-Zyklus messbare Signale emittieren, wenn die Sonde mit der Ziel-DNA hybridisiert wird. Die Fluoreszenzsignale werden dann gemessen, um die Anwesenheit und Menge der Ziel-DNA in der Probe zu bestimmen.

Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE)

Gram-positive Bakterien der Gattung *Enterococcus* mit einer Resistenz gegenüber dem Last-Resort-Antibiotikum Vancomycin.

Abwasser

Einwohnerwert (EW):

Eine Kennzahl, die in der Abwasserwirtschaft verwendet wird, um die zu erwartende Menge und Schmutzfracht von Abwässern abzuschätzen, basierend auf der Einwohnerzahl sowie der Einwohnerequivalente (entsprechend zusätzlicher Einleitungen aus Industrie und Gewerbe) einer bestimmten Region oder eines Gebiets.

Einzugsgebiet (der Kläranlage):

Das Gebiet, von dem das Abwasser einer bestimmten Kläranlage zufließt und behandelt wird. Wenn nicht anders genannt wird, bezieht sich der Begriff „Einzugsgebiet“ im Bericht immer auf das Einzugsgebiet einer Kläranlage.

Klinisch beeinflusstes Abwasser:

(Kommunales) Abwasser, in dem anteilig Abwasser aus klinischen Einrichtungen enthalten ist.

Klinisches Abwasser:

Abwasser aus einer klinischen Einrichtung.

Klinisch unbeeinflusstes Abwasser:

(Kommunales) Abwasser, in dem kein Abwasser aus klinischen Einrichtungen enthalten ist.

Kommunales Abwasser:

Abwasser aus Haushalten, Gewerbebetrieben und anderen Einrichtungen einer Gemeinde oder Stadt, das über ein Netz von Kanälen zu Kläranlagen geleitet wird, um gereinigt und behandelt zu werden, bevor es in die Umwelt abgeleitet wird.

Konventionelle Kläranlage:

Eine Kläranlage, die ein dreistufiges Verfahren (mechanische, chemische und biologische Prozesse) zur Reinigung von Abwasser verwendet. Das Verfahren wird als konventioneller Klärprozess oder konventionelle Abwasserbehandlung bezeichnet.

Membranbioreaktor-Verfahren (MBR-Verfahren):

Auch Membranbelebungsverfahren. Verfahren der weitergehenden Abwasserbehandlung, das eine biologische Reinigungsstufe mit der Verwendung von Membrantechnologie kombiniert, um Abwasser zu filtern und auf diese Weise Mikroorganismen und suspendierte Partikel aus dem Abwasser zu entfernen.

Mischwasser:

Setzt sich aus verschiedenen Wasserarten zusammen, hier insbesondere Schmutz- und Niederschlagswasser. Eine Kanalisation, welche Schutz- und Niederschlagswasser zusammen transportiert, wird dementsprechend Mischkanalisation oder Mischsystem genannt. Dem steht die Trennkanalisation (synonym Trennsystem) gegenüber, in der Schmutz- und Niederschlagswasser getrennt abgeleitet wird.

Regenüberlaufbecken (RÜB):

Ein Entlastungsbauwerk der Siedlungsentwässerung im Mischsystem oder im modifizierten Trennsystem mit Zwischenspeicherung und Überlauf in ein Gewässer. Es kommt in Kanalnetzen zur hydraulischen Entlastung zum Einsatz. Ein Teil des an einem RÜB ankommenden Wassers wird dann durch die Kanalisation zur Kläranlage weitergeleitet. Der andere Teil des Wassers kann in ein Gewässer entlastet werden.

Retentionsbodenfilter (RBF):

Werden vornehmlich für die Behandlung von Niederschlagsabflüssen aus Misch- und Trennsystemen sowie von Straßenflächen eingesetzt. Sie dienen auf diese Weise der Abminderung stofflicher und hydraulischer Gewässerbelastungen vor der Einleitung. Der klassische Aufbau des Filterkörpers ist (von oben nach unten): Eine Bepflanzung (in der Regel Schilf, *Phragmites australis*) dient dem Schutz vor Kolmation und Erosion sowie dem Aufbau einer organischen Sekundärfilterschicht. Darauf folgt eine Filterschicht Sand, eine Drainageschicht aus Kies mit einem Drainagerohrsystem. Das behandelte Wasser sickert so durch eine belebte Bodenschicht und wird auf diese Weise sowohl physikalisch gefiltert als auch biologisch gereinigt.

Weitergehende Abwasserbehandlung: Weitergehende Abwasserbehandlung bezeichnet den Prozess, bei dem Abwasser über die konventionelle Abwasserbehandlung hinaus einer zusätzlichen Aufbereitung unterzogen wird, um eine Entfernung von Verunreinigungen zu erreichen. Dies kann durch verschiedene Verfahren wie Filtration, Desinfektion, Adsorption, Oxidation oder andere fortgeschrittene physikalische, chemische oder biologische Methoden erfolgen. Das Ziel ist es, die Qualität des behandelten Abwassers weiter zu verbessern bevor es in die Umwelt zurückgeführt wird.

Sonstiges

Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification):

Die Bestimmungsgrenze bezeichnet den niedrigsten Wert einer analytischen Messgröße die von einem Messinstrument oder einer Messmethode noch zuverlässig quantifiziert werden kann. Erst oberhalb dieser Grenze kann einer Messung ein Zahlenwert zugeordnet werden. Sie ist mithilfe statistischer Methoden ermittelt und ist ein weiteres Maß für die Messempfindlichkeit. Die Bestimmungsgrenze liegt immer oberhalb des Detektionslimits/der Nachweisgrenze. Die im Bericht verwendete **Berichtsgrenze** ist die größte Bestimmungsgrenze, die für einen bestimmten Messparameter und eine bestimmte Messmethode garantiert werden kann.

Detektionslimit, Nachweisgrenze (Limit of Detection):

Bezeichnet den niedrigsten Wert bis zu der eine analytische Messgröße noch zuverlässig von einem Messinstrument oder einer Messmethode nachgewiesen werden kann. Das Detektionslimit wird mithilfe statistischer Methoden bestimmt und ist ein Maß für die Messempfindlichkeit.

LOD₉₅ steht für "Limit of Detection at 95% Confidence Level" und bezieht sich auf das Detektionslimit mit einer Konfidenz von 95%. Es ist ein statistischer Wert, der angibt, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% ein analytischer Wert über dem angegebenen Limit liegt. Dieser Wert wird im Bericht bei der Darstellung der Antibiotikaresistenzgene verwendet.

Indikatorbakterien:

Bestimmte Arten von Mikroorganismen, die als Hinweis auf die potenzielle Kontamination oder Qualität von Wasser, Lebensmitteln oder Umweltmedien dienen. Sie werden verwendet, weil ihre Anwesenheit oder Konzentration auf Verunreinigungen oder potenzielle pathogene Organismen hinweisen kann. Indikatorbakterien sind oft nicht selbst Krankheitserreger, aber ihre Präsenz kann auf eine Verschmutzung hinweisen, die potenziell gesundheitsschädlich sein kann. Die Überwachung von Indikatorbakterien ist eine wichtige Methode zur Beurteilung der Sicherheit von Trinkwasser, Badegewässern und anderen Umweltressourcen.

Klinik der Grundversorgung, Regelversorgung und Maximalversorgung:

Unterschiedliche Kategorien von Krankenhäusern basierend auf ihrer Größe, Ausstattung und dem Spektrum der angebotenen medizinischen Versorgung.

Klinik der Grundversorgung: Vorhaltung der Fachabteilungen Allgemeine Innere Medizin und Allgemeinchirurgie (251 bis 350 Betten).

Klinik der Regelversorgung: Vorhaltung von mindestens zehn Disziplinen (darunter verschiedene Schwerpunktkompetenzen der Inneren Medizin/Chirurgie, Intensivmedizin, Geburtshilfe sowie Kinder- und Jugendmedizin), dabei sollte zumindest in der Inneren Medizin/Chirurgie eine Schwerpunktbildung erfolgen (351 bis 650 Betten).

Klinik der Maximalversorgung: Vorhaltung von mehr als 15 Disziplinen (darunter verschiedene Schwerpunktkompetenzen der Inneren Medizin/Chirurgie, Intensivmedizin, Geburtshilfe, Neurologie, Neurochirurgie, HNO, Augenheilkunde, Kinder- und Jugendmedizin); und zusätzlich für Universitätsklinika: Besondere Leistungen in Forschung und Lehre, die sich auch dadurch beweisen, dass relevante Patientenzahlen in qualitativ hochwertige wissenschaftliche Studien einbezogen werden (≥ 651 Betten)

Konfidenzintervall:

Ein statistisches Maß, das die Präzision einer Parameterabschätzung aus einer Stichprobe beschreibt (z.B. für den Mittelwert). Das Konfidenzintervall umschließt den wahren Wert dieses Parameters mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit (z.B. 95 %). Je enger das Konfidenzintervall, desto höher ist die Präzision der Schätzung

Log-Stufe (logarithmische Stufe)

Maßzahl für die Größenänderung einer mikrobiellen Population um jeweils eine Zehnerpotenz. Das bedeutet: Eine Verringerung um eine Log-Stufe entspricht einer zehnfachen Verkleinerung der Population (oder einer Reduktion um 90 %), eine Verringerung um zwei Log-Stufen entspricht bereits einer hundertfachen Verkleinerung (oder einer Reduktion um 99 %), usw.

Mikrobiologische Einheiten (KBE, MPN und PBE):

KBE (Koloniebildende Einheiten): Eine Maßeinheit, die die Anzahl der lebenden Bakterien angibt, die in der Lage sind, auf einem festen Nährmedium zu wachsen und sichtbare Kolonien zu bilden.

MPN (Most Probable Number - Wahrscheinlichste Anzahl): Eine statistische Methode zur Schätzung der Anzahl von Mikroorganismen in einer Probe, basierend auf dem Wachstum in flüssigen Nährmedien.

PBE (Plaque-bildende Einheiten): Eine Maßeinheit zur Quantifizierung von viralen Partikeln, die fähig sind, Bakterien zu infizieren und sichtbare Plaques (Löcher) auf einem Bakterienrasen auf einem festen Medium zu erzeugen.

7. Anhang: Verfahrenstechnik auf den untersuchten Kläranlagen

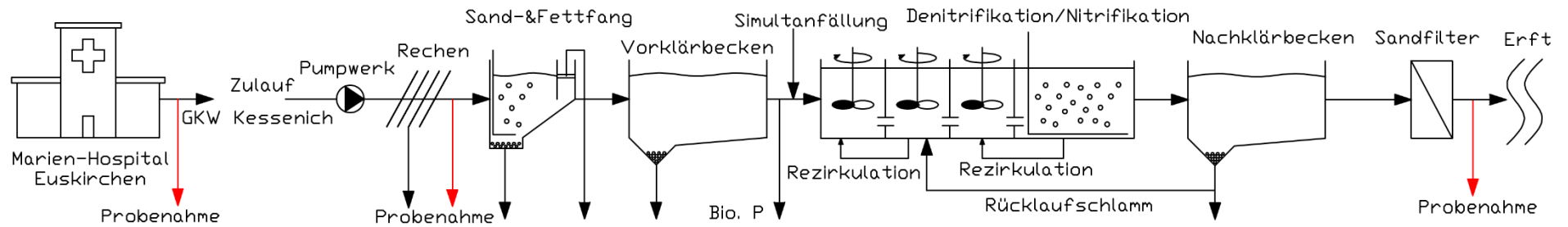


Abbildung 58: Verfahrenstechnik der Abwasserbehandlung auf dem GWK Euskirchen-Kessenich.

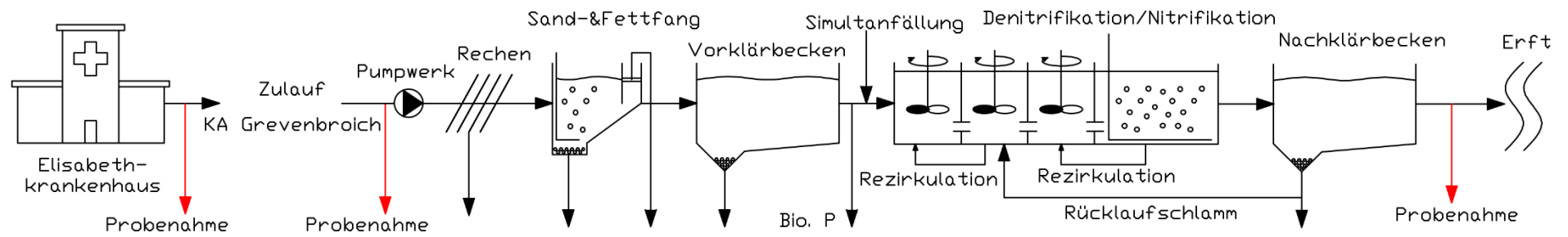


Abbildung 59: Verfahrenstechnik der Abwasserbehandlung auf der KA Grevenbroich.

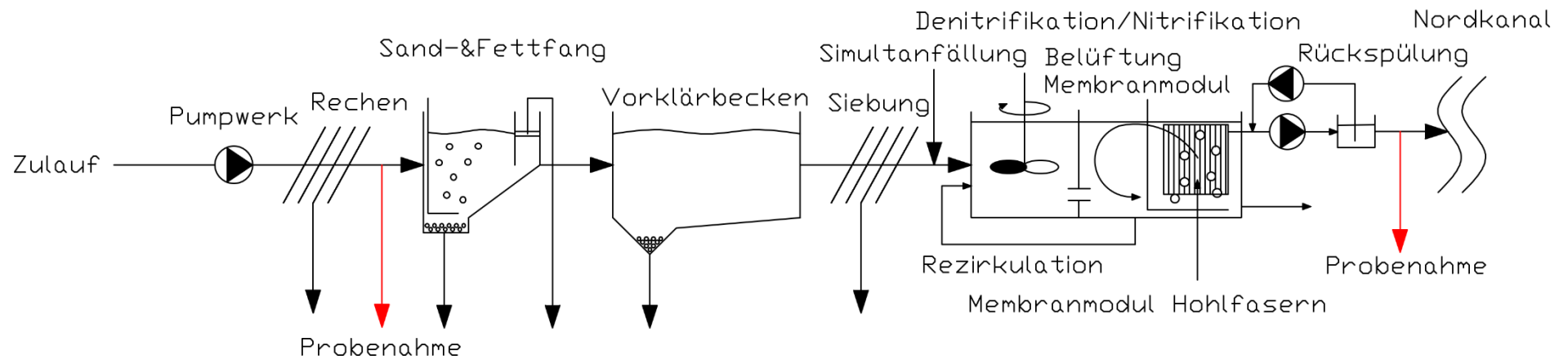


Abbildung 60: Verfahrenstechnik der Abwasserbehandlung auf dem GKW Kaarst-Nordkanal.

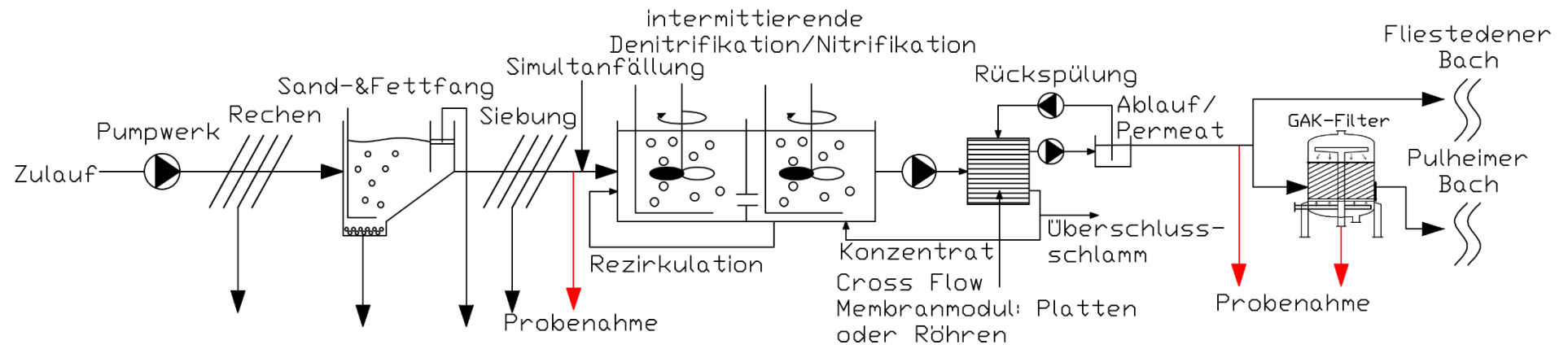


Abbildung 61: Verfahrenstechnik der Abwasserbehandlung auf der KA Glessen.

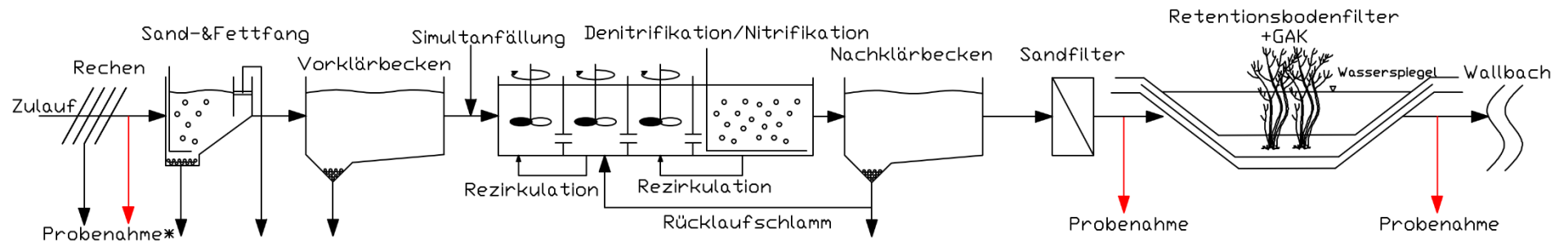


Abbildung 62: Verfahrenstechnik der Abwasserbehandlung auf der KA Rheinbach.

8. Literatur

- Alcock, B.P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K.W., Raphenya, A.R., Wlodarski, M.A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S.A., Tsang, K.K., 2023. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* 51, D690–D699.
- Amador, P.P., Fernandes, R.M., Prudêncio, M.C., Barreto, M.P., Duarte, I.M., 2015. Antibiotic resistance in wastewater: occurrence and fate of Enterobacteriaceae producers of class A and class C β -lactamases. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 50, 26–39. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.964602>
- Atherholt, T.B., LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Rosen, J.S., 1998. Effect of rainfall on Giardia and crypto. *J. AWWA* 90, 66-80.
- Banach, D.B., Bearman, G.M., Morgan, D.J., Munoz-Price, L.S., 2015. Infection control precautions for visitors to healthcare facilities. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 13, 1047–1050. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1068119>
- Bastian, D., Drensla, K., Baumgarten, S., Wachendorf, N., Thiemig, C., Ehlen, K., Le, H., Montag, D., Wintgens, T., 2021. Bewertung und Optimierung des Betriebs von Membranbioreaktoren bei simultaner Pulveraktivkohle-Zugabe – MBR-AKTIV. Kurzbericht zum gleichnamigen Forschungsvorhaben, gefördert vom Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen.
- Bengtsson-Palme, J., Larsson, D.G.J., 2016. Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ. Int.* 86, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>
- Berendes, D.M., Yang, P.J., Lai, A., Hu, D., Brown, J., 2018. Estimation of global recoverable human and animal faecal biomass. *Nat. Sustain.* 1, 679–685. <https://doi.org/10.1038/s41893-018-0167-0>
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martinez, J.L., 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Birgy, A., Madhi, F., Hogan, J., Doit, C., Gaschignard, J., Caseris, M., Bidet, P., Cohen, R., Bonacorsi, S., 2018. CTX-M-55-, MCR-1-, and FosA-Producing Multidrug-Resistant Escherichia coli Infection in a Child in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e00127-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00127-18>
- Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R.A., Schets, F.M., de Roda Husman, A.M., 2015. Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Dutch Surface Water and Wastewater. *PLOS ONE* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127752>
- Bougnom, B.P., Piddock, L.J.V., 2017. Wastewater for Urban Agriculture: A Significant Factor in Dissemination of Antibiotic Resistance. *Environ. Sci. Technol.* 51, 5863–5864. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01852>
- BRD, 1981. Gesetz zur Änderung des Gesetzes zur wirtschaftlichen Sicherung der Krankenhäuser und zur Regelung der Krankenhauspflegesätze: Krankenhausfinanzierungsgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. April 1991 (BGBl. I S. 886), das zuletzt durch Artikel 5 des Gesetzes vom 11. Juli 2021 (BGBl. I S. 2754) geändert worden ist., BGBl. I S. 1568.
- Bréchet, C., Plantin, J., Sauget, M., Thouverez, M., Talon, D., Cholley, P., Guyeux, C., Hocquet, D., Bertrand, X., 2014. Wastewater Treatment Plants Release Large Amounts of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Escherichia coli Into the Environment. *Clin. Infect. Dis.* 58, 1658–1665. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu190>
- Breilh, D., Texier-Maugein, J., Allaouchiche, B., Saux, M.-C., Boselli, E., 2013. Carbapenems. *J. Chemother.* 25, 1–17. <https://doi.org/10.1179/1973947812Y.0000000032>
- Brunsch, A.F., Florez, P.Z., Langenhoff, A.A., Ter Laak, T.L., Rijnaarts, H.H., 2020. Retention soil filters for the treatment of sewage treatment plant effluent and combined sewer overflow. *Sci. Total Environ.* 699, 134426.
- Bund, 2023. Gesundheitsberichtserstattung des Bundes: Krankenhäuser (Anzahl und je 100.000 Einwohner) sowie Aufenthalte (Fallzahl, Berechnungs-/Belegungstage und Verweildauer). Gliederungsmerkmale: Jahre, Deutschland, Einrichtungsmerkmale (Einrichtungsart / Bettenzahl / Träger / Art der Zulassung). <https://www.gbe-bund.de/gbe/> (abgerufen am 31.05.2024)
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, Zentrum Infektiologie und Reisemedizin, 2016. Gemap 2015: Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch; Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland.

- Burmeister, A.R., 2015. Horizontal Gene Transfer. *Evol. Med. Public Health* 2015, 193–194. <https://doi.org/10.1093/emph/eov018>
- Cacace, D., Fatta-Kassinos, D., Manaia, C.M., Cytryn, E., Kreuzinger, N., Rizzo, L., Karaolia, P., Schwartz, T., Alexander, J., Merlin, C., Garelick, H., Schmitt, H., de Vries, D., Schwermer, C.U., Meric, S., Ozkal, C.B., Pons, M.-N., Kneis, D., Berendonk, T.U., 2019. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Res.* 162, 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.039>
- Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D.A., Oliveira, T.C., Struelens, M.J., Suetens, C., Monnet, D.L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., Latour, K., Ivanov, I.N., Dobreva, E.G., Tambic Andrašević, A., Soprek, S., Budimir, A., Paphitou, N., Žemlicková, H., Schytte Olsen, S., Wolff Sönksen, U., Märtin, P., Ivanova, M., Lyytikäinen, O., Jalava, J., Coignard, B., Eckmanns, T., Abu Sin, M., Haller, S., Daikos, G.L., Gikas, A., Tsiodras, S., Kontopidou, F., Tóth, Á., Hajdu, Á., Guólaugsson, Ó., Kristinsson, K.G., Murchan, S., Burns, K., Pezzotti, P., Gagliotti, C., Dumpis, U., Liuimiene, A., Perrin, M., Borg, M.A., de Greeff, S.C., Monen, J.C., Koek, M.B., Elstrøm, P., Zabicka, D., Deptula, A., Hryniewicz, W., Caniça, M., Nogueira, P.J., Fernandes, P.A., Manageiro, V., Popescu, G.A., Serban, R.I., Schréterová, E., Litvová, S., Štefkovicová, M., Kolman, J., Klavs, I., Korošec, A., Aracil, B., Asensio, A., Pérez-Vázquez, M., Billström, H., Larsson, S., Reilly, J.S., Johnson, A., Hopkins, S., 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* 19, 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
- Chang, H.C., Wei, Y.F., Dijkshoorn, L., Vanechoutte, M., Tang, C.T., Chang, T.C., 2005. Species-Level Identification of Isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1632–1639. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1632-1639.2005>
- Chia, P.Y., Sengupta, S., Kukreja, A., S.L. Ponnampalavanar, S., Ng, O.T., Marimuthu, K., 2020. The role of hospital environment in transmissions of multidrug-resistant gram-negative organisms. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 9, 29. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0685-1>
- Christoffels, E., Mertens, F.M., Kistemann, T., Schreiber, C., 2014. Retention of pharmaceutical residues and microorganisms at the Altendorf retention soil filter. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 70, 1503–1509. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.404>
- Czekalski, N., Von Gunten, U., Bürgmann, H., 2016. Antibiotikaresistenzen im Wasserkreislauf. *Aqua Gas* 9, 72–80.
- da Costa, P.M., Loureiro, L., Matos, A.J.F., 2013. Transfer of Multidrug-Resistant Bacteria between Intermingled Ecological Niches: The Interface between Humans, Animals and the Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 278–294. <https://doi.org/10.3390/ijerph10010278>
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Davis, C.A., Janssen, E.M.-L., 2020. Environmental fate processes of antimicrobial peptides daptomycin, bacitracins, and polymyxins. *Environ. Int.* 134, 105271. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105271>
- Dericks, B., Grobe, S., Schwanke, B., Uphoff, J., 2023. Klinisch-relevante antibiotikaresistente Bakterien in Abwasser und Fließgewässern in NRW – ausgewählte Ergebnisse aus dem LANUV ARB-Projekt, in: 56. ESSENER TAGUNG FÜR Wasserwirtschaft, Gewässerschutz - Wasser - Abwasser. Aachen. DIN 38402-11:2009-2, 2009. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge - General information (group A) - Part 11: Sampling of waste water (A 11). Beuth Verlag GmbH, Berlin. <https://doi.org/10.31030/1442438>
- DIN EN ISO 7899-1:1999, n.d. Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken in Oberflächenwasser und Abwasser - Teil 1: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren) (ISO 7899-1:1998); Deutsche Fassung EN ISO 7899-1:1998. International Organization for Standardization.
- DIN EN ISO 8199:2021, n.d. Wasserbeschaffenheit - Allgemeine Anforderungen und Anleitung für mikrobiologische Untersuchungen mittels Kulturverfahren (ISO 8199:2018); Deutsche Fassung EN ISO 8199:2018. International Organization for Standardization.
- DIN EN ISO 9308-3:1999, n.d. Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien in Oberflächenwasser und Abwasser - Teil 3: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren) (ISO 9308-3:1998); Deutsche Fassung EN ISO 9308-3:1998. International Organization for Standardization.

- DIN EN ISO 14189:2013, n.d. Wasserbeschaffenheit - Zählung von *Clostridium perfringens* - Verfahren mittels Membranfiltration (ISO 14189:2013); Deutsche Fassung EN ISO 14189:2016. International Organization for Standardization.
- DIN EN ISO 15913:2003, n.d. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von ausgewählten Phenoxyalkancarbonsäure-Herbiziden, einschließlich Bentazon und Hydroxynitrilen mittels Gaschromatographie und massenspektrometrischer Detektion nach Fest-Flüssig-Extraktion und Derivatisierung (ISO 15913:2000); Deutsche Fassung EN ISO 15913:2003. International Organization for Standardization.
- DIN EN ISO 19458:2006, n.d. Wasserbeschaffenheit - Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 19458:2006); Deutsche Fassung EN ISO 19458:2006. International Organization for Standardization.
- DIN EN ISO 20776-1:2020-12, n.d. Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Leistungsbewertung von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung - Teil 1: Referenzmethode zur Testung der In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen Substanzen gegen schnell wachsende aerobe Bakterien, die Infektionskrankheiten verursachen.
- DIN EN ISO 20776-2:2022-04, n.d. DIN EN ISO 20776-2:2019: Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung - Teil 2: Evaluation der Leistung von Testsystemen zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung im Vergleich zur Referenzmethode der Bouillon-Mikrodilution (ISO 20776).
- DIN EN ISO 21676:2022, n.d. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe, Transformationsprodukte und weiterer organischer Stoffe gelöst in Wasser und behandeltem Abwasser - Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS oder -HRMS) nach Direktinjektion (ISO 21676:2018); Deutsche Fassung EN ISO 21676:2021. International Organization for Standardization.
- Dolejska, M., 2020. Antibiotic-Resistant Bacteria in Wildlife, in: Manaia, C.M., Donner, E., Vaz-Moreira, I., Hong, P. (Eds.), *Antibiotic Resistance in the Environment, The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 19–70. https://doi.org/10.1007/698_2020_467
- DWA, 2014. Merkblatt M 227. "Membran-Bioreaktor-Verfahren (MBR-Verfahren)" der Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e. V.
- El-Sayed Ahmed, M.A.E.-G., Zhong, L.-L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., Tian, G.-B., 2020. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerg. Microbes Infect.* 9, 868–885. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
- Erftverband, 2023. Jahresbericht des Erftverbandes für das Jahr 2022. Abrufbar unter: https://www.erftverband.de/wp-content/uploads/2023/06/ev_jahresbericht_2022_web_komplett.pdf, zuletzt abgerufen 16.11.2023.
- Fischer, D., Schlößer, R.L., Kempf, V.A.J., Wichelhaus, T.A., Klingebiel, T., Philippi, S., Falgenhauer, L., Imirzalioglu, C., Dahl, U., Brandt, C., Reinheimer, C., 2019. Overcrowding in a neonatal intermediate care unit: impact on the incidence of multidrug-resistant gram-negative organisms. *BMC Infect. Dis.* 19, 357. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3981-8>
- Flach, C.-F., Hutinel, M., Razavi, M., Åhrén, C., Larsson, D.G.J., 2021. Monitoring of hospital sewage shows both promise and limitations as an early-warning system for carbapenemase-producing Enterobacterales in a low-prevalence setting. *Water Res.* 200, 117261. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117261>
- Gibson, C.J., Stadterman, K.L., States, S., Sykora, J., 1998. Combined sewer overflows: A source of *Cryptosporidium* and *Giardia*? *Wat Sci Tech* 38, 67-72.
- Güde, H., Eckenfels, S., Palmer, A., Fitz, S., Pietruske, J., Mc Taggart, K., Haibel, B., Setzer, T., 2001. Erfassung und Bewertung von Eintragswegen für Belastungen mit Fäkalkeimen im Einzugsgebiet der Seefelder Ach (Bodenseekreis). *Surv. Eval. Entry Paths Faecal Contam. Catchment Area Seefelder Ach Bodensee Dist.*
- Gujer, W., 1999. *Siedlungswasserwirtschaft*. Springer.
- Hassoun-Kheir, N., Stabholz, Y., Kreft, J.-U., de la Cruz, R., Romalde, J.L., Nesme, J., Sørensen, S.J., Smets, B.F., Graham, D., Paul, M., 2020. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Sci. Total Environ.* 743, 140804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140804>
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E.T., Schwartz, T., 2017. Occurrence of the mcr-1 Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Front. Microbiol.* 8, 1282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01282>

- Heudorf, U., Kempf, V., Reinheimer, C., Exner, M., Schmithausen, R., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., 2018. Klebsiella pneumoniae KPC-3 Ausbruch am Universitätsklinikum Frankfurt am Main – Teil II: weitere umwelthygienische Erkenntnisse. Presented at the Der Öffentliche Gesundheitsdienst – jetzt erst recht! 68. Wissenschaftlicher Kongress des Bundesverbandes der Ärztinnen und Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (BVÖGD) und des Bundesverbandes der Zahnärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (BZÖG) in Zusammenarbeit mit der Gesellschaft für Hygiene, Umweltmedizin und Präventivmedizin (GHUP), Osnabrück, Niedersachsen, p. 383. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1639204>
- Hiller, C.X., Hübner, U., Fajnorova, S., Schwartz, T., Drewes, J.E., 2019. Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. *Sci. Total Environ.* 685, 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.315>
- Honda, R., Tachi, C., Yasuda, K., Hirata, T., Noguchi, M., Hara-Yamamura, H., Yamamoto-Ikemoto, R., Watanabe, T., 2020. Estimated discharge of antibiotic-resistant bacteria from combined sewer overflows of urban sewage system. *NPJ Clean Water* 3, 15.
- Horstmeyer, N., Rapp-Fiegle, S., Helmreich, B., Drewes, J.E., 2014. Kosten der Abwasserbehandlung– Finanzierung, Kostenstrukturen und Kostenkenndaten der Bereiche Kanal, Sonderbauwerke und Kläranlagen.
- ISO 10705-2, 2000. Water quality - Detection and enumeration of bacteriophages - Part 2: Enumeration of somatic coliphages.
- Karthikeyan, K.G., Meyer, M.T., 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Sci. Total Environ.* 361, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.06.030>
- Kehl, K., Schallenberg, A., Szekat, C., Albert, C., Sib, E., Exner, M., Zacharias, N., Schreiber, C., Parčina, M., Bierbaum, G., 2021. Dissemination of carbapenem resistant bacteria from hospital wastewater into the environment. *Sci. Total Environ.* 151339. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151339>
- Kistemann, T., Claßen, T., Koch, C., Dangendorf, F., Fischeder, R., Gebel, J., Vacata, V., Exner, M., 2002. Microbial Load of Drinking Water Reservoir Tributaries during Extreme Rainfall and Runoff. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2188–2197. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2188-2197.2002>
- Koh, T.H., Ko, K., Jureen, R., Deepak, R.N., Tee, N.W.S., Tan, T.Y., Tay, M.R.J., Lee, V.J.M., Barkham, T.M.S., 2015. High Counts of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Hospital Sewage. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 36, 619–621. <https://doi.org/10.1017/ice.2015.44>
- Koivunen, J., Heinonen-Tanski, H., 2005. Peracetic acid (PAA) disinfection of primary, secondary and tertiary treated municipal wastewaters. *Water Res.* 39, 4445–4453.
- Korzeniewska, E., Korzeniewska, A., Harnisz, M., 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.014>
- Krapner, N., Hutinel, M., Schumacher, K., Gray, D.A., Genheden, M., Fick, J., Flach, C.-F., Larsson, D.G.J., 2021. Evidence for selection of multi-resistant *E. coli* by hospital effluent. *Environ. Int.* 150, 106436. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106436>
- KRINKO, 2019. Ergänzung zur Empfehlung der KRINKO „Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen“ (2012) im Zusammenhang mit der von EUCAST neu definierten Kategorie „I“ bei der Antibiotikaresistenzbestimmung: Konsequenzen für die Definition von MRGN 82–83. <https://doi.org/10.25646/5916>
- KRINKO, 2012. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 55, 1311–1354. <https://doi.org/10.1007/s00103-012-1549-5>
- Krzywinski, M., Altman, N., 2014. Visualizing samples with box plots. *Nat. Methods* 11, 119–120. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2813>
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review. *Chemosphere* 75, 417–441. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- Kümmerer, K., Henninger, A., 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 1203–1214.
- Lamba, M., Graham, D.W., Ahammad, S.Z., 2017. Hospital Wastewater Releases of Carbapenem-Resistance Pathogens and Genes in Urban India. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13906–13912. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03380>
- Lamba, M., Gupta, S., Shukla, R., Graham, D.W., Sreekrishnan, T.R., Ahammad, S.Z., 2018. Carbapenem resistance exposures via wastewaters across New Delhi. *Environ. Int.* 119, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.004>
- LaPara, T.M., Burch, T.R., McNamara, P.J., Tan, D.T., Yan, M., Eichmiller, J.J., 2011. Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior Harbor. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9543–9549. <https://doi.org/10.1021/es202775r>

- Laurens, C., Jean-Pierre, H., Licznar-Fajardo, P., Hantova, S., Godreuil, S., Martinez, O., Jumas-Bilak, E., 2018. Transmission of IMI-2 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from river water to human. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 15, 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.06.022>
- Lee, H.-Y., Chen, C.-L., Wu, S.-R., Huang, C.-W., Chiu, C.-H., 2014. Risk factors and outcome analysis of acinetobacter baumannii complex bacteremia in critical patients. *Crit. Care Med.* 42, 1081–1088. <https://doi.org/10.1097/CCM.000000000000125>
- Lee, J., Jeon, J.H., Shin, J., Jang, H.M., Kim, S., Song, M.S., Kim, Y.M., 2017. Quantitative and qualitative changes in antibiotic resistance genes after passing through treatment processes in municipal wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 605–606, 906–914. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.250>
- Lindberg, R., Jarnheimer, P.-Å., Olsen, B., Johansson, M., Tysklind, M., 2004. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere* 57, 1479–1488. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.015>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Malzahn, J., Garre, P., Mostert, C., 2018. Bedarf und Bedarfsgerechtigkeit - Umsetzung der Qualitätsagenda des Krankenhausstruktur-gesetzes—ein Vorschlag zur Vorgehensweise am Beispiel des Landes Nordrhein-Westfalen, in: *Krankenhaus-Report 2018*. Schattauer, Stuttgart, pp. 171–191.
- Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., Hou, J., Mu, Q., Alvarez, P.J.J., 2015. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Res.* 85, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>
- Marien-Hospital, 2023. Internetpräsenz des Krankenhauses Marien-Hospital Euskirchen. <https://www.marien-hospital.com/marien-hospital-euskirchen> abgerufen am 22.09.2023.
- Mascher, F., Mascher, W., Pichler-Semmelrock, F., Reinthaler, F.F., Zarfel, G.E., Kittinger, C., 2017. Impact of combined sewer overflow on wastewater treatment and microbiological quality of rivers for recreation. *Water* 9, 906.
- Mauer, C., 2011. Technische und ökonomische Aspekte der separaten Erfassung und Behandlung von Krankenhausabwasser = Technical and economic aspects of the separate collection and treatment of hospital wastewater. Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2011.
- Mendes, A.C., Novais, Á., Campos, J., Rodrigues, C., Santos, C., Antunes, P., Ramos, H., Peixe, L., 2018. mcr-1 in Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae with Hospitalized Patients, Portugal, 2016–2017. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 762–766. <https://doi.org/10.3201/eid2404.171787>
- 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., Bierbaum, G., 2018. Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy057>
- Narciso-da-Rocha, C., Varela, A.R., Schwartz, T., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2014. blaTEM and vanA as indicator genes of antibiotic resistance contamination in a hospital–urban wastewater treatment plant system. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.10.001>
- O'Neill, J., 2016. Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Rev. Antimicrob. Resist. Tackling Drug-Resist. Infect. Glob. Final Rep. Recomm.*
- Ory, J., Bricheux, G., Robin, F., Togola, A., Forestier, C., Traore, O., 2019. Biofilms in hospital effluents as a potential crossroads for carbapenemase-encoding strains. *Sci. Total Environ.* 657, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.427>
- Overath, H., Merkel, W., Hiekel, S., 2000. Einleitung von Kläranlagenabläufen in kleine Fließgewässer: Bewertung der Ablaufqualität nach der EG-Badegewässer-Richtlinie. Ministerium für Umwelt und Naturschutz - Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, Mülheim an der Ruhr.
- Pallares-Vega, R., Blaak, H., van der Plaats, R., de Roda Husman, A.M., Leal, L.H., van Loosdrecht, M.C., Weissbrodt, D.G., Schmitt, H., 2019. Determinants of presence and removal of antibiotic resistance genes during WWTP treatment: a cross-sectional study. *Water Res.* 161, 319–328.
- Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A., 2011. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
- Paulus, G.K., Hornstra, L.M., Alygizakis, N., Slobodnik, J., Thomaidis, N., Medema, G., 2019. The impact of on-site hospital wastewater treatment on the downstream communal wastewater system

- in terms of antibiotics and antibiotic resistance genes. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 222, 635–644. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.01.004>
- Pinnekamp, J., Firk, J., Schleiffer, P., 2019. Bewertung der urbanen Gewässereinträge und Möglichkeiten der Eintragsminderung. Auf: Abschlussveranstaltung des BMBF - Verbundvorhabens HyReKA in Berlin am 04.04.2019.
- Pires, J., Santos, R., Monteiro, S., 2023. Antibiotic resistance genes in bacteriophages from wastewater treatment plant and hospital wastewaters. *Sci. Total Environ.* 892, 164708.
- Pruden, A., Larsson, D.G.J., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K.K., Graham, D.W., Lazorchak, J.M., Suzuki, S., Silley, P., Snape, J.R., Topp, E., Zhang, T., Zhu, Y.-G., 2013. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.* 121, 878–885. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206446>
- Quach-Cu, J., Herrera-Lynch, B., Marciniak, C., Adams, S., Simmerman, A., Reinke, R.A., 2018. The effect of primary, secondary, and tertiary wastewater treatment processes on antibiotic resistance gene (ARG) concentrations in solid and dissolved wastewater fractions. *Water* 10, 37.
- Ranjan, R., Thatikonda, S., 2021. β -Lactam Resistance Gene NDM-1 in the Aquatic Environment: A Review. *Curr. Microbiol.* 78, 3634–3643. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02630-6>
- Rechenburg, A., Kistemann, T., 2009. Sewage effluent as a source of *Campylobacter* sp. in a surface water catchment. *Int. J. Environ. Health Res.* 19, 239–249. <https://doi.org/10.1080/09603120802460376>
- Rechenburg, A., Koch, C., Classen, T., Kistemann, T., 2006. Impact of sewage treatment plants and combined sewer overflow basins on the microbiological quality of surface water. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 54, 95–99.
- Resch, H., Schatz, R., 2020. Abwassertechnik verstehen. Ein kleines 1 x 1 der Abwassertechnik für Einsteiger und interessierte Laien. 2. überarb.
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Barceló, D., Balcázar, J.L., 2015. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Res.* 69, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Statistisches Bundesamt, 2024. (Destatis). 32213-0001: Länge des Kanalnetzes, Abwasserbehandlungsanlagen, Angeschlossene Einwohnerwerte, Jahresabwassermenge, Schmutzwasser: Bundesländer, Jahre (Stand 2019).
- Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J.A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., Voigt, A., Kreyenschmidt, J., 2020. ESKAPE Bacteria and Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Wastewater and Process Water from German Poultry Slaughterhouses. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e02748-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02748-19>
- Schmiege, D., Arredondo, A.M.P., Ntajal, J., Paris, J.M.G., Savi, M.K., Patel, K., Yasobant, S., Falkenberg, T., 2020a. One Health in the context of coronavirus outbreaks: A systematic literature review. *One Health* 10, 100170.
- Schmiege, D., Evers, M., Kistemann, T., Falkenberg, T., 2020b. What drives antibiotic use in the community? A systematic review of determinants in the human outpatient sector. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 226, 113497. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113497>
- Schmiege, D., Zacharias, N., Sib, E., Falkenberg, T., Moebus, S., Evers, M., Kistemann, T., 2021. Prevalence of multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in urban community wastewater. *Sci. Total Environ.* 785, 147269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147269>
- Schreiber, C., Zacharias, N., Essert, S.M., Wasser, F., Müller, H., Sib, E., Precht, T., Parcina, M., Bierbaum, G., Schmithausen, R.M., Kistemann, T., Exner, M., 2021. Clinically relevant antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments – An optimized culture-based approach. *Sci. Total Environ.* 750, 142265. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142265>
- Schuster, D., Axtmann, K., Holstein, N., Felder, C., Voigt, A., Färber, H., Ciorba, P., Szekat, C., Schallenberg, A., Böckmann, M., Zarfl, C., Neidhöfer, C., Smalla, K., Exner, M., Bierbaum, G., 2022. Antibiotic concentrations in raw hospital wastewater surpass minimal selective and minimum inhibitory concentrations of resistant *Acinetobacter baylyi* strains. *Environ. Microbiol.* 24, 5721–5733. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16206>
- Seiger, D., 2023. Vergleich verschiedener Verfahren zur Elimination antibiotikaresistenter Bakterien aus Abwasser (Masterarbeit). Fachhochschule Aachen.
- Sib, E., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Klanke, U., Savin, M., Hembach, N., Schallenberg, A., Kehl, K., Albert, C., Gajdiss, M., Zacharias, N., Müller, H., Schmithausen, R.M., Exner, M., Kreyenschmidt, J., Schreiber, C., Schwartz, T., Parcina, M., Bierbaum, G., 2020. Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Sci. Total Environ.* 746, 140894. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140894>

- Sib, E., Voigt, A.M., Wilbring, G., Schreiber, C., Faerber, H.A., Skutlarek, D., Parcina, M., Mahn, R., Wolf, D., Brossart, P., Geiser, F., Engelhart, S., Exner, M., Bierbaum, G., Schmithausen, R.M., 2019. Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in biofilms in clinical wastewater networks. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 222, 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.03.006>
- Statistisches Bundesamt, 2019. (Destatis). Fachserie. 19, Umwelt. 2, Wasserversorgung und Abwasserbeseitigung. 1, Öffentliche Wasserversorgung und öffentliche Abwasserentsorgung. 3, Strukturdaten zur Wasserwirtschaft, 3059633-6. Hervorgegangen aus: Fachserie / 19 / 2 / 1. Wiesbaden.
- Swayne, R., Ellington, M.J., Curran, M.D., Woodford, N., Aliyu, S.H., 2013. Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo- β -lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum β -lactamases. *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 352–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.018>
- Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharm. Ther.* 40, 277.
- Vijayakumar, V., Santiago, A., Smith, R., Smith, M., Robins-Browne, R.M., Nataro, J.P., Ruiz-Perez, F., 2014. Role of class 1 serine protease autotransporter in the pathogenesis of *Citrobacter rodentium* colitis. *Infect. Immun.* 82, 2626–2636. <https://doi.org/10.1128/IAI.01518-13>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125032>
- Walsh, T.R., 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36, S8–S14. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(10\)70004-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(10)70004-2)
- Wang, Q., Wang, P., Yang, Q., 2018. Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. *Sci. Total Environ.* 621, 990–999. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.128>
- Wasser, L., 2012. Leitlinien zur Durchführung dynamischer Kostenvergleichsrechnungen (KVR-Leitlinien). 8. überarbeitete Auflage. Kult. Berl. GmbH.
- WHO, 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
- WHO (Ed.), 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Zacharias, N., 2021. Vorkommen Antibiotika-resistenter Bakterien in der aquatischen Umwelt: Zusammenhänge zu dem Vorkommen antibiotisch wirkender Substanzen (PhD Thesis). Dissertation, Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 2021.
- Zacharias, N., Essert, S.M., Brunsch, A.F., Christoffels, E., Kistemann, T., Schreiber, C., 2020. Performance of retention soil filters for the reduction of hygienically-relevant microorganisms in combined sewage overflow and treated wastewater. *Water Sci. Technol.* 81, 535–543. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.132>
- Zarei-Baygi, A., Smith, A.L., 2021. Intracellular versus extracellular antibiotic resistance genes in the environment: Prevalence, horizontal transfer, and mitigation strategies. *Bioresour. Technol.* 319, 124181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124181>
- Zhu, W., Lawsin, A., Lindsey, R.L., Batra, D., Knipe, K., Yoo, B.B., Perry, K.A., Rowe, L.A., Lonsway, D., Walters, M.S., Rasheed, J.K., Halpin, A.L., 2019. Conjugal Transfer, Whole-Genome Sequencing, and Plasmid Analysis of Four *mcr-1*-Bearing Isolates from U.S. Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e02417-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02417-18>